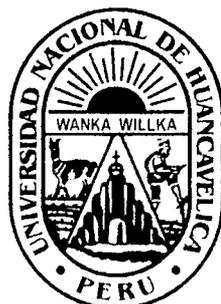


UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCVELICA

(Creada por Ley N° 25265)



FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE AGRONOMÍA

TESIS

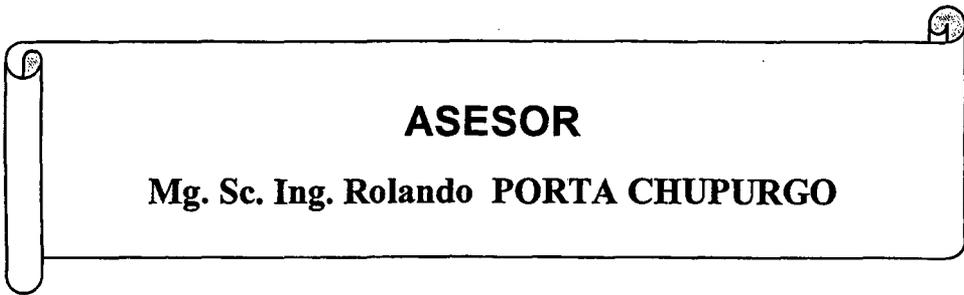
**“ EFECTO DE DOSIS DE BENCIL AMINO PURINA (BAP) Y EL
ÁCIDO NAFTALEM ACÉTICO (ANA) EN LA PRODUCCION IN
VITRO DE ESTEVIA (*Stevia rebaudiana B.*) EN ACOBAMBA ”**

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
CULTIVO IN VITRO - BIOTECNOLOGÍA
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTADO POR EL BACHILLER:

KIQUE CONDORI LAURENTE

ACOBAMBA - HUANCVELICA
2013



ASESOR

Mg. Sc. Ing. Rolando PORTA CHUPURGO

DEDICATORIA

Con todo mi afecto a mi madre, mis hermanos y a mi hijo, quien serán siempre mi motivación para esforzarme durante mi vida y por su apoyo en todo momento.

Gracias a ellos.

AGRADECIMIENTO

- ✓ A la Universidad Nacional de Huancavelica, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela Académico Profesional de Agronomía, por acogerme y haberme formado profesional en esta casa superior de estudios.
- ✓ Al Mg. Sc. Ing. Rolando Porta Chupurgo por su orientación y asesoramiento en la conducción del trabajo de investigación.
- ✓ Al Ing. Oscar Santiago Puente Segura, por su apoyo y orientación en el proceso de la multiplicación in vitro.
- ✓ A los Docentes de la Facultad de Ciencias Agrarias en especial a los de la Escuela Académico Profesional de Agronomía, por guiarme y enseñarme durante los años de estudio
- ✓ A mis Padres y Hermanos por su apoyo incondicional durante mi vida universitaria, a ellos un agradecimiento eterno.

INDICE

INDICE	
RESUMEN	
INTRODUCCION	
Capítulo I: Problema	14
1.1 Planteamiento del problema	14
1.2 Formulación del problema	14
1.3 Objetivos	14
General	14
Específicos	15
1.4 Justificación	15
Científico	15
Social	15
Económico	15
Capítulo II: Marco Teórico	16
2.1 Antecedentes	16
2.2 Bases teóricas	17
2.2.1 Fundamentos de la propagación de plántulas <i>in vitro</i>	17
a. Multiplicación de plántulas	18
➤ Propagación vegetativa	18
➤ Producción de plantas libres de virus	18
b. Equipo necesario para el cultivo <i>in vitro</i>	18
➤ Autoclave	18
➤ Cámara de flujo laminar	18
➤ Medio de cultivo	18
➤ Planta	18
➤ Cámara de cultivo	19
c. Condiciones del cultivo <i>in vitro</i>	19
d. Sub cultivos o replicado	20
e. Fases del cultivo de meristemos	20
f. Fases del cultivo de embriones	20
2.2.2 Selección del explante	21
a. Explante	21

b. Desinfección	21
2.2.3 Medios de cultivo	22
a. Micro propagación	23
b. Esterilización	23
c. Patógenos	23
d. Cultivo in vitro	23
e. Planta madre	24
f. Condiciones ambientales de incubación	24
2.2.4 Funciones de las hormonas inducidas	24
2.2.4.1 El Ácido giberélico	25
2.2.4.2 Las Citoquininas	25
2.2.4.3 Las auxinas	25
a. Tipos de auxinas	26
b. Funciones de las auxinas	26
2.2.4.4 El agar	26
a. Líquidos	27
b. Semisólidos	27
c. Sólidos	27
> Definidos	27
> Complejos	27
2.2.4.5 Cultivo de callo in vitro	28
2.2.5 Estevia y su morfología	28
a. Origen de la Estevia	28
b. Morfología de la planta	30
c. Variedades importantes	30
d. Propiedades de la Estevia	31
e. Información nutricional	32
f. Otras propiedades	32
2.2.6 Requerimientos edafoclimáticos	32
a. Condiciones ideales de cultivo	32
Cuidados culturales en Estevia	34
b. Cosecha de Estevia	34
c. Rendimiento	34
2.3 Hipótesis	34
2.4 Variables de estudio	35
Prendimiento de yemas	35
Ritmo de crecimiento	35
Numero de hojas por planta	35
Capítulo III: Metodología de la investigación	36
3.1 Ámbito de estudio	36
3.1.1 Ubicación política	36
3.1.2 Ubicación geográfica	36
3.1.3 Factores climáticos:	36
3.1.4 Descripción del material evaluada	37
a. Planta madre	37

b. Materiales empleados en la investigación	37
c. Insumos empleados en la investigación	38
3.2 Tipo de investigación	38
3.3 Nivel de investigación	38
3.4 Método de investigación	38
3.5 Diseño de investigación	38
Características de la unidad experimental	39
Tratamientos	39
Modelo aditivo lineal	40
Croquis del experimento	40
3.6 Población	40
Muestra	40
Muestreo	41
3.7 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	41
3.8 Procedimiento de recolección de datos	41
3.9 Técnicas de procesamiento y análisis de datos	41
Capítulo IV: Resultados	42
4.1 Presentación de resultados	42
4.2 Discusión	53
Conclusiones	57
Recomendación	58
Referencia bibliográfica	59
Artículo científico	61
Anexos	62
Imágenes	63

INDICE DE CUADROS

Cuadro N° 01: ANVA del efecto del ANA y BAP en el porcentaje de prendimiento	42
Cuadro N° 02: ANVA del efecto del ANA y BAP en el ritmo crecimiento a los 15 DDE	43
Cuadro N° 03: ANVA del efecto del ANA y BAP en el ritmo crecimiento a los 30 DDE	44
Cuadro N° 04: ANVA del efecto del ANA y BAP en el ritmo crecimiento a los 40 DDE	46
Cuadro N° 05: ANVA del efecto del ANA y BAP en el N° hojas/planta a los 20 DDE	48
Cuadro N° 06: ANVA del efecto del ANA y BAP en el N° hojas/planta a los 40 DDE	49
Cuadro N° 07: ANVA del efecto del ANA y BAP en el N° hojas/planta a los 40 DDE	51

INDICE DE GRAFICOS

Grafico N° 01: ANVA del efecto del ANA y BAP en el porcentaje de prendimiento	43
Grafico N° 02: ANVA del efecto del ANA y BAP en el ritmo crecimiento a los 15 DDE	44
Grafico N° 03: ANVA del efecto del ANA y BAP en el ritmo crecimiento a los 30 DDE	46
Grafico N° 04: ANVA del efecto del ANA y BAP en el ritmo crecimiento a los 40 DDE	47
Grafico N° 05: ANVA del efecto del ANA y BAP en el N° hojas/planta a los 20 DDE	49
Grafico N° 06: ANVA del efecto del ANA y BAP en el N° hojas/planta a los 40 DDE	50
Grafico N° 07: ANVA del efecto del ANA y BAP en el N° hojas/planta a los 40 DDE	52

INDICE DE IMÁGENES

Imagen N° 01: Multiplicación de meristemas en completo asepsia	63
Imagen N° 02: Colocado de códigos en los tubos	63
Imagen N° 03: Destilación del agua para los trabajos	64
Imagen N° 04: Preparacion de los reactivos y la mezcla con agua	65
Imagen N° 05: Preparación de las proporciones de dosis	66
Imagen N° 06: Manipulando del autoclave	67

RESUMEN

El trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad Ciencias Agrarias – UNH, Distrito y Provincia de Acobamba y Departamento de Huancavelica, donde se evaluó el Efecto de dosis de Bencil Amino Purina (BAP) y del Ácido Naftalem Acético (ANA) en la producción *in vitro* de Stevia (*Stevia rebaudiana* B.), el trabajo se condujo a través de los métodos estadísticos, los diferentes variables en estudio, obteniendo resultados estadísticamente significativos, El objetivo del presente trabajo fue evaluar las diferentes concentraciones de Bencil Amino Purina (BAP), combinadas con varias cantidades de Ácido Naftalem Acético (ANA) sobre el porcentaje de prendimiento de las plántulas, en las diferentes fases fenológicas del cultivo, para el porcentaje de prendimiento a los 8 días después del trasplante, no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos, bloques y el efecto de A x B no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos en estudio. Por lo tanto, podemos afirmar que todos los tratamientos se comportaron de manera homogénea. Para el ritmo crecimiento a los 15, 30 y 40 días después del explante, en el cual no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos, bloques y el efecto de A x B, obteniendo promedios entre el rango de 3.82cm a 4.42cm; 8.29cm a 9.75cm y 15.2cm a 18.00cm de altura de planta entre todos los tratamientos respectivamente. Así mismo, en la evaluación del número de hojas por planta a los 20,40 y 60 días después del explante, en el cual no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos, bloques y el efecto de A x B, obteniendo promedios entre el rango de 5.00 a 8.00; 7.00 a 9.41 y 13.00 a 18.00 hojas/planta respectivamente.

INTRODUCCIÓN

La Estevia (*Stevia rebaudiana* B.) es una planta perenne, semi-arbustiva pertenece a la familia de las Asteraceae, originaria del noreste de Paraguay, en los límites con Brasil, donde crece en estado silvestre (Taiariol, 1995; Megeji *et al.*, 2005); sus hojas contienen edulcorantes, esteviósidos y rebaudiósidos, que se estima poseen un poder endulzante que varía de 100 a 400 veces mayor que la sacarosa (Bespalhok *et al.*, 1993; Bespalhok y Hattori, 1997; Soto y Del Valle, 2002). Esta capacidad endulzante ha conducido a considerarla como una buena alternativa para reemplazar edulcorantes que han sido cuestionados frecuentemente por su carácter artificial y sus efectos nocivos para la salud humana en largo plazo, como la sacarina, el aspartame y al acesulfame-K, entre otros (Taiariol, 1995).

La reproducción sexual de Estevia (*Stevia rebaudiana* B.), presenta ciertas desventajas que pueden afectar de forma negativa la eficiencia del cultivo como son la alta heterogeneidad de las poblaciones resultantes de sus semillas, la baja eficiencia de la germinación debido al alto porcentaje de semillas estériles y la ineficiencia de la recolección de la semilla por la desuniformidad en la floración y la maduración de la misma. Esta situación ha propiciado el uso de semilla vegetativa para la siembra de cultivos comerciales, la cual no está exenta de problemas debido a las bajas tasas de multiplicación por estacas, lo que ha propagación *in vitro* de Estevia (*Stevia rebaudiana* B.), a partir de ápices meristemáticos y obtenidos de plantas madres, fueron establecidos sobre medio de cultivo sólido de Murashige y Skoog (1962) diluido a la mitad (1/2MS) suplementado con (en mg L⁻¹) sacarosa (30,000), myo-inositol (100), tiamina HCl (0.4) y TC-Agar (Sigma). El pH del medio fue ajustado a 5.7 - 5.8 previo a la adición del Agar y esterilizado a 121 °C y 1.1 kg cm⁻² por 20 minutos. Con el fin de determinar el mejor tratamiento para el prendimiento de nuevas plantas, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones (0.05, 0.10 y 0.15 mg L⁻¹) de Bencil Amino Purina (BAP) combinadas con tres concentraciones (0.25, 0.50 y 0.75 mg L⁻¹) de Acido Naftalen Acético (ANA) para un total de 36 unidades experimentales, estableciendo 30ml de medio de cultivo,

independientemente suplementado con los tratamientos mencionados, 10 ápices de explantes fueron establecidos por cada unidad experimental, los cuales fueron sellado con Parafilm. Para determinar el efecto de las concentraciones de BAP en combinación con ANA sobre el prendimiento, altura de planta, número de hoja, porcentaje de contaminación en los tratamientos que indujeron los mayores niveles de formación de cada tratamiento.

Los agricultores de la zona no tienen un patrón establecido para estas prácticas a pesar de la diversidad de sistemas de manejo de los fertilizantes, especialmente en el uso medios de cultivo en micro propagación *in vitro* de plantas. Al hacer uso de estas fuentes orgánicas, se trata fundamentalmente de asegurar que las plantas puedan multiplicarse libres de cualquier microorganismo y patógeno nocivo, así como proporcionar al cultivo las sustancias que favorecen el crecimiento y desarrollo. Dentro de un concepto de cultivo *in vitro*, es importante considerar dos aspectos fundamentales; preparación de medios de cultivo adecuados para la instalación de meristemas y otro es; a partir de este favorecer la multiplicación de plantas libres de cualquier enfermedad o patógeno nocivo, que pueden desfavorecer el desarrollo de este y lo más importante que la Estevia es comercial en el mercado local, regional, nacional y internacional, lo cual hace que este cultivo sea una alternativa de producción en nuestro país.

Capítulo I: Problema

1.1 Planteamiento del problema

La naturaleza alberga una gran riqueza cultural y biotecnológica que a través del tiempo y de los aportes investigativos ha brindado beneficios a la humanidad, por lo que se hace necesario conservarla. Debido al desarrollo de los países considerados del primer mundo, nuestro avance en biotecnología se está quedando en el vacío, lo cual nos lleva a pensar que debemos trabajar en la ciencia y la tecnología, la forma de propagación de Estevia (*Stevia rebaudiana B.*), se realiza de dos maneras: uno por semilla botánica y por propagación vegetativa, sin embargo se tiene problemas en la reproducción reduciendo en un 10 y 38 %. Frente a esta realidad, nos planteamos solucionar este problema, utilizando el cultivo *In vitro* de tejidos vegetales, para solucionar en parte, para buscar el efecto de dosis de un medio de cultivo adecuado para esta especie vegetal, en la actualidad en nuestro país no se realizan trabajos de este tipo de envergadura en la producción de plántulas de Estevia (*Stevia rebaudiana B.*) *in vitro*, que abastezca al agricultor en plántulas.

1.2 Formulación del problema

Dado que la investigación estuvo basado en la micro propagación *in vitro* de la Estevia nos formulamos el siguiente problema: ¿Desconocimiento del efecto de dosis de Bencil Amino Purina (BAP) y del Ácido Naftalem Acético (ANA) en la Producción *In Vitro* de Estevia (*Stevia rebaudiana B.*)?

1.3 Objetivos

General

- Evaluar el efecto de dosis de Bencil Amino Purina (BAP) y del Ácido Naftalem Acético (ANA) en la producción *in vitro* de Estevia (*Stevia rebaudiana B.*).

Específicos

- Determinar una dosis adecuada de medio de cultivo para la producción de Estevia
- Obtener plantas libres de enfermedad.
- Obtener plántulas vigorosas (tamaño, hoja).

1.4 Justificación

Científico

El efecto de dosis de Bencil Amino Purina (BAP) y del Ácido Naftalem Acético (ANA) en la producción *in vitro* de Estevia (*Stevia rebaudiana B*) a partir de ápices, se realizó con la finalidad de obtener una dosis adecuada y plántulas de buen vigor, de esta manera aumentar la producción y la productividad, asimismo, se estima que en el futuro esta planta está destinada a reemplazar al azúcar de sacarosa o azúcar de caña por los efectos perjudiciales que tiene para la salud humana.

Social

El efecto de dosis de Bencil Amino Purina (BAP) y del Acido Naftalem Acético (ANA) en la producción *in vitro* de Estevia (*Stevia rebaudiana B.*), se realizó con la finalidad de contribuir a la sociedad realizando trabajos de investigación, para obtener plántulas de calidad, de esta manera aumentar la producción y productividad, demanda del producto por ende cambiar la calidad de vida de la región selva, porque son de gran potencial para la producción, se utiliza como planta medicinal.

Económico

El cultivo de tejidos es otro método que permite obtener plantaciones más uniformes, además de la rápida multiplicación clonal, las plantas micro propagadas se utilizan como banco de planta madre. La producción de cultivo *in vitro* de Estevia (*Stevia rebaudiana B.*) se economizara el costo por que estas plántulas son libres y sanas de enfermedad.

Capítulo II: Marco Teórico

2.1 Antecedentes

La Estevia (*Stevia rebaudiana B.*) es una planta herbácea perenne perteneciente a la familia de las Asteráceas, que crece como arbusto salvaje en el suroeste de Brasil y Paraguay, y generalmente se propaga comercialmente de manera asexual. Cobra un alto valor entre los vegetales nativos de estos países, debido a que contiene glucósidos de diterpeno bajos en calorías, llamados comúnmente esteviósidos, cuyo poder edulcorante en estado puro y cristalino puede ser 300 veces mayor que el del azúcar de caña. Otros compuestos químicos de interés también han sido aislados de especies pertenecientes al género *Stevia*, tales como longipinenos provenientes de *S. pilosa*, *S. viscida* y *S. lucida* (Guerra y Ramírez *et al.*, 1998).

El edulcorante, cuyos dos glucósidos principales son el esteviósido (110-270 veces más dulce que el azúcar) y rebaudiósido A (180-400 veces más dulce que el azúcar), este último de mayor valor comercial, cuya diferencia radica solamente en la presencia de una glucosa, es un polvo cristalino blanco; los científicos lo llaman una "molécula noble", debido a que es 100% natural, no tiene calorías, las hojas se pueden utilizar en su estado natural y sólo se requieren cantidades pequeñas. Otras ventajas adicionales son que no eleva los niveles de glucosa en la sangre, no aporta calorías al ser metabolizado, es antiácido, cardiotónico, no produce caries al no ser fermentado por las bacterias orales, y se distingue de los edulcorantes artificiales por no tener sabor metálico y no ser cancerígeno (Tadhani *et al.*, 2007).

La seguridad y las bondades de los edulcorantes de estevia en el metabolismo animal se han demostrado así como sus efectos positivos en la salud del hombre, en las que se reportan propiedades anti-rotavirus mejoramiento de la hipertensión, tratamiento de la

diabetes mellitus tipo 2, al estimular la secreción de insulina actuando sobre las células b del páncreas (Jeppesen *et al.*, 2000).

Aunque existe consenso mundial de las ventajas de Estevia para la salud humana y que su cultivo es un sistema altamente generador de empleos rurales, aún existen grandes vacíos en el conocimiento de esta especie, principalmente en aspectos como la nutrición y las variables ambientales y su relación con la síntesis de las principales moléculas edulcorantes (Jaitak *et al.*, 2008).

El proceso de multiplicar plantas *in vitro*. A través de la micro propagación, es a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, en la cual se obtiene una descendencia uniforme en condiciones de asepsia (Agramonte, 1998).

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Fundamentos de la propagación de plantones *in vitro*

El cultivo *in vitro* es un método de propagación de plantas de aplicación profesional, puesto que se realiza en laboratorio, en unas condiciones estériles y con unas instalaciones especiales. Un dato para dar una idea comercial es que en España había 28 laboratorios dedicados a la producción de plantas por cultivo *in vitro* como negocio, el cultivo *in vitro* consiste en tomar un trocito de hoja, un embrión, una porción pequeña de tallo (de 0,2 a 1 milímetro) o cualquier otra parte de una planta y ponerla a cultivar en un tubo de ensayo sobre un medio acuoso nutritivo (Soto *et al.* 2002).

Lo fundamental es que se hace en unas condiciones muy controladas y totalmente estériles: utensilios, cámara de manipulación, etc., todo está desinfectado en autoclave, el cultivo *in vitro* es muy caro, entre otras cosas porque no se puede mecanizar, sólo son rentables aquellos laboratorios muy grandes y con mucho mercado, la planta ya desarrollada en el cultivo *in vitro* necesita una primera aclimatación en el paso del laboratorio al invernadero y después una segunda

aclimatación de este al campo. Los viveros grandes realizan ambas operaciones; otros sólo se encargan del primer paso (Román *et al.*, 1995).

a. Multiplicación de plántulas

- **Propagación vegetativa.-** Este tipo de propagación es lo más práctico, en la que citamos dos técnicas:
 - Micro propagación de estaquillas
 - Organogénesis de callos
- **Producción de plantas libres de virus.-** Este tipo de propagación de plantones es lo más seguro, por tratarse de una técnica compleja pero si no se cumplen las normas de asepsia fracasan, también existen dos técnicas:
 - Cultivo de meristemas
 - Micro injerto *in vitro*

Son las más seguras aplicaciones prácticas que existe en multiplicar plántulas *in vitro* (Taiariol, 1995).

b. Equipo necesario para el cultivo *in vitro*

- **Autoclave.-** Es donde se "esteriliza" todo lo que vamos a utilizar: agua, algunos nutrientes, material, etc. No se pueden meter proteínas. Es como una olla a presión, pero de mayor tamaño, donde se controla la presión y la temperatura (hasta 120°).
- **Cámara de flujo laminar.-** Es donde se realizan todas las manipulaciones con la planta. Es un habitáculo con un operario en un ambiente estéril. Se usan rayos ultravioletas para esterilizar el aire.
- **Medio de cultivo.-** Agua y nutrientes (hormonas) en un tubo de ensayo, que se tapa con un tapón. Dependiendo del material que se va a propagar, el tubo se pone vertical o un poco inclinado.
- **Planta.-** El material vegetal de partida puede ser del campo, pero esto conlleva un alto riesgo de enfermedades y contaminación, aunque se lave

mucho y bien. Lo más corriente es utilizar brotes que crecen en condiciones controlada, para que haiga menos infecciones.

- **Cámara de cultivo.**- La cámara de cultivo es una habitación de dimensiones muy variables, en la que se controlan las condiciones de luz, temperatura, humedad, variación día-noche, etc.

Son los equipos más seguras que se utilizan en las prácticas que realizan en la multiplicación de plántulas *in vitro* (Jordán, 1983).

c. Condiciones del cultivo *in vitro*

- En la cámara de flujo laminar no puede entrar material contaminado. El problema más importante en todo el proceso del cultivo *in vitro* son las contaminaciones.
- En el autoclave no se pueden meter determinadas sustancias, como vitaminas, antibióticos, ácido giberélico, sacarosa, encimas, extractos vegetales, etc., ni tampoco recipientes que no soporten altas temperaturas.
- El vidrio ha de ser de muy buena calidad para que no suministre al medio, sustancias contaminantes para la planta. Normalmente se prepara el medio y se filtra directamente. El problema es que se absorben en el filtro determinadas sustancias.
- Los reguladores de crecimiento (hormonas) son imprescindibles, ya que sin ellos no se puede hacer el medio de cultivo.
- El pH ideal es 6, pero puede oscilar entre 5,5 y 6,5.
- Se necesita agar y medio sólido 0,6-0,9%.
- El medio de cultivo realmente sólo tiene que llevar agua, fuente de energía (azúcares) y reguladores de crecimiento.
- El medio de cultivo es secreto, y se pueden tardar dos años en prepararlo.
- En la cámara de cultivo se aplican cantidades variables de luz (16-20 horas). También existen plantas que se desarrollan en la oscuridad. Las

temperaturas también varían. Lo normal son 22-26°C, aunque en ocasiones se exigen fríos de 4°C y también 28-30°C para plantas tropicales.

- Igualmente, en el éxito de esta técnica de propagación también influyen determinadas características de la planta, como el tipo, genética e incluso el tipo de implante, parte más juvenil o más adulta.
- En cuanto a los recipientes, deben permitir el intercambio de gases, pero evitar la pérdida de agua, lo que provocaría un aumento de la concentración de sales, y por tanto la muerte de la planta. De ahí la importancia del cierre.

Son algunas de las condiciones más seguras que se utilizan en la multiplicación de plántulas *in vitro* (Marcavillaca et al., 1985).

d. Sub cultivos o replicado

Cuando sembramos micro estaquillas en cultivo *in vitro*, no nos interesa que se emitan raíces ni hojas, sino que se produzca una proliferación (crecimiento) para obtener nuevas micro estaquillas. Son lo que se denominan sub cultivos (Sumida et al., 1980).

e. Fases del cultivo de meristemas

- Toma un ápice meristemático (0,2-1 mm).
- Siembra en el medio del tubo.
- Fase de proliferación: crecimiento de brotes. Sub cultivos.
- Fase de enraizamiento (cambiar el medio).
- Primera fase de aclimatación, es importante ya que la planta pueda llegar o no al campo, invernaderos, bolsas de plástico, bandejas de vidrio, etc.
- Segunda fase de aclimatación. Siempre en invernadero.
- Plantación en el campo (Marcavillaca et al., 1985).

f. Fases del cultivo de embriones

- Se desinfecta el fruto en alcohol, se flamea.
- Se coge el embrión de la semilla.

- Se inocula en el tubo.
- A las 1-2 semanas, la planta está más o menos reconocible.
- Se deja crecer y se pasa por las fases de aclimatación (**Shock, 1993**).

2.2.2 Selección del explante

Prácticamente se puede utilizar cualquier porción o parte de la planta; para iniciar los trabajos de cultivo *in vitro*, en primera instancia dicha selección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal que se trate. Generalmente, se emplean plantas sanas y vigorosas y dentro de éstas, las zonas que se encuentran en activa división, como los meristemas (**Álvaro et al., 1998**).

a. Explante

El segmento pequeño de tejido u órgano de la planta, que son usados para el inicio de cultivo *in vitro* (explante primaria) (**Román et al., 1995**).

b. Desinfección

Que la contaminación por microorganismos provoca cuantiosas pérdidas en la propagación masiva de plantas y hace ineficientes económicamente muchos procesos, así mismo, existen formas para controlar la contaminación, pero es necesario conocer los microorganismos y las fuentes que lo introducen diversos compuestos químicos se utilizan para desinfectar superficialmente los explantes y el hipoclorito de sodio (1- 3 %) y con menor frecuencia se utilizan el hipoclorito de calcio (6-12 %) y el bicloruro de mercurio (0.1-1.25 %), aunque con este compuesto por lo general se obtienen mejores resultados, es altamente tóxico y no se remueve con facilidad del explante (**Álvarez y García et al., 2005**).

Conjuntamente con los desinfectantes se pueden añadir algunas gotas de Tween 20 para reducir la tensión superficial y eliminar las burbujas que se forman en la superficie y cavidades del explante, no obstante, las concentraciones del agente esterilizante y la duración se deben escoger en

función de minimizar los daños para los explantes, y se debe tener en cuenta la especie vegetal y tipo de explante, ya que no existe un procedimiento único (Álvaro *et al.*, 1998).

2.2.3 Medios de cultivo

El medio de cultivo sintético le debe propiciar al explante (células, tejidos u órganos) los requerimientos nutricionales esenciales en proporción y dosis específicas, su efectividad depende tanto de los ingredientes básicos, como del pH del medio y del agente solidificante, aunque los reguladores de crecimiento en pequeñas cantidades aumentan, inhiben o modifican de una u otra forma cualquier proceso fisiológico del vegetal, un balance apropiado entre auxinas y citoquininas es necesario para la formación de plantas a partir de meristemos, ápices o yemas. Este balance está determinado por las concentraciones endógenas de auxinas y citoquininas presentes en el explante, las cuales dependen de la especie y del tipo de explante. Se considera que si la relación auxina/citoquinina en el medio de cultivo es favorable a la segunda, se favorece la formación de brotes y lo contrario promueve el enraizamiento y la callo génesis (Nomberto, 2001).

Usualmente en los meristemos y ápices la citoquinina endógena es baja debido a que el principal sitio de síntesis son las raíces, por lo que la adición exógena de citoquininas en los medios de establecimiento es generalizada y al contrario sucede con las auxinas, ya que las zonas de crecimiento activo, los ápices y meristemos que se emplean como material inicial para el cultivo *in vitro*, son los lugares de síntesis, se adicionan al medio de cultivo a concentraciones que oscilan entre 0.001- 10 mg/L También se han empleado en los medios de cultivo, las giberelinas (GA3), ácido abscísico, etileno y con mayor frecuencia los brasinoesteroides y oligosacarinas, que ejercen una acción similar o superior a los reguladores del crecimiento tradicionales, y además, tienen la ventaja que se adicionan en los medios de cultivo en bajas concentraciones (Hearn y Subedi, 2008).

De manera general, el medio de cultivo debe ser rico en elementos minerales, en particular el potasio debe estar en un nivel alto para una mejor multiplicación vegetativa; desde este punto de vista, el medio Murashige y Skoog es conveniente. Los meristemos se cultivan generalmente sobre medio sólido, aunque en algunos casos se utilizan medios líquidos (empleando puente de papel). El pH normalmente se sitúa entre 5,4-6,0. El contenido de sacarosa es de un 2-4%. Frecuentemente se utilizan las siguientes vitaminas: vitamina B1, piridoxina, ácido nicotínico y ácido pantoténico. Los reguladores que se suelen utilizar en bajas concentraciones (0,1-0,5 mg l⁻¹); son auxinas y citoquininas para promover la división celular; el GA3 es mucho menos utilizado (Brandle y Telmer, 2007).

a. Micro propagación

Es el proceso de multiplicar plantas in vitro. A través de la micro propagación, a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme en condiciones de asepsia (Brandle y Telmer, 2007).

b. Esterilización

Consiste en la eliminación por muerte o separación de todo organismo viviente de un material. Se utiliza autoclave o estufas a temperatura alta, también filtros bacteriológicos. La esterilización por infiltración se usa en algunas fitohormonas y vitaminas (Agramonte, 1998).

c. Patógenos

Fundamenta que el patógeno es un microorganismo que vive a expensas de células vegetales que causa daño a la planta en todo su estado fisiológico (Erkucuk *et al.*, 2009).

d. Cultivo in vitro

Fundamenta que el cultivo in vitro se define como el cultivo en un medio nutritivo, en condiciones estériles, de plantas, semillas, órganos, explantes, tejidos, células y protoplastos de plantas superiores, estas técnicas se

caracterizan porque ocurren a micro escala, sobre todo en una superficie pequeña en las que se optimizan las condiciones ambientales, en lo que se refiere a factores físicos, nutricionales y hormonales; se excluyen todos los microorganismos (hongos, bacterias y virus), así como también las plagas de las plantas superiores (insectos y nemátodos) (Erkucuk *et al.*, 2009).

e. Planta madre

Es el origen de una planta para dar nuevas plántulas, libres de enfermedad con el cultivo de los tejidos como ápice, nudos (Erkucuk *et al.*, 2009).

f. Condiciones ambientales de incubación

Este requisito se debe cumplir rigurosamente para el éxito en el establecimiento de los cultivos *in vitro*. Para ello, es conveniente que los explantes se incuben en ambientes controlados de luz (1000-5000 lux) y temperatura (20-28°C), así como de humedad relativa (70-80 %) acordes con los objetivos de trabajo. Estos efectos influyen prácticamente en todos los tipos de procesos: absorción de agua, evaporación, fotosíntesis, respiración, crecimiento, floración, cuajado del fruto, entre otros, no obstante, se debe tener en cuenta que cada cultivo tiene sus propias especificidades (Agramonte, 1998).

2.2.4 Funciones de las hormonas inductoras

Dentro de la propagación masiva de las plántulas *in vitro*, se utilizaron segmentos de hojas, protocormos y pseudobulbos (explantes, 0.5 cm²). A los explantes a multiplicarse son indispensables darles condiciones en MS, con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento (ANA/BA, ANA/GA3, ANA/BA/GA3) en diferentes dosis con la finalidad de optimizar la germinación, regeneración, desarrollo de plántulas y lograr la conservación de plántulas, se adicionaron reguladores de crecimiento (ácido naftalenacético, ANA; benciladenina, BA; ácido giberélico, GA3; y ácido abscísico, ABA) en diferentes dosis según la planta y el tipo de respuesta *in vitro*, para la inducción de callos, medios para la regeneración

de estructuras tipo protocormos y plántulas, medios de desarrollo y de mantenimiento (Agramonte, 1998).

2.2.4.1 El Ácido giberélico

El GA3 fue la primera de esta clase de hormonas en ser descubierta. Las giberelinas son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en puntas de las raíces y en semillas en desarrollo. La hormona no muestra el mismo transporte fuertemente polarizado como el observado para la auxina, aunque en algunas especies existe un movimiento basipétalo en el tallo. Su principal función es incrementar la tasa de división celular (mitosis) (Gómez, 1998).

2.2.4.2 Las Citoquininas

Pueden definirse estructuralmente como moléculas derivadas de la adenina con una cadena lateral unida al grupo amino 6 del anillo purínico. La cadena lateral puede ser de naturaleza isoprenoide o aromática. Dentro de las citoquininas isoprenoides se encuentran la zeatina, la isopenteniladenina y la dihidrozeatina. Entre las aromáticas se incluyen la benciladenina, la kinetina y la topolina. También se consideran citoquininas ciertos compuestos sintéticos derivados de la difenilurea como el CPPU y el tidiazuron, que actúan como análogos estructurales de la molécula natural y presentan una actividad muy potente (Jarma, 2008).

2.2.4.3 Las auxinas

Son utilizadas en fruticultura para la actividad de crecimiento (por división o alargamiento celular) y en particular en hojas jóvenes y en semillas en desarrollo, en condiciones de estrés hay una baja en la síntesis de auxina y un aumento en la presencia de auxinas "unidas", la aplicación de auxinas a una planta, induce a que se sinteticen auxinas naturales en el tejido aplicado, aún cuando también puede inducir la síntesis de otras hormonas,

una aplicación de auxina a alta dosis puede estimular la síntesis de etileno y causar efectos negativos de crecimiento hasta la muerte de tejido (Nomberto, 2001).

a. Tipos de auxinas

Ácido Naftilacético (ANA)

Ácido indolbutírico (AIB)

2,4-D

2,4,5-T (Nomberto, 2001).

b. Funciones de las auxinas

1. Dominancia apical.
2. Aumentar el crecimiento de los tallos.
3. Promover la división celular en el cambium vascular y diferenciación del xilema secundario.
4. Estimular la formación de raíces adventicias.
5. Estimular el desarrollo de frutos (partenocárpicos en ocasiones).
6. Fototropismo.
7. Promover la división celular.
8. Promover la floración en algunas especies.
9. Promover la síntesis de etileno (influye en los procesos de maduración de los frutos).
10. Favorece el cuaje y la maduración de los frutos.
11. Inhibe la abscisión ó caída de los frutos (Nomberto, 2001).

2.2.4.4 El agar

El principal agente solidificante utilizado en medios bacteriológicos, se disuelve completamente a 100°C y se solidifica al enfriarse a 40°C de acuerdo a su consistencia, los medios de cultivo pueden clasificarse en:

a. Líquidos

Se utilizan para el crecimiento de cultivos puros en lote. Se denominan caldos de cultivo y no tienen agar en su formulación.

b. Semisólidos

Los líquidos contienen 0.5% de agar en su formulación. Se utilizan para estudiar la movilidad de las bacterias (presencia o ausencia de flagelo).

c. Sólidos

Contienen de 1.5 a 2% de agar en su formulación, estos medios inmovilizan a las células, permitiéndoles crecer y formar masas aisladas visibles llamadas colonias, las colonias permiten al microbiólogo reconocer la pureza del cultivo; las placas que contengan más de un tipo de colonia no provienen de un cultivo puro, las placas de agar también se utilizan para la determinación de células viables (recuento en placas), de acuerdo a su composición, los medios de cultivo pueden clasificarse en:

➤ **Definidos**

Es aquél medio de cultivo del cual se conoce su composición exacta. Son muy utilizados en estudios fisiológicos. Los medios mínimos son medios definidos que únicamente le proporcionan al microorganismo los nutrientes necesarios para crecer, pero no para desarrollarse óptimamente.

➤ **Complejos**

Es aquél del cual no se conoce la composición exacta del medio, a menudo, los medios complejos emplean sangre, leche, extracto de levaduras, extracto de carne u otras sustancias muy nutritivas pero de las cuales se desconoce la composición química exacta, estos medios son muy utilizados para cultivar bacterias desconocidas o

bacterias de requerimientos nutricionales muy complejos (Marcavillaca *et al.*, 1985).

2.2.4.5 Cultivo de callo in vitro

Es el que se parte de un trozo de hoja o de tallo; bien de una planta madre de maceta o de una planta que viene de cultivo in vitro. el medio puede ser sólido o líquido, se forma entonces una estructura de callo, de la que parten brotes, o también pro embriones, que al unirse forman una estructura similar al embrión, a partir de entonces se desarrolla normalmente (Sumida *et al.*, 1980).

2.2.5 Estevia y su morfología

Es un género de plantas fanerógamas, perteneciente a la familia de las asteráceas, que tiene 407 especies entre hierbas y arbustos de la familia del girasol (Asteraceae), nativa de regiones subtropicales y tropicales de Sudamérica y Centroamérica. Una de sus especies, (*Stevia rebaudiana* B.) nombrada así por Moisés de Santiago Bertoni, conocida comúnmente como "dulce hoja", o simplemente "Estevia", es ampliamente cultivada por sus hojas dulces (Alvarado *et al.*, 1998).

Es una hierba vivaz de 40 hasta 80 cm de altura, tallo anual sub leñoso de color pardusco, sin ramificaciones durante el primer año, abundantes ramificaciones a partir del segundo, raíz pivotante poco profunda; hojas cortamente pecioladas, casi sésiles, ovaladas o lanceoladas, bordes aserrados, tomentosas, las distales agrupadas en número de tres o cuatro, color verde intenso en el envés y verde azulado y lustroso en el haz; flores hermafroditas, pequeñas, corola de color blanco, distribuidas en panículas terminales (Jordán, 1983).

a. Origen de la Estevia

Es oriunda de Paraguay, naturalizada en Brasil y Argentina (Misiones), en donde se encuentran abundantes ecotipos. Se cultiva en Japón, China, Corea,

Taiwán, Tailandia, Indonesia y Filipinas. En América es cultivada principalmente en Paraguay y Brasil, también en la Argentina, en Colombia no hay registros completos de la cantidad de Ha/s sembradas, es más, como cultivo innovador no existe aún la posición arancelaria del país con respecto a la exportación, el mercado nacional no alcanza el 5% de la producción esperada la industrialización y consumo es liderado por Japón; la industrialización también es realizada en Sur corea, China y Brasil (Jordán, 1983).

Los estudiosos admiten que es una planta auténticamente paraguaya, originaria de la región oriental del país, donde era utilizada por los indios como edulcorante y para fines medicinales. Según distintas fuentes se encuentra desde las sierras del Mbaracayú, Campos Altos del Amambay hasta el Monday, zonas de San Pedro, Capitán Bado, Yhú, Bella Vista, San Salvador, Vacá Retá, entre el río Ypané e Ybyraró, próximo al Cerro Cuarepotí, en Itacuí y en Campos de Cerro Cuatía (Shock, 1993).

El mismo autor realiza la descripción taxonómica del cultivo de estevia.

Reino	: Plantae
Subreino	: Tracheobionta
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Subclase	: Asteridae
Orden	: Asterales
Familia	: Asteraceae
Subfamilia	: Asteroideae
Tribu	: Eupatorieae
Género	: <i>Stevia</i>
N. Científico	: <i>Stevia rebaudiana</i> B.
N. Común	: Estevia o yerba dulce

b. Morfología de la planta

Es una planta anual con las siguientes características:

Raíz. Es pivotante. La raíz principal es vigorosa y profunda, las laterales muy desarrolladas, abundantes y fuertes.

Tallos. Los tallos son anual sub leñoso de color parduzco, sin ramificaciones durante el primer año, abundantes ramificaciones a partir del segundo año.

Hojas. Son hojas cortamente pecioladas, casi sésiles, ovales o lanceoladas, bordes aserrados, tomentosas, las distales agrupadas en número de tres o cuatro, color verde intenso en el envés y verde azulado y lustroso en el haz.

Inflorescencia. Son de flores hermafroditas, florece durante primavera y otoño son muy pequeños, es inflorescencia capitular.

Flores. La flor es tubular y de color blanco y no posee ningún perfume concreto, son hermafroditas, pequeñas, corola de color blanco, distribuidas en panículas terminales.

Fruto. El fruto es aquenio, es un tipo de fruto seco producido por esta planta, son monocarpelados, forman un único carpelo e indehiscentes, no se abre al madurar. Contienen una única semilla que llena el hueco del pericarpio, pero no se adhiere a éste; la combinación de fruto y semilla (Nomberto, 2001).

c. Variedades importantes

Las variedades cultivadas más importantes son:

- **La variedad Criolla o nativa paraguaya** (variedad que nosotros manejamos) es la madre de todas las variedades y dentro de esta tenemos unas 300 sub-variedades que es lo que le hace a ésta resistente y muy adaptable a diferentes condiciones agro climatológicas que presenta nuestro país. La concentración de los glicósidos de steviol de esta variedad, alcanza el 13%.
- **Las variedades Mejoradas** y reconocidas en Paraguay y el mundo como la eirete y catupyry, alcanzan niveles de 18 hasta 23%, estas solo pueden

propagarse por esquejes y no así por semillas dada la variabilidad genética que presenta el cultivo por ser una especie alógama (Nomberto, 2001).

d. Propiedades de la Estevia

Las hojas, de las cuales se extraen distintos componentes de propiedades edulcorantes, siendo los más importantes el steviósido y el rebaudiósido A, que en plantas no mejoradas alcanzan entre un 6 a 8% y 2 a 3% respectivamente. El contenido y la proporción de componentes activos es variable según la variedad, fase de desarrollo, estado de crecimiento y son las siguientes propiedades:

- ✓ Tiene 0 calorías o sea es totalmente acalórico.
- ✓ Es ideal para los diabéticos ya que regula los niveles de glucosa en la sangre y en algunos países incluso se utiliza como tratamiento para mejorar la diabetes ya que parece regular los niveles de insulina.
- ✓ Muy aconsejable para perder peso ya que reduce la ansiedad por la comida (tomar de 10 a 15 gotitas 20 minutos antes de las comidas) y al regular la insulina el cuerpo almacena menos grasas.
- ✓ Disminuye también el deseo o apetencia por tomar dulces y grasas.
- ✓ Realza el aroma de las infusiones o alimentos donde se añada.
- ✓ Retarda la aparición de la placa de caries (por eso se usa también para hacer enjuagues bucales y como componente de la pasta de dientes) Se pueden añadir una gotitas a las pasta de diente.
- ✓ Es un hipotensor suave (baja la presión arterial que esté demasiado alta)
- ✓ Es suavemente diurético.
- ✓ Mejora las funciones gastrointestinales.
- ✓ Puede ayudar en la desintoxicación del tabaco y del alcohol, ya que el té reduce el deseo hacia estos dos tóxicos.
- ✓ Previene e inhibe la reproducción de bacterias y organismos infecciosos. Mejora la resistencia frente a resfriados y gripes (Soto et al., 2002).

e. Información nutricional

Las hojas secas son las que contienen aproximadamente un 42% de sustancias hidrosolubles (por eso endulza más mezclada con líquidos), el principio activo más importante es el Estevióside, además contiene proteínas, fibra, hierro, fósforo, calcio, potasio, zinc, rutina, vitamina A y C, todos los productos de mesa, para endulzar bebidas frías o calientes como: café, té, chocolate, jugos, coladas, entre otros.

- ✓ En repostería, mermeladas, jugos, confitería, gelatinas, granolas y galletas.
- ✓ En gomas de mascar, bebidas gaseosas e hidratantes.
- ✓ En productos farmacéuticos y de belleza como labiales, cremas dentales, jarabes, etc.
- ✓ En salsas y conservas de verduras y frutas.
- ✓ En derivados de los lácteos: Yogur, kumis y helados (Solange *et al.*, 2002).

f. Otras propiedades

Restaura la salud del suelo donde se cultiva.

- ✓ Estimula el crecimiento de las raíces de los cultivos.
- ✓ Activa la habilidad reproductora de las células vegetales.
- ✓ Desintoxica la tierra de residuos agrotóxicos.
- ✓ Su cultivo es promisorio por su buen precio internacional y en ciertos países se ha convertido en reemplazo de cultivos ilícitos (Utsunomiya, *et al.*, 1977).

2.2.6 Requerimientos edafoclimáticos

a. Condiciones ideales de cultivo

La elección del terreno de cultivo deberá tenerse en cuenta ciertos aspectos, como lotes que no sean de excesiva fertilidad. Elevado contenido de materia orgánica en el suelo determina, principalmente, que las plantas se vayan en vicio y problemas de enfermedades, es conveniente hacer análisis de suelos

para determinar la cantidad de enmienda requerida; suelos con buen drenaje. La desinfección del terreno antes del sembrado es primordial y aconsejable el método de solarización así mismo se estima una densidad de plantación de entre 100.000 y 120.000 plantas/ha, ya que las distancias del cultivo convendrán adecuarlas, en cierta medida, a la mano de obra disponible en cada establecimiento y los momentos más adecuados para realizar la plantación es durante la mañana temprana y el atardecer, cuando las temperaturas no son tan elevadas, también son convenientes los días nublados y húmedos los días posteriores a una lluvia son ideales o, en caso contrario, deberá realizarse un riego previo a la plantación, asimismo, con posterioridad a la plantación deberá hacerse otro (Tairiol, 1995).

La yerba dulce necesita abundante agua, cuyo consumo puede ser entre 1000 y 1400 mm anuales, según la temperatura del lugar. Por ello, el riego complementario resulta fundamental para conseguir buenos rendimientos. A secano, en zonas con más de 800 mm, puede alcanzarse un rendimiento del orden de los 2.000 Kg/ha. Con menos de 800 mm, y si no se dispone de riego, no se recomienda la implantación de Estevia (Solange et al., 2002).

La temperatura óptima para el crecimiento es de 15 a 30°C, con medias de 20°C y media mínima de 5°C. Los límites térmicos extremos son -6°C y 43°C. Para producir hijuelos, necesita temperaturas medias superiores a los 15°C. Las heladas de baja intensidad y duración corta, son toleradas, aunque disminuyen el rendimiento hasta un 25% y es una especie que requiere días largos, y alta intensidad solar (heliofanía). Respecto a los suelos, son óptimos aquellos con pH 6,5 - 7, de baja o nula salinidad, con buen contenido de materia orgánica, de textura franco arenosa a franco, y con buena permeabilidad y drenaje (Solange et al., 2002).

b. Cuidados culturales en Estevia

Lo más aconsejable es la producción de hoja limpia de manera orgánica, tanto para abonos, fungicidas, pesticidas. Desmalezado manual. La buena calidad también depende en la parte del proceso final de un buen secado. Enseñamos a construir secadero artesanal (Sumida *et al.*, 1980).

c. Cosecha de Estevia

El rendimiento en steviósido de la materia seca obtenida es variable, dependiendo tanto de factores genéticos como ambientales, incluyendo en esto último tanto las condiciones de clima y suelo, las circunstancias meteorológicas durante la estación de crecimiento y el manejo del cultivo. Así se pueden encontrar en la bibliografía rendimientos de un 7% hasta un 20% (Solange *et al.*, 2002).

d. Rendimiento

El rendimiento por Ha es de 6 a 8 toneladas (Dependiendo de factores climáticos, altura) actualmente el kilo de hoja desecada de buena calidad está recibiendo un precio promedio de \$ 5,00 hasta \$7,00 (Dólares) (Solange *et al.*, 2002).

2.3 Hipótesis

Hp: Existen diferencias en efecto de dosis de Bencil Amino Purina (BAP) y del Acido Naftalem Acético (ANA) en la producción *in vitro* de Estevia (*Stevia rebaudiana B.*).

Ha: No existen diferencias en el efecto de dosis de Bencil Amino Purina (BAP) y del Acido Naftalem Acético (ANA) en la producción *in vitro* de Estevia (*Stevia rebaudiana B.*).

2.4 Variables de estudio

Prendimiento de yemas

Se contaron el número de yemas prendidas desde el momento de la realización de la micro propagación.

Ritmo de crecimiento

Se evaluaron el tamaño de la plántula a los 15, 30 y 45 días después de la realización de la micro propagación.

Número de hojas/plántulas

Se evaluó el número de hojas/plántula a los 20, 40 y 60 días después de la realización de la micro propagación.

Capítulo III: Metodología de la investigación

3.1 Ámbito de estudio

El manejo y conducción de la investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología, de la Facultad de Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Huancavelica.

3.1.1 Ubicación política

Región : Huancavelica.
Provincia : Acobamba.
Distrito : Acobamba.
Lugar : "Común Era" - "Laboratorio de Biotecnología - FCA - UNH".

3.1.2 Ubicación geográfica

La investigación se llevó a cabo en el centro del laboratorio de ciencias agrarias en las siguientes coordenadas:

Altitud : 3436 m.s.n.m.
Latitud Sur : 12° 50' 37".
Longitud Oeste : 74° 33' 42" del Meridiano de Greenwich.

3.1.3 Factores climáticos:

Temperatura promedio : 12° C.
Humedad relativa : 65 %.
Precipitación promedio : 750 mm/año.

Fuente: Estación experimental SENAMHI – UNH Acobamba – Huancavelica 2012.

3.1.4 Descripción del material evaluada

a. Planta madre

Se seleccionó los meristemos apicales (ápices) de la planta madre, libre de toda clase de plagas y enfermedades. La cantidad de 360 ápices. Procedente de la planta madre que está en el invernadero.

b. Materiales empleados en la investigación

Los materiales empleados durante la ejecución de la investigación fueron:

Descripción	Cant.	Etapas
Tubos de ensayo	50 und.	Preparación de medio de cultivo
Placas petri	5 und.	Preparación e introducción de explante
Beakers (100ml)	10 und.	Preparación y lavado de medio de cultivo
Beakers (1000ml)	6 und.	Preparación y lavado de medio de cultivo
Probetas (1000ml)	2 und.	Preparación y lavado de medio de cultivo
Probetas (500ml)	2 und.	Preparación y lavado de medio de cultivo
Pipetas (1ml)	3 und.	Preparación y lavado de medio de cultivo
Pipetas (10ml)	3 und.	Preparación de medio de cultivo
Matraces (10ml)	4 und.	Preparación de medio de cultivo
Mangos bisturí	2 und.	Introducción de explante
Pinzas	2 und.	Introducción de explante
Espátulas	2 und.	Preparación de medio de cultivo
Mecheros alcohol	1 und.	Introducción de explante
Frascos de vidrio	50 und.	Introducción de explante
Tijeras punta fina	1 und.	En todo el proceso
Marcadores	2 und.	Introducción de explante
Parafilm	5 und.	Introducción de explante
Bandejas	6 und.	Lavado del explante

c. Insumos empleados en la investigación

Se ha utilizado los siguientes insumos en la preparación de medios de cultivo correspondientes:

Descripción	Cantidad	Etapas
Agar	100 mg	Preparación de medio de cultivo
Agua destilada	50 lt	Preparación de medio de cultivo
Alcohol 70°	10lt	En el lavado del explante
Alcohol 90°	15lt	En todo el proceso
Acido naftalen acético (ANA)	50 mg	Preparación de medio de cultivo
Hipoclorito de sodio	7 lt	En todo el proceso
Béncil amino purina (BAP)	70 mg	Preparación de medio de cultivo

3.2 Tipo de investigación

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

3.3 Nivel de investigación

Dado que los conocimientos e información obtenidos me permiten la aplicación de una nueva tecnología, el trabajo es considerado de nivel aplicado.

3.4 Método de investigación

Se empleó el método Hipotético - Deductivo, el cual sugiere que a partir de hechos repetidos, observacionales y comparables se dedujera teorías que gobernaron esos resultados.

3.5 Diseño de investigación

Dado que el diseño de investigación constituye el plan general para obtener respuestas a las interrogantes y/o comprobar la hipótesis de investigación, se desglosó las siguientes estrategias para generar información exacta e interpretable ¿cómo contar?, ¿cómo describir?, etc.

Lugar y fecha de instalación.- Se inició con el experimento el 01 de Octubre del 2010 en el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Ciencias Agrarias - UNH.

Medios de cultivo.- Se utilizó diferentes dosis de medios de cultivo, que por sus características inductoras de enraizamiento y condiciones favorables para el explante.

Manejo de medios de cultivo.- Se realizó según los requerimientos y fenologías del cultivo; la instalación fue en forma manual empleando todos los instrumentos y la metodología necesaria de acuerdo a las normas asépticas. Las magentas sin excepciones todas recibieron el mismo cuidado y limpieza. Finalmente el trasplante fue efectuado a los 90 días después del explante.

Diseño experimental.- Se utilizó el Diseño Bloques Completamente al Azar (DBCA), con 9 tratamientos y 4 repeticiones, el cual presenta las siguientes características:

Características de la unidad experimental:

Número total de unidades experimentales	: 36
Número de ápices por frasco	: 10
Número de repeticiones	: 04
Número de tratamientos	: 09

Tratamientos:

Nº	Clave	Cantidad mg	Tratamiento
1	a1 x b1	0.05 x 0.25	T1
2	a1 x b2	0.05 x 0.50	T2
3	a1 x b3	0.05 x 0.75	T3
4	a2 x b1	0.10 x 0.25	T4
5	a2 x b2	0.10 x 0.50	T5
6	a2 x b3	0.10 x 0.75	T6
7	a3 x b1	0.15 x 0.25	T7
8	a3 x b2	0.15 x 0.50	T8
9	a3 x b3	0.15 x 0.75	T9

Factor A (ANA)	a1	0.05mg
	a2	0.10mg
	a3	0.15mg
Factor B (BAP)	b1	0.25mg
	b2	0.50mg
	b3	0.75mg

Modelo aditivo lineal.

$$Y_{ij} = M + A_i + B_j + A \times B_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ij} = Valor o rendimiento observado en el i-ésimo tratamiento, j-ésimo bloque.

M = Efecto de la media general.

A_i = Efecto del factor del i-ésimo tratamiento.

B_j = Efecto del factor del j-ésimo bloque.

$A \times B_{ij}$ = Efecto experimental del factor $A \times B$ en el i-ésimo tratamiento, j-ésimo bloque.

E_{ijk} = Efecto del error experimental en el i-ésimo tratamiento, j-ésimo bloque.

A = Factor del numero de tratamientos

B = Factor del numero de bloques.

Croquis del experimento

T \ B	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
	a1xb1	a1xb2	a1xb3	a2xb1	a2xb2	a2xb3	a3xb1	a3xb2	a3xb3
I	0.05x0.25	0.05x0.50	0.05x0.75	0.10x0.25	0.10x0.50	0.10x0.75	0.15x0.25	0.15x0.50	0.15x0.75
II	0.05x0.25	0.05x0.50	0.05x0.75	0.10x0.25	0.10x0.50	0.10x0.75	0.15x0.25	0.15x0.50	0.15x0.75
III	0.05x0.25	0.05x0.50	0.05x0.75	0.10x0.25	0.10x0.50	0.10x0.75	0.15x0.25	0.15x0.50	0.15x0.75
IV	0.05x0.25	0.05x0.50	0.05x0.75	0.10x0.25	0.10x0.50	0.10x0.75	0.15x0.25	0.15x0.50	0.15x0.75

3.6 Población

La población estuvo conformada por explantes de Estevia (10 explantes/frasco) y por cada unidad experimental (magenta).

Muestra

Las mediciones respectivas de las variables se realizaron en (10 explantes/frasco) de

cada unidad experimental y se midieron todas las variables en estudio, donde todos tuvieron las mismas oportunidades.

Muestreo

Se realizaron el muestreo al azar en las diferentes etapas de la investigación en cada unidad experimental.

3.7 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Se realizó en las distintas etapas fenológicas del cultivo (porcentaje de prendimiento, ritmo de crecimiento y número de hojas/planta) empleando un cuaderno de campo, lapicero y cámara fotográfica, los datos del laboratorio, se recopilaban a lo largo de la fenología del cultivo, en cada unidad experimental.

3.8 Procedimiento de recolección de datos

Porcentaje de prendimiento

Se contaron el número de explantes prendidas a los 8 días después de realizar la micropropagación en cada unidad experimental.

Ritmo de crecimiento

Se evaluaron la altura de la plántula a los 15, 30 y 40 días después realizar la micropropagación en cada unidad experimental.

Número de hojas/planta

Se evaluaron el número de hojas/planta a los 20, 40 y 60 días después realizar la micropropagación en cada unidad experimental.

3.9 Técnicas de procesamiento y análisis de datos

El porcentaje de prendimiento, ritmo de crecimiento y número de hojas/planta, fueron evaluadas al final del trabajo, las cuales se sometieron a análisis de varianza y pruebas de comparación de medias mas Duncan ($\alpha=0.05$) con arreglo factorial.

Capítulo IV: Resultados

4.1 Presentación de resultados

Cuadro N° 01: ANVA del efecto del ANA y BAP en el porcentaje de prendimiento a los 8 días después del trasplante

FV	GL	SC	CM	FC	FT		Stg.
					0,05	0,01	
Bloque	3	0.02036144	0.00678715	0.00026917	3.01	4.72	NS
Tratamiento	8	0.00039527	0.00004941	0.00000196	2.36	3.36	NS
A	2	0.00005647	0.00002823	0.00000112	3.40	5.61	NS
B	2	0.00005647	0.00002823	0.00000112	3.40	5.61	NS
A x B	4	40.50028234	10.12507058	0.40154565	2.78	4.22	NS
Error	24	605.16580352	25.21524181				
Total	35	645.68695550					

X = 2.12

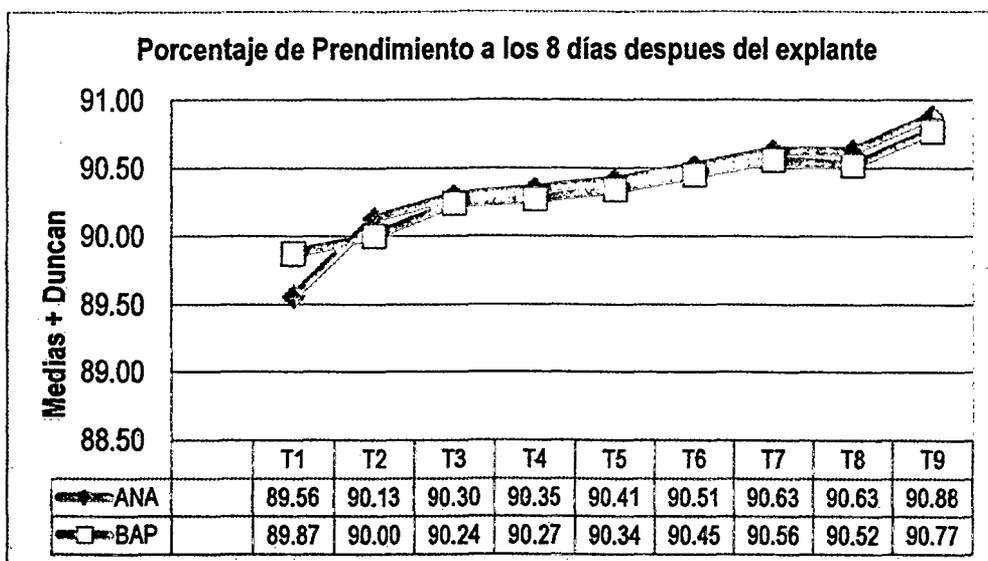
S = 5.02

CV = 2.37%

En el Cuadro N° 1: Se presentan los resultados del análisis de varianza para el efecto del de dosis de Acido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en cultivo in vitro de Stevia (*Stevia rebaudiana* B.) para el porcentaje de prendimiento a los 8 días después del trasplante, en el cual no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos y bloques. Así mismo para el efecto de A x B no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos en estudio. Por lo tanto, podemos afirmar que todos los tratamientos se comportaron de manera homogénea.

El coeficiente de variabilidad nos da un valor de 2,37, que de acuerdo a la escala de calificación según (Calzada Benza, 1983), es considerado excelente, para experimentos de esta naturaleza.

Gráfico N° 01: Porcentaje de prendimiento a los 8 días después del trasplante.



Como se observa en el **Gráfico 01**, con los resultados de la Prueba de Duncan para el porcentaje de prendimiento a los 8 días después del trasplante; podemos confirmar que no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos en estudios, tanto como para la dosis de Ácido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el cultivo in vitro de Stevia (*Stevia rebaudiana* B.).

Cuadro N° 02: ANVA del efecto del ANA y BAP en el ritmo crecimiento a los 15 días después del explante.

FV	GL	SC	CM	FC	FT		Sig.
					0.05	0.01	
Bloque	3	0.00337	0.00112	0.00016	3.01	4.72	NS
Tratamiento	8	0.06404	0.00800	0.00111	2.36	3.36	NS
A	2	0.01248	0.00624	0.00087	3.40	5.61	NS
B	2	0.00824	0.00412	0.00057	3.40	5.61	NS
A x B	4	11.66831	2.91708	0.40570	2.78	4.22	NS
Error	24	172.56708	7.19029				
Total	35	184.32352					

X = 1.13

S = 2.68

CV = 2.38%

En el Cuadro N° 1: Se presentan los resultados del análisis de varianza para el efecto del de dosis de Acido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el ritmo crecimiento a los 15 días después del explante, en el cual no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos y bloques. Así mismo para el efecto de A x B no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos en estudio. Por lo tanto podemos afirmar que todos los tratamientos se comportaron de manera homogénea.

El coeficiente de variabilidad nos da un valor de 2,38, que de acuerdo a la escala de calificación según (Calzada Benza, 1983), es considerado excelente, para experimentos de esta naturaleza.

Gráfico N° 02: Efecto del ANA y BAP en el ritmo crecimiento a los 15 días después del explante.



Como se observa en el Gráfico N° 02 con los resultados de la Prueba de Duncan podemos confirmar que no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos en estudios, obteniendo promedios entre el rango de 3.82cm a 4.42cm de altura de planta entre todos los tratamientos por efecto de dosis del ANA y BAP, en el ritmo crecimiento a los 15 días después del explante.

Cuadro N° 03: ANVA del efecto del ANA y BAP en el ritmo crecimiento a los 30 días después del explante.

FV	GL	SC	CM	FC	F _T		Sig.
					0.05	0.01	
Bloque	3	0.18139	0.06046	0.00172	3.01	4.72	NS
Tratamiento	8	0.31253	0.03907	0.00111	2.36	3.36	NS
A	2	0.28113	0.14056	0.00400	3.40	5.61	NS
B	2	0.02947	0.01473	0.00042	3.40	5.61	NS
A x B	4	56.75193	14.18798	0.40391	2.78	4.22	NS
Error	24	843.04658	35.12694				
Total	35	900.60303					

X = 2.50

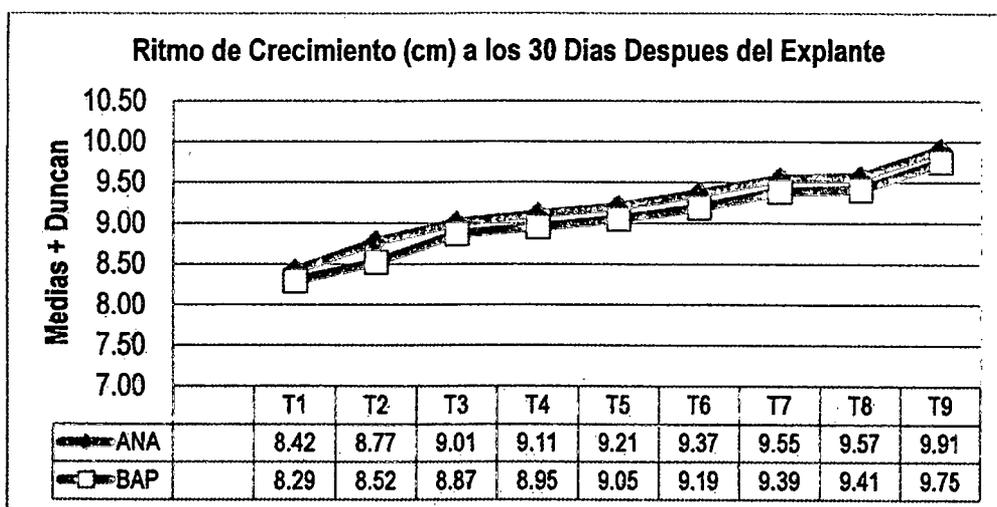
S = 5.93

CV = 2.38%

En el **Cuadro N° 03** se presentan los resultados del análisis de varianza para el efecto del efecto del ANA y BAP en el ritmo crecimiento a los 30 días después del explante, en el cual no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos y bloques. Así mismo, para el efecto de A x B no existen diferencias estadísticas. Por lo tanto, después de analizar los resultados podemos afirmar que todos los tratamientos se comportaron de manera homogénea para el efecto de crecimiento evaluado a los 30 días después del explante.

El coeficiente de variabilidad nos da un valor de 2,38, que de acuerdo a la escala de calificación según (**Calzada Benza, 1983**), es considerado excelente, para experimentos de esta naturaleza.

Grafico N° 03: Efecto del ANA y BAP en el ritmo crecimiento a los 30 días después del explante.



Como se observa en el **Grafico N° 03**, con los resultados de la Prueba de Duncan podemos confirmar que no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos en estudios, obteniendo promedios entre el rango de 8.29cm a 9.75cm de altura de planta entre todos los tratamientos por efecto de dosis del ANA y BAP, en el ritmo crecimiento a los 15 días después del explante.

Cuadro N° 04: Análisis de varianza del efecto del ANA y BAP en el ritmo crecimiento a los 40 días después del explante.

FV	GL	SC	CM	FC	FT		Sig.
					0.05	0.01	
Bloque	3	0.48197	0.16066	0.00137	3.01	4.72	NS
Tratamiento	8	0.50018	0.06252	0.00053	2.36	3.36	NS
A	2	0.42942	0.21471	0.00183	3.40	5.61	NS
B	2	0.06509	0.03255	0.00028	3.40	5.61	NS
A x B	4	188.25567	47.06392	0.40149	2.78	4.22	NS
Error	24	2813.37079	117.22378				
Total	35	3003.10312					

X = 4.56

S = 10.83

CV = 2.37%

En el **Cuadro N° 04** se presentan los resultados del análisis de varianza para el efecto del efecto del ANA y BAP en el ritmo crecimiento a los 40 días después del explante, en el cual no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos y bloques. Así mismo, para el efecto de A x B no existen diferencias estadísticas. Por lo tanto, después de analizar los resultados podemos afirmar que todos los tratamientos se comportaron de manera homogénea para el efecto de crecimiento evaluado a los 40 días después del explante.

El coeficiente de variabilidad nos da un valor de 2,37, que de acuerdo a la escala de calificación según (Calzada Benza, 1983), es considerado excelente, para experimentos de esta naturaleza.

Grafico N° 04: Efecto del ANA y BAP en el ritmo crecimiento a los 40 días después del explante.



Como se observa en el **Grafico N° 04**, con los resultados de la Prueba de Duncan podemos confirmar que no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos en estudios, obteniendo promedios entre el rango de 15.2cm a 18.00cm de altura de planta entre todos los tratamientos por efecto de dosis del ANA y BAP en el ritmo crecimiento a los 40 días después del explante.

Cuadro N° 05: ANVA del efecto del ANA y BAP en el número de hojas/planta a los 20 días después del explante.

FV	GL	SC	CM	FG	FT		Sig.
					0.05	0.01	
Bloque	3	1.14174	0.38058	0.02174	3.01	4.72	NS
Tratamiento	8	0.38638	0.04830	0.00276	2.36	3.36	NS
A	2	0.27430	0.13715	0.00783	3.40	5.61	NS
B	2	0.02892	0.01446	0.00083	3.40	5.61	NS
A x B	4	28.83316	7.20829	0.41169	2.78	4.22	NS
Error	24	420.21652	17.50902				
Total	35	450.88102					

X = 1.76

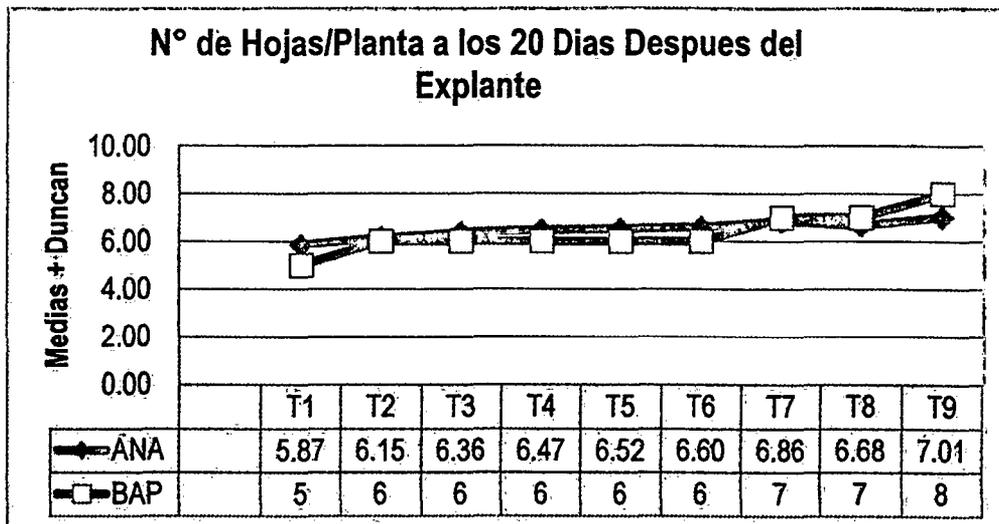
S = 4.18

CV = 2.38%

En el Cuadro N° 05, se presentan los resultados del análisis de varianza para el efecto del efecto del ANA y BAP en el número de hojas por planta a los 20 días después del explante, en el cual no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos y bloques. Así mismo, para el efecto de A x B no existen diferencias estadísticas. Por lo tanto después de analizar los resultados podemos afirmar que todos los tratamientos se comportaron de manera homogénea para el efecto de crecimiento evaluado a los 20 días después del explante.

El coeficiente de variabilidad nos da un valor de 2,38, que de acuerdo a la escala de calificación según (Calzada Benza, 1983), es considerado excelente, para experimentos de esta naturaleza.

Grafico N° 05: Efecto del ANA y BAP en el número de hojas/planta a los 20 días después del explante.



Como se observa en el Grafico N° 05, con los resultados de la Prueba de Duncan podemos confirmar que no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos en estudios, obteniendo promedios entre el rango de 5.00 a 8.00 hojas/planta entre todos los tratamientos por efecto de dosis del ANA y BAP en el ritmo crecimiento a los 20 días después del explante.

Cuadro N° 06: ANVA del efecto del ANA y BAP en el número de hojas/planta a los 40 días después del explante.

FV	GL	SC	CM	FC	FT		Sig.
					0.05	0.01	
Bloque	3	0.32298	0.10766	0.00360	3.01	4.72	NS
Tratamiento	8	1.24060	0.15507	0.00519	2.36	3.36	NS
A	2	0.89500	0.44750	0.01497	3.40	5.61	NS
B	2	0.13154	0.06577	0.00220	3.40	5.61	NS
A x B	4	49.46406	12.36602	0.41360	2.78	4.22	NS
Error	24	717.56429	29.89851				
Total	35	769.61847					

X = 2.29

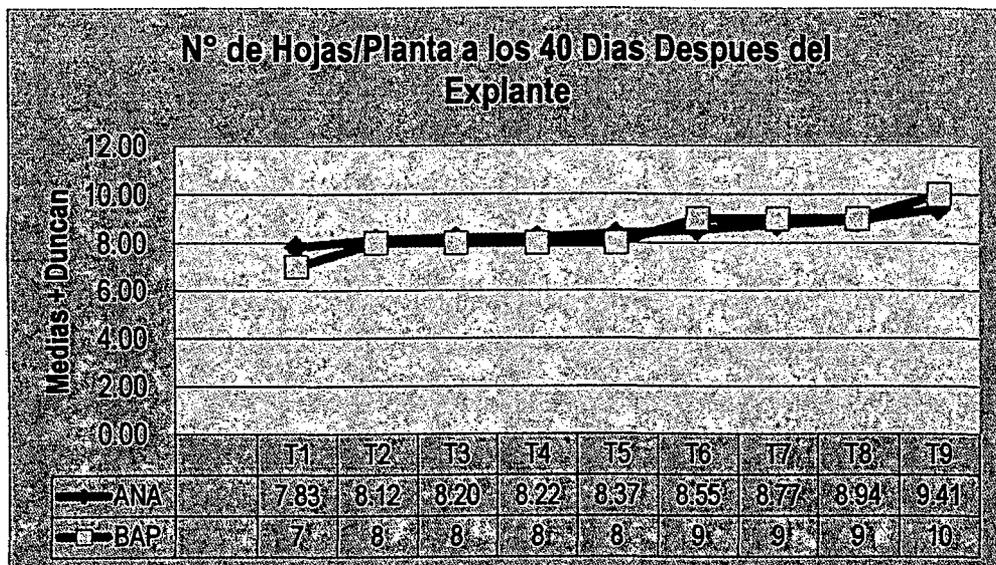
S = 5.47

CV = 2.39%49

En el Cuadro N° 06 se presentan los resultados del análisis de varianza para el efecto del efecto del ANA y BAP en el número de hojas por planta a los 40 días después del explante, en el cual se observa que no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos y bloques. Así mismo, para el efecto de A x B no existen diferencias estadísticas. Por lo tanto, después de analizar los resultados podemos afirmar que todos los tratamientos se comportaron de manera homogénea para el efecto de crecimiento evaluado a los 40 días después del explante.

El coeficiente de variabilidad nos da un valor de 2,39, que de acuerdo a la escala de calificación según (Calzada Benza, 1983), es considerado excelente, para experimentos de esta naturaleza.

Grafico N° 06: Efecto del ANA y BAP en el número de hojas/planta a los 40 días después del explante.



Como se observa en el Grafico N° 06, con los resultados de la Prueba de Duncan podemos confirmar que no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos en estudios, el rango de promedios 7.00 a 9.41 hojas/planta entre todos los tratamientos por efecto de dosis del ANA y BAP a los 20 días después del explante.

Cuadro N° 07: ANVA del efecto del ANA y BAP en el número de hojas/planta a los 60 días después del explante.

FV	GL	SC	GM	FC	FT		Sig.
					0.05	0.01	
Bloque	3	0.03440	0.01147	0.00011	3.01	4.72	NS
Tratamiento	8	0.43698	0.05462	0.00054	2.36	3.36	NS
A	2	0.32457	0.16229	0.00161	3.40	5.61	NS
B	2	0.05757	0.02878	0.00029	3.40	5.61	NS
A x B	4	161.80485	40.45121	0.40074	2.78	4.22	NS
Error	24	2422.57553	100.94065				
Total	35	2585.23390					

X = 4.23

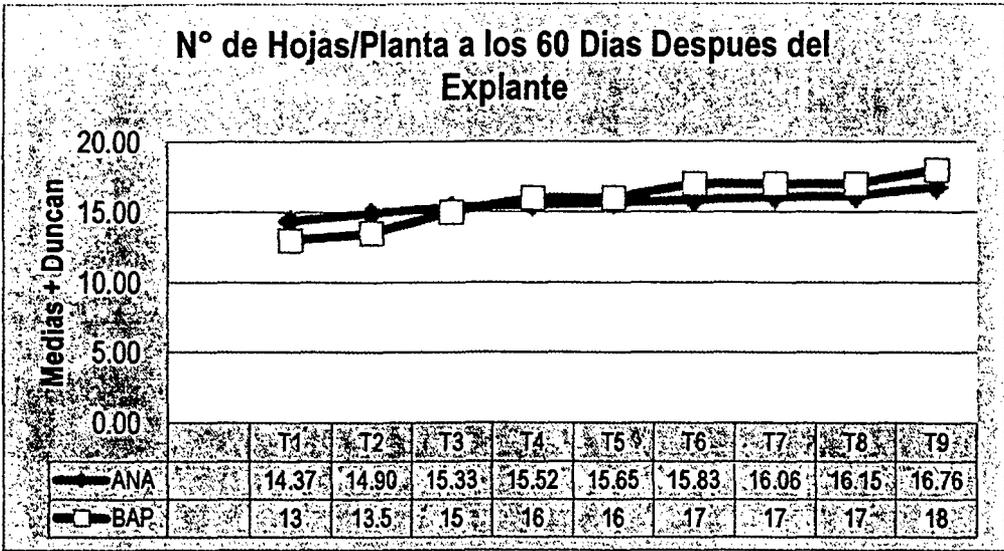
S = 10.05

CV = 2.37%

En el Cuadro N° 07, se presentan los resultados del análisis de varianza para el efecto del efecto del ANA y BAP en el número de hojas por planta a los 60 días después del explante, en el cual se observa que no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos y bloques. Así mismo, para el efecto de A x B no existen diferencias estadísticas. Por lo tanto, después de analizar los resultados podemos afirmar que todos los tratamientos se comportaron de manera homogénea para el efecto de crecimiento evaluado a los 60 días después del explante.

El coeficiente de variabilidad nos da un valor de 2,37, que de acuerdo a la escala de calificación según (Calzada Benza, 1983), es considerado excelente, para experimentos de esta naturaleza.

Grafico N° 07: Efecto del ANA y BAP en el número de hojas/planta a los 60 días después del explante.



Como se observa en el Grafico N° 07, con los resultados de la Prueba de Duncan podemos confirmar que no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos en estudios, obteniendo promedios entre el rango de 13.00 a 18.00 hojas/planta entre todos los tratamientos por efecto de dosis del ANA y BAP en el ritmo crecimiento a los 60 días después del explante.

4.2 Discusión

Efecto de dosis de Acido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el porcentaje de prendimiento a los 8 días después del explante.

El efecto de la aplicación de dosis de Acido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el porcentaje de prendimiento a los 8 días después del explante, en donde se evaluó diferentes dosis de ANA y BAP. Como se puede apreciar en el **Cuadro N° 01**, no existen diferencias estadísticas en el porcentaje de prendimiento en el cultivo de Stevia (*Stevia rebaudiana* B.), explicado posiblemente que las diferentes dosis altas aplicadas no influye en el prendimiento. En el **Grafico N° 01**, se puede confirmar que no existen diferencias estadísticas entre las dosis en estudio, donde todos los tratamientos mostraron comportamientos homogéneos, así mismo el afecto A x B.

El coeficiente de variación (2.37 %), registrado para esta fecha de evaluación, está calificado según Calzada Benza como excelente, lo que indica que, los errores de medición y las desviaciones producidos por el manejo experimental fueron controlados eficientemente (**Cuadro N° 01**).

Efecto de dosis de Acido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el ritmo de crecimiento a los 15 días después del explante.

El efecto de la aplicación de dosis de Acido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el ritmo de crecimiento a los 15 días después del explante, en donde se evaluó diferentes dosis de ANA y BAP. Como se puede apreciar en el **Cuadro N° 02**, no existen diferencias estadísticas, explicado posiblemente que las diferentes dosis altas aplicadas no influye en el crecimiento. En el **Grafico N° 02**, se puede confirmar que no existen diferencias estadísticas entre las dosis en estudio, donde todos los tratamientos mostraron comportamientos homogéneos con promedios que fluctúan T_1 : 3.82; T_1 :3.82 y T_9 : 4.43; T_9 : 4.40 para ANA y BAP respectivamente, así mismo el afecto A x B.

El coeficiente de variación (2.38%), está calificado según Calzada Benza como excelente, lo que indica que, los errores de medición y las desviaciones producidos por el manejo experimental fueron controlados eficientemente (**Cuadro N° 02**).

Efecto de dosis de Acido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el ritmo de crecimiento a los 30 días después del explante.

El efecto de la aplicación de dosis de Acido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el ritmo de crecimiento a los 30 días después del explante, en donde se evaluó diferentes dosis de ANA y BAP. Como se puede apreciar en el **Cuadro N° 02**, no existen diferencias estadísticas, explicado posiblemente que las diferentes dosis altas aplicadas no influye en el crecimiento. En el **Grafico N° 03**, se puede confirmar que no existen diferencias estadísticas entre las dosis en estudio, donde todos los tratamientos mostraron comportamientos homogéneos con promedios que fluctúan T₁: 8.29; T₁: 8.42 y T₉: 9.75; T₉: 9.91 para ANA y BAP respectivamente, así mismo el afecto A x B.

El coeficiente de variación (2.38%), está calificado en la según Calzada Benza como excelente, lo que indica que los errores de medición y las desviaciones producidos por el manejo experimental fueron controlados eficientemente (**Cuadro N° 03**).

Efecto de dosis de Acido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el ritmo de crecimiento a los 40 días después del explante.

El efecto de la aplicación de dosis de Acido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el ritmo de crecimiento a los 40 días después del explante, en donde se evaluó diferentes dosis de ANA y BAP. Como se puede apreciar en el **Cuadro N° 04**, no existen diferencias estadísticas, explicado posiblemente que las diferentes dosis altas aplicadas no influye en el crecimiento. En el **Grafico N° 04**, se puede confirmar que no existen diferencias estadísticas entre las dosis en estudio, donde todos los tratamientos

mostraron comportamientos homogéneos con promedios que fluctúan T₁: 15.23; T₁: 15.46 y T₉: 17.88; T₉: 18.02 para ANA y BAP respectivamente, así mismo el afecto A x B.

El coeficiente de variación (2.37%), está calificado según Calzada Benza como excelente, lo que indica que, los errores de medición y las desviaciones producidos por el manejo experimental fueron controlados eficientemente (**Cuadro N° 04**).

Efecto de dosis de Ácido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el número de hojas/planta a los 20 días después del explante.

El efecto de la aplicación de dosis de Acido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el número de hojas/planta a los 20 días después del explante, en donde se evaluó diferentes dosis de ANA y BAP. Como se puede apreciar en el **Cuadro N° 05**, no existen diferencias estadísticas, explicado posiblemente que las diferentes dosis altas aplicadas no influye en el desarrollo de hojas. En el **Grafico N° 05**, se puede confirmar que no existen diferencias estadísticas entre las dosis en estudio, donde todos los tratamientos mostraron comportamientos homogéneos con promedios que fluctúan T₁: 5.00; T₁: 5.87 y T₉: 7.01; T₉: 8.00 para ANA y BAP respectivamente, así mismo el afecto A x B.

El coeficiente de variación (2.38%), está calificado según Calzada Benza como excelente, lo que indica que los errores de medición y las desviaciones producidos por el manejo experimental fueron controlados eficientemente (**Cuadro N° 05**).

Efecto de dosis de Acido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el número de hojas/planta a los 40 días después del explante.

El efecto de la aplicación de dosis de Ácido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el número de hojas/planta a los 40 días después del explante, en donde

se evaluó diferentes dosis de ANA y BAP. Como se puede apreciar en el **Cuadro N° 06**, no existen diferencias estadísticas, explicado posiblemente que las diferentes dosis altas aplicadas no influye en el desarrollo de hojas. En el **Grafico N° 06**, se puede confirmar que no existen diferencias estadísticas entre las dosis en estudio, donde todos los tratamientos mostraron comportamientos homogéneos con promedios que fluctúan T₁: 7.00; T₁: 7.83 y T₉: 9.41; T₉: 10.00 para ANA y BAP respectivamente, así mismo el afecto A x B.

El coeficiente de variación (2.39%), está calificado según Calzada Benza como excelente, lo que indica que los errores de medición y las desviaciones producidos por el manejo experimental fueron controlados eficientemente (**Cuadro N° 06**).

Efecto de dosis de Ácido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el número de hojas/planta a los 60 días después del explante.

El efecto de la aplicación de dosis de Ácido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el número de hojas/planta a los 60 días después del explante, en donde se evaluó diferentes dosis de ANA y BAP. Como se puede apreciar en el **Cuadro N° 07**, no existen diferencias estadísticas, explicado posiblemente que las diferentes dosis altas aplicadas no influye en el desarrollo de hojas. En el **Grafico N° 07**, se puede confirmar que no existen diferencias estadísticas entre las dosis en estudio, donde todos los tratamientos mostraron comportamientos homogéneos con promedios que fluctúan T₁: 13.00; T₁: 14.37 y T₉: 18.00; T₉: 16.76 para ANA y BAP respectivamente, así mismo el afecto A x B.

El coeficiente de variación (2.37%), está calificado según Calzada Benza como excelente, lo que indica que los errores de medición y las desviaciones producidos por el manejo experimental fueron controlados eficientemente (**Cuadro N° 07**).

Conclusiones

Que las dosis de Ácido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) aplicados para en el porcentaje de prendimiento a los 8 días después del explante, no difieren una de otra, ya que no se encontraron diferencias estadísticas, explicado posiblemente que tanto las altas dosis como las bajas dosis mostraron comportamientos homogéneos, así mismo el afecto AxB.

La evaluación de la aplicación de dosis de Ácido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el ritmo de crecimiento a los 15, 30 y 40 días después del explante, en donde se evaluó las dosis de ANA y BAP. En la cual, no se encontró diferencias estadísticas, explicado posiblemente que las diferentes dosis aplicadas no influye en el crecimiento. Donde todos los tratamientos mostraron comportamientos homogéneos con promedios homogéneos en las diferentes fechas de evaluación.

La evaluación de la aplicación de dosis de Ácido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el número de hojas por planta a los 20, 40 y 60 días después del explante, en donde se evaluó las dosis de ANA y BAP. En la cual no se encontró diferencias estadísticas, explicado posiblemente que las diferentes dosis aplicadas no influye en el crecimiento. Donde todos los tratamientos mostraron comportamientos homogéneos con promedios homogéneos en las diferentes fechas de evaluación.

Que las diferentes dosis de Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP), no influyen en el porcentaje de prendimiento, ritmo de crecimiento y numero de hojas por planta, demostrando que el cultivo in vitro de Stevia se puede realizar con dosis menores a los trabajos en la investigación.

Recomendaciones

Se recomienda realizar experimentos similares evaluando dosis menores de Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP), hasta su instalación en campos definitivos.

Realizar experimentos similares evaluando por separado tanto el Naftalem Acético (ANA) y el Bencil Amino Purina (BAP).

Realizar experimentos en otras plantas aromáticas y aprovechar la diversidad de la zona con muchas propiedades en beneficio de la humanidad.

Emplear plantas con propiedades diuréticas, aromáticas y beneficiosas para la salud y cambiar el uso indiscriminado de medicamentos farmacológicos.

Referencia bibliográfica

1. **Agramonte, 1998)** Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología - Santa Clara: IBP, 390 p.
2. **Alvarado et al., 1998)** Evaluación de un sistema de producción in Vitro y en invernadero de plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni. 2008. Tesis Ingeniero Agropecuario, Escuela Politécnica del ejército, Carrera de Ciencias Agropecuarias (IASA I). Sangolquí – Ecuador. 102p.
3. **Álvarez y García et al., 2005)** Cultivo *In vitro* de las Plantas Superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. pp: 66-67, 98-99, 112-117, 128-133.
4. **Álvaro et al., 1998)** Informe sobre viaje al Japón para observar la producción, comercialización e industrialización de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni. Asunción.
5. **Brandle y Telmer, 2007)** Aplicación del Sistema Autotrófico Hidropónico SHA (Técnica argentina) en variedades mejoradas del Ecuador, para la obtención de semilla prebásica de papa. Quito Ecuador. 6p..
6. **Erkucuk et al., 2009)** In vitro Plant Regeneration from Leaf Explants of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Z. Pflanzphysiol. Bd. 93. S. 337-343. 1979.
7. **Gómez R., 1998)** Citocininas y ácido jasmónico en la morfogénesis *in vitro*. Sección Cultivo de Tejidos. Resumen, p. 92-93.
8. **Guerra y Ramírez et al., 1998)** *Stevia rebaudiana* Bert.: uma revisao. Ciencia e Cultura 29 (11) 1240-1248. II Seminario Brasileiro sobre *Stevia rebaudiana* (Bert.)Bertoni Resumos ITAL Campinas 9/82. Instituto de Tecnología de Alimentos, Sao Paulo.
9. **Hearn y Subedi, 2008)** Experimental Cultivation of Rebaudi's Stevia in California. Agronomy Prog No. 122. Univ, of California, Davis.
10. **Jaitak et al., 2008)** Studies on the cultivation of *Stevia rebaudiana* Bert. Determination of stevioside II. Journal of the Pharmaceutical Society of Japan (12):1501-1503.

11. **Jarma, 2008)** Planta endulzante con mucho futuro. Diario La Prensa. Nicaragua. Jueves 14 de abril de 2005.
12. **Jeppesen et al., 2000)** Biotechnology and Genetic Diversity. CSI, San Francisco, California, E.U.A.
13. **Jordán M., 1983)** La propagación de Estevia (*Stevia rebaudiana* B.) Primer Simposio Nacional de la Stevia Julio 1983, Asunción, Paraguay, 29 p.
14. **Marcavillaca M.C.; Divo de Sesar M. y Villela F. (1985)** Micropropagación "In-Vitro" de (*Stevia rebaudiana* B.) por medio de segmentos nodales y meristemas.
15. **Nomberto, 2001)** Efecto de las Auxinas y Citocininas en la inducción de callos y regeneración, in vitro. Oficina General de Promoción y Desarrollo de la Investigación (OGPRODEIN) – UNT.
16. **Román et al., 1995)** Taxonomía e biología da reprodução de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. I Seminario Brasileiro sobre *Stevia rebaudiana* Bertoni. IV 1. Resumos ITAL Campinas 9/82. Instituto de Tecnología de Alimentos, Sao Paulo. Pagliosa ESPE, Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias (IASA I) 34.
17. **Shock, 1993)** Reunión de Fisiología Vegetal. Bariloche, Noviembre de 1993.
18. **Solange E.; Pereira, J.; Ramalho, A.; Arbex, N.; Cardoso, M. y Alves, O. (2002)** Reguladores de crecimiento e tipos de explantes. Ciencia e Agro tecnologia: 301-308.
19. **Soto et al. 2002)** Extracción de los principios edulcorantes de la (*Stevia rebaudiana* B.) Revista de Ciencias Agrarias y Tecnología de los Alimentos 20:5-9.
20. **Sumida et al., 1980)** Studies on (*Stevia rebaudiana* B.) as a new possible crop for sweetening resource in Japan. J. Cent. Agric. Exp. Sta. 31, 1-71.
21. **Tadhani et al., 2007)** Caa-Jhee A wild shrub native to Paraguay (*Stevia rebaudiana* Bert.) September. Typed Material. STICA, Paraguay.
22. **Taiariol, 1995)** Propagación vegetativa de (*Stevia rebaudiana* B.). Tesis Ingeniero Agrónomo, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
23. **Utsunomiya, et al. (1977)** Cultivation of Stevia Containing Sweetening Agents. Nogyo Oyobi Engei 52 (4):543-547.

61

Artículo científico

**EFFECTO DE DOSIS DE ACIDO NAFTALEM ACÉTICO (ANA) Y BENCIL AMINO
PURINA (BAP) EN CULTIVO IN VITRO DE STEVIA (*Stevia rebaudiana* B.)**

**EFFECT OF DOSE OF ACID NAFTALEM ACETIC ACID (NAA) AND BENZYL
AMINO PURINA (BAP) IN IN VITRO CULTIVATION OF *stevia* (*Stevia
rebaudiana* B.)**

Kique CONDORI LAURENTE

Rolando PORTA CHUPURGO

RESUMEN

El presente estudio de investigación, se realizó en la Ciudad Universitaria Común Era del distrito de Acobamba, provincia de Acobamba, departamento de Huancavelica en donde Se describe una metodología para el establecimiento, la multiplicación y la obtención in vitro de estevia (*stevia rebaudiana* B.), El objetivo fue Determinar una dosis adecuada de medio de cultivo para la producción de Estevia, Obtener plantas libres de enfermedad y Obtener plántulas vigorosas (tamaño, hoja). Se utilizaron como explantes iniciales yemas apicales en las diferentes dosis de de Ácido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP). Llegando a evaluar el porcentaje de prendimiento a los 8 días después del explante, no difieren una de otra, ya que no se encontraron diferencias estadísticas mostraron comportamientos homogéneos, en el ritmo de crecimiento a los 15, 30 y 40 días después del explante, no se encontró diferencias estadísticas, donde todos los tratamientos mostraron comportamientos homogéneos en las diferentes fechas de evaluación, en el número de hojas por planta a los 20, 40 y 60 días después del explante. Que las diferentes dosis de Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP), no influyen en el porcentaje de prendimiento, ritmo de crecimiento y numero de hojas por planta, demostrando que el cultivo in vitro de Stevia se puede realizar con dosis menores a los trabajos en la investigación.

Palabras clave: micropropagación, meristemo apical, in-vitro.

Abstract

This research study was conducted at the University City district was common of Acobamba province of Acobamba, department of Huancavelica in describing a methodology for the establishment, multiplication, and obtaining in vitro of stevia (*Stevia rebaudiana* B.), The objective of this study was to determine an appropriate dose of culture medium for the production of Stevia, get free plants disease and plantlets vigorous (size, sheet). Explants were used as initial apical buds in the different doses of Acid Naftalem acetic acid (NAA) and benzyl Amino Purina (BAP). Coming to assess the percentage of engraftment at 8 days after of the explant, do not differ from one another, since there were no statistical differences were homogeneous behaviors, in the pace of growth at 15, 30 and 40 days after the explant, no difference was found statistics, where all treatments showed homogeneous behaviors in the different dates of evaluation, In the number of leaves per plant at 20, 40 and 60 days after the explant. The different doses of Naftalem acetic acid (NAA) and benzyl Amino Purina (BAP), do not affect the percentage of germination, growth rate and number of leaves per plant, demonstrating that the in vitro cultivation of Stevia can be performed with smaller doses to the work of the research.

Key Words: micropropagation, apical meristem, in-vitro.

INTRODUCCIÓN

La Estevia (*Stevia rebaudiana* B.) es una planta perenne, semi-arbustiva pertenece a la familia de las Asteraceae, originaria del noreste de Paraguay, en los límites con Brasil, donde crece en estado silvestre (Taiariol, 1995; Megeji *et al.*, 2005); sus hojas contienen edulcorantes, esteviósidos y rebaudiósidos, que se estima poseen un poder endulzante que varía de 100 a 400 veces mayor que la sacarosa (Bespalhok *et al.*, 1993; Bespilhok y Hattori, 1997; Soto y Del Valle, 2002). Esta capacidad endulzante ha conducido a considerarla como una buena alternativa para reemplazar edulcorantes que han sido cuestionados frecuentemente por su carácter artificial y sus efectos nocivos para la salud

humana en largo plazo, como la sacarina, el aspartame y al acesulfame-K, entre otros (Taiariol, 1995). La reproducción sexual de Estevia (*Stevia rebaudiana* B.), presenta ciertas desventajas que pueden afectar de forma negativa la eficiencia del cultivo como son la alta heterogeneidad de las poblaciones resultantes de sus semillas, la baja eficiencia de la germinación debido al alto porcentaje de semillas estériles y la ineficiencia de la recolección de la semilla por la desuniformidad en la floración y la maduración de la misma. Esta situación ha propiciado el uso de semilla vegetativa para la siembra de cultivos comerciales, la cual no está exenta de problemas debido a las bajas tasas de multiplicación por estacas, lo que ha propiciado la propagación *in vitro* de Estevia (*Stevia rebaudiana* B.), a partir de ápices meristemáticos y obtenidos de plantas madres, fueron establecidos sobre medio de cultivo sólido de Murashige y Skoog (1962) diluido a la mitad (1/2MS) suplementado con (en mg L⁻¹) sacarosa (30,000), myo-inositol (100), tiamina HCl (0.4) y TC-Agar (Sigma). El pH del medio fue ajustado a 5.7 - 5.8 previo a la adición del Agar y esterilizado a 121 °C y 1.1 kg cm⁻² por 20 minutos. Con el fin de determinar el mejor tratamiento para el prendimiento de nuevas plantas, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones (0.05, 0.10 y 0.15 mg L⁻¹) de Bencil Amino Purina (BAP) combinadas con tres concentraciones (0.25, 0.50 y 0.75 mg L⁻¹) de Ácido Naftalen Acético (ANA) para un total de 36 unidades experimentales, estableciendo 30ml de medio de cultivo, independientemente suplementado con los tratamientos mencionados, 10 ápices de explantes fueron establecidos por cada unidad experimental, los cuales fueron sellado con Parafilm. Para determinar el efecto de las concentraciones de BAP en combinación con ANA sobre el prendimiento, altura de planta, número de hoja, porcentaje de contaminación en los tratamientos que indujeron los mayores niveles de formación de cada tratamiento. Los agricultores de la zona no tienen un patrón establecido para estas prácticas a pesar de la diversidad de sistemas de manejo de los fertilizantes, especialmente en el uso medios de cultivo en micro propagación *in vitro* de plantas. Al hacer uso de estas fuentes orgánicas, se trata fundamentalmente de asegurar que las plantas puedan multiplicarse libres de cualquier microorganismo y patógeno nocivo, así como proporcionar al cultivo las sustancias que favorecen

el crecimiento y desarrollo. Dentro de un concepto de cultivo *in vitro*, es importante considerar dos aspectos fundamentales; preparación de medios de cultivo adecuados para la instalación de meristemas y otros; a partir de este favorecer la multiplicación de plantas libres de cualquier enfermedad o patógeno nocivo que pueden desfavorecer el desarrollo de este y lo más importante que la Estevia es comercial en el mercado local, regional, nacional y internacional, lo cual hace que este cultivo sea una alternativa de producción en nuestro país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Como fuente de explantes se usaron plantas de estevia, adquiridas en un cultivo de ambiente libre donde se llevó la planta madre a un invernadero, logrando plantar en una masetta, llegando a adquirir las yemas apicales de la estevia, estas fueron llevadas al laboratorio para realizar el proceso de lavado, durante 30 minutos, posteriormente se dejó secar en un papel platino.

Establecimiento y multiplicación *in vitro*. La desinfección de los explantes (yemas apicales) provenientes de plantas creciendo en invernadero, se llevó a cabo siguiendo el protocolo que se describe a continuación: un lavado inicial con abundante agua de grifo, luego en condiciones asépticas se lavó con agua destilada y esterilizada, se sumergieron en alcohol de 60° durante 30 segundos y finalmente en hipoclorito de sodio durante 10 minutos a concentraciones de 1,5% las yemas apicales. Se realizaron como mínimo 3 enjuagues con agua destilada estéril antes de la siembra *in vitro*. Los tratamientos evaluados para el establecimiento y la multiplicación, se describen a continuación. En todos los casos se usó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog), ANA (Ácido Naftaleno Acético), BAP (Bencil Amino Purina), ajustando el pH a 5,0 antes de esterilizar por autoclave. En cada uno de los tratamientos se utilizó 09 yemas apicales por frasco de vidrio. Las condiciones de experimentación fueron foto período de 16 horas/día (28-35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 22 ± 2 °C. Los indicadores del efecto de los reguladores de crecimiento considerados fueron: número de explantes vivos y muertos para la etapa de establecimiento; en la multiplicación se evaluó el porcentaje de prendimiento, número de hojas por planta a los 20, 40 y 60 y ritmo de crecimiento

a los 15, 30 y 40 días después del explante. Los datos fueron registrados a los 08 días de cultivo.

Inducción y multiplicación de cultivo invitro. Para la inducción de la yema apical se utilizaron plantas madres de estevia. De las plantas se tomaron la yema apical de las plantas madres más jóvenes y vigorosas. En todos los tratamientos se emplearon cuatro frascos de vidrio con diez yemas apicales por cada una, el experimento se realizó por cuatruplicado. Para estudiar el efecto de ANA y BAP para los tratamientos hormonales sobre la multiplicación invitro de la yema apical, estos fueron desarrollándose en el frasco de vidrio.

Análisis estadísticos. Los datos obtenidos se procesaron estadísticamente mediante análisis de varianza (ANVA). Que las diferentes dosis de Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP), no influyen en el porcentaje de prendimiento, ritmo de crecimiento y número de hojas por planta, demostrando que el cultivo in vitro de Stevia se puede realizar con dosis menores a los trabajos en la investigación.

RESULTADOS

Efecto de Dosis de ANA, BAP y multiplicación in vitro.

Para la obtención de plantas in vitro de estevia, necesarias para la inducción de yemas apicales a partir de la planta madre, se evaluaron nueve (09) tratamientos buscando la dosis adecuada para la multiplicación de plantulas a partir de yemas apicales. Se evaluaron el comportamiento del ácido naftalem acético y bencil amino purina en sus

Inducción y multiplicación de yema apical. Durante la fase de inducción de la yema apical, de los nueve tratamientos evaluados inicialmente, se encontró que en el porcentaje de prendimiento el comportamiento fue homogéneo, el análisis estadístico aplicado no mostró diferencias significativas entre estos nueve tratamientos.

DISCUSIÓN

Efecto de dosis de Ácido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el porcentaje de prendimiento a los 8 días después del explante. El efecto de la aplicación de dosis de Ácido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el porcentaje de prendimiento a los 8 días después del explante, en donde se evaluó diferentes dosis de ANA y BAP. Como se puede apreciar en el Cuadro N° 01, no existen diferencias estadísticas en el porcentaje de prendimiento en el cultivo de Stevia (*Stevia rebaudiana* B.), explicado posiblemente que las diferentes dosis altas aplicadas no influye en el prendimiento. En el Grafico N° 01, se puede confirmar que no existen diferencias estadísticas entre las dosis en estudio, donde todos los tratamientos mostraron comportamientos homogéneos así mismo el afecto A x B. El coeficiente de variación (2.37 %), registrado para esta fecha de evaluación, está calificado en la según Calzada Benza como excelente, lo que indica que los errores de medición y las desviaciones producidos por el manejo experimental fueron controlados eficientemente. Efecto de dosis de Acido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el ritmo de crecimiento a los 15 días después del explante. El efecto de la aplicación de dosis de Acido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el ritmo de crecimiento a los 15 días después del explante, en donde se evaluó diferentes dosis de ANA y BAP. Como se puede apreciar en el Cuadro N° 02, no existen diferencias estadísticas, explicado posiblemente que las diferentes dosis altas aplicadas no influye en el crecimiento. En el Grafico N° 02, se puede confirmar que no existen diferencias estadísticas entre las dosis en estudio, donde todos los tratamientos mostraron comportamientos homogéneos con promedios que fluctúan T_1 : 3.82; T_1 :3.82 y T_9 : 4.43; T_9 : 4.40 para ANA y BAP respectivamente, así mismo el afecto A x B. El coeficiente de variación (2.38%), está calificado en la según Calzada Benza como excelente, lo que indica que los errores de medición y las desviaciones producidos por el manejo experimental fueron controlados eficientemente. Efecto de dosis de Ácido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el ritmo de crecimiento a los 30 días después del explante. El efecto de la aplicación de dosis de Acido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino

Purina (BAP) en el ritmo de crecimiento a los 30 días después del explante, en donde se evaluó diferentes dosis de ANA y BAP. Como se puede apreciar en el Cuadro N° 02, no existen diferencias estadísticas, explicado posiblemente que las diferentes dosis altas aplicadas no influye en el crecimiento. En el Grafico N° 03, se puede confirmar que no existen diferencias estadísticas entre las dosis en estudio, donde todos los tratamientos mostraron comportamientos homogéneos con promedios que fluctúan T_1 : 8.29; T_1 : 8.42 y T_9 : 9.75; T_9 : 9.91 para ANA y BAP respectivamente, así mismo el efecto A x B. El coeficiente de variación (2.38%), está calificado en la según Calzada Benza como excelente, lo que indica que los errores de medición y las desviaciones producidos por el manejo experimental fueron controlados eficientemente. Efecto de dosis de Ácido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el ritmo de crecimiento a los 40 días después del explante. El efecto de la aplicación de dosis de Ácido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el ritmo de crecimiento a los 40 días después del explante, en donde se evaluó diferentes dosis de ANA y BAP. Como se puede apreciar en el Cuadro N° 04, no existen diferencias estadísticas, explicado posiblemente que las diferentes dosis altas aplicadas no influye en el crecimiento. En el Grafico N° 04, se puede confirmar que no existen diferencias estadísticas entre las dosis en estudio, donde todos los tratamientos mostraron comportamientos homogéneos con promedios que fluctúan T_1 : 15.23; T_1 : 15.46 y T_9 : 17.88; T_9 : 18.02 para ANA y BAP respectivamente, así mismo el efecto A x B. El coeficiente de variación (2.37%), está calificado en la según Calzada Benza como excelente, lo que indica que los errores de medición y las desviaciones producidos por el manejo experimental fueron controlados eficientemente. Efecto de dosis de Ácido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el número de hojas/planta a los 20 días después del explante. El efecto de la aplicación de dosis de Acido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el numero de hojas/planta a los 20 días después del explante, en donde se evaluó diferentes dosis de ANA y BAP. Como se puede apreciar en el Cuadro N° 05, no existen diferencias estadísticas, explicado posiblemente que las diferentes dosis altas aplicadas no influye en el desarrollo de hojas. En el Grafico N° 05, se

puede confirmar que no existen diferencias estadísticas entre las dosis en estudio, donde todos los tratamientos mostraron comportamientos homogéneos con promedios que fluctúan T_1 : 5.00; T_1 : 5.87 y T_9 : 7.01; T_9 : 8.00 para ANA y BAP respectivamente, así mismo el afecto A x B. El coeficiente de variación (2.38%), está calificado en la según Calzada Benza como excelente, lo que indica que los errores de medición y las desviaciones producidos por el manejo experimental fueron controlados eficientemente. Efecto de dosis de Ácido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el número de hojas/planta a los 40 días después del explante. El efecto de la aplicación de dosis de Ácido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el número de hojas/planta a los 40 días después del explante, en donde se evaluó diferentes dosis de ANA y BAP. Como se puede apreciar en el Cuadro N° 06, no existen diferencias estadísticas, explicado posiblemente que las diferentes dosis altas aplicadas no influye en el desarrollo de hojas. En el Grafico N° 06, se puede confirmar que no existen diferencias estadísticas entre las dosis en estudio, donde todos los tratamientos mostraron comportamientos homogéneos con promedios que fluctúan T_1 : 7.00; T_1 : 7.83 y T_9 : 9.41; T_9 : 10.00 para ANA y BAP respectivamente, así mismo el afecto A x B. El coeficiente de variación (2.39%), está calificado en la según Calzada Benza como excelente, lo que indica que los errores de medición y las desviaciones producidos por el manejo experimental fueron controlados eficientemente. Efecto de dosis de Acido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el número de hojas/planta a los 60 días después del explante. El efecto de la aplicación de dosis de Ácido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el número de hojas/planta a los 60 días después del explante, en donde se evaluó diferentes dosis de ANA y BAP. Como se puede apreciar en el Cuadro N° 07, no existen diferencias estadísticas, explicado posiblemente que las diferentes dosis altas aplicadas no influye en el desarrollo de hojas. En el Grafico N° 07, se puede confirmar que no existen diferencias estadísticas entre las dosis en estudio, donde todos los tratamientos mostraron comportamientos homogéneos con promedios que fluctúan T_1 : 13.00; T_1 : 14.37 y T_9 : 18.00; T_9 : 16.76 para ANA y BAP respectivamente, así mismo el afecto A x B. El coeficiente de variación (2.37%),

está calificado en la según Calzada Benza como excelente, lo que indica que los errores de medición y las desviaciones producidos por el manejo experimental fueron controlados eficientemente.

CONCLUSIONES

Que las dosis de Ácido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) aplicados para en el porcentaje de prendimiento a los 8 días después del explante, no difieren una de otra, ya que no se encontraron diferencias estadísticas explicado posiblemente que tanto las altas dosis como las bajas dosis mostraron comportamientos homogéneos así mismo el afecto AxB. La evaluación de la aplicación de dosis de Ácido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el ritmo de crecimiento a los 15, 30 y 40 días después del explante, en donde se evaluó las dosis de ANA y BAP. En la cual no se encontró diferencias estadísticas, explicado posiblemente que las diferentes dosis aplicadas no influye en el crecimiento. Donde todos los tratamientos mostraron comportamientos homogéneos con promedios homogéneos en las diferentes fechas de evaluación. La evaluación de la aplicación de dosis de Ácido Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP) en el número de hojas por planta a los 20, 40 y 60 días después del explante, en donde se evaluó las dosis de ANA y BAP. En la cual no se encontró diferencias estadísticas, explicado posiblemente que las diferentes dosis aplicadas no influye en el crecimiento. Donde todos los tratamientos mostraron comportamientos homogéneos con promedios homogéneos en las diferentes fechas de evaluación. Que las diferentes dosis de Naftalem Acético (ANA) y Bencil Amino Purina (BAP), no influyen en el porcentaje de prendimiento, ritmo de crecimiento y numero de hojas por planta, demostrando que el cultivo in vitro de Stevia se puede realizar con dosis menores a los trabajos en la investigación.

AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Santiago Puente Segura, Mg. Sc. Ing Rolando Porta Chupurgo

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. **Agramonte, (1998), Fumiko, Nagao T, Okabe H. (2002).** Antiproliferative constituents in plants 9.1) *Biología de la planta*, 25 (7): 920-922. Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología - Santa Clara: IBP, 390 p.
2. **Alvarado, (1998) Talón M. (2000).** Fundamentos de fisiología vegetal. Barcelona (España): McGraw Hill. p.522 Evaluación de un sistema de producción in Vitro y en invernadero de plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni. 2008. Tesis Ingeniero Agropecuario, Escuela Politécnica del ejército, Carrera de Ciencias Agropecuarias (IASA I). Sangolquí – Ecuador. 102p.
3. **Álvarez Candela, García Segura, (2005)** Cultivo *In vitro* de las Plantas Superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. pp: 66-67, 98-99, 112-117, 128-133.
4. **Álvaro (1998), Capote A, Fuentes V, Blanco N, Pérez O. (1999).** Micro propagación y regeneración de plantas in vitro. *Revista del Jardín Botánico Nacional*, XX:139-142. Informe sobre viaje al Japón para observar la producción, comercialización e industrialización de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni. Asunción.
5. **Brandle y Telmer, (2007), Pezzuto JM, Kinghorn AD. (1985),** Aplicación del Sistema Autotrófico Hidropónico SHA (Técnica argentina) en variedades mejoradas del Ecuador, para la obtención de semilla prebásica de papa. Quito Ecuador. 6p..
6. **Erkucuk, (2009), Robbins EF, Kinghoran AD. (1986),** In vitro Plant Regeneration from Leaf Explants of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Z. Pflanzphysiol.* Bd. 93. S. 337-343. 1979.
7. **Gómez R., (1998),** Citocininas y ácido jasmónico en la morfológénesis *in vitro*. Sección Cultivo de Tejidos. Resumen, p. 92-93.
8. **Guerra Jímez Ramírez Collapso, (1998),** *Stevia rebaudiana* Bert.: uma revisao. *Ciencia e Cultura* 29 (11) 1240-1248. II Seminario Brasileiro sobre *Stevia rebaudiana* (Bert.).Bertoni Resumos ITAL Campinas 9/82. Instituto de Tecnología de Alimentos, Sao Paulo.

9. Hearn y Subedi, (2008), Experimental Cultivation of Rebaudi's Stevia in California. Agronomy Prog No. 122. Univ, of California, Davis.
10. Jaitak (2008), Mollers C, Zhang JS, Wenzel G. (1991), Studies on the cultivation of *Stevia rebaudiana* Bert. Determination of stevioside II. Journal of the Pharmaceutical Society of Japan (12):1501-1503.
11. Jarma, (2008) Planta endulzante con mucho futuro. Diario La Prensa. Nicaragua. Jueves 14 de abril de 2005.
12. Jeppesen, (2000) , Khanuja SPS, Kumar S. (2001), Biotechnology and Genetic Diversity. CSI, San Francisco, California, E.U.A.
13. Jordán M., (1983) La propagación de Estevia (*Stevia rebaudiana* B.) Primer Simposio Nacional de la Stevia Julio 1983, Asunción, Paraguay, 29 p.
14. Marcavillaca M.C.; Divo de Sesar M. y Villela F. (1985). Micropropagación "In-Vitro" de (*Stevia rebaudiana* B.) por medio de segmentos nodales y meristemas.
15. Nomberto, (2001). Efecto de las Auxinas y Citocininas en la inducción de callos y regeneración, in vitro. Oficina General de Promoción y Desarrollo de la Investigación (OGPRODEIN) – UNT.
16. Román (1995), Veitia N, García L, Clavero J, Urrea AI. (1999). Taxonomía e biología da reprodução de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. I Seminario Brasileiro sobre *Stevia rebaudiana* Bertoni. IV 1. Resumos ITAL Campinas 9/82. Instituto de Tecnología de Alimentos, Sao Paulo. Pagliosa ESPE, Carrera de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias (IASA I) 34.
17. Shock 1993, Pérez JN. (1998). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara (Cuba): Instituto de biotecnología de las plantas, Ed. p. 390.
18. Solange E.; Pereira, J.; Ramalho, A.; Arbex, N.; Cardoso, M. y Alves, O. (2002) Reguladores de crecimiento e tipos de explantes. Ciencia e Agro tecnología: 301-308.
19. Soto, Veitia N, García L, Clavero J, Urrea AI. (2002). Extracción de los principios edulcorantes de la (*Stevia rebaudiana* B.) Revista de Ciencias Agrarias y Tecnología de los Alimentos 20:5-9.

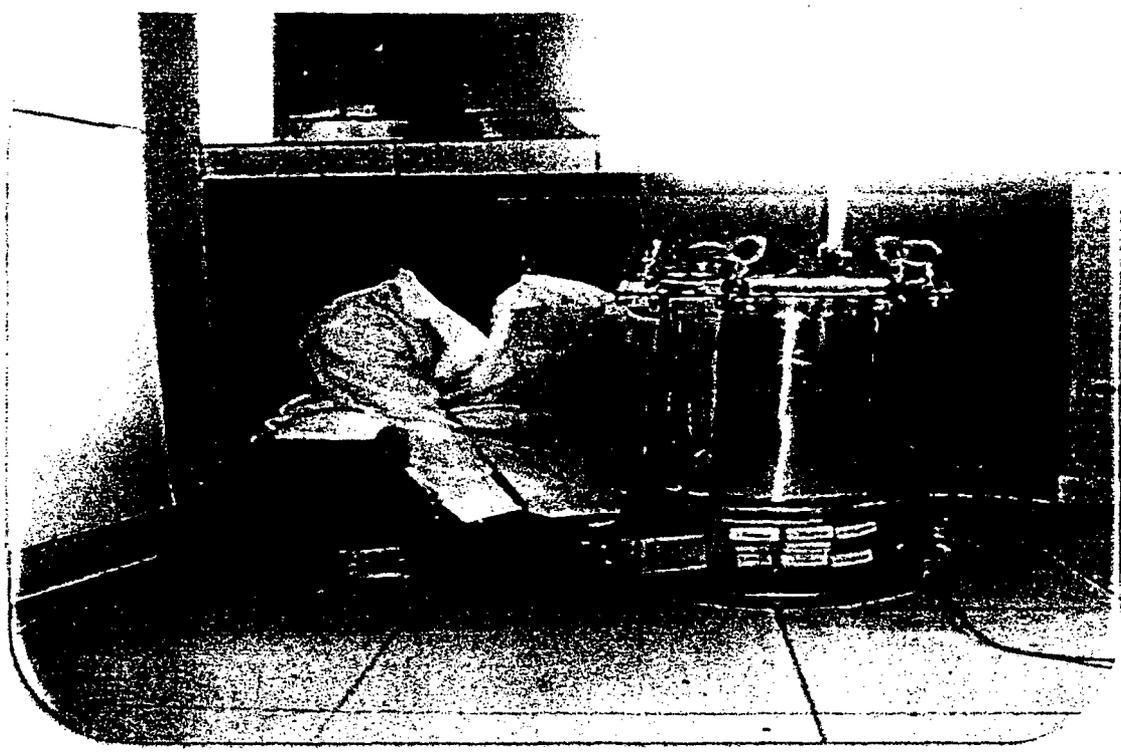
20. Sumida (1980), Murashige T, Skoog F. (1962), Studies on (*Stevia rebaudiana* B.) as a new possible crop for sweetening resource in Japan. J. Cent. Agric. Exp. Sta. 31, 1-71.
21. Tadhani (2007), Kaneda N, Lee I, Gupta M, Soejarto DD, Kinghorn AD. (1992). Caa-Jhee A wild shrub native to Paraguay (*Stevia rebaudiana* Bert.) September. Typed Material. STICA, Paraguay.
22. Taiariol, (1995), Propagación vegetativa de (*Stevia rebaudiana* B.). Tesis Ingeniero Agrónomo, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
23. Utsunomiya, Echeverría M, Cárdenas O, Acuña M, Meléndez P, Romero L. (1997). Cultivation of Stevia Containing Sweetening Agents. *Nogyo Oyobi Engei* 52 (4):543-547.

Anexos

1.- MATERIAL VEGETAL EN CAMPO



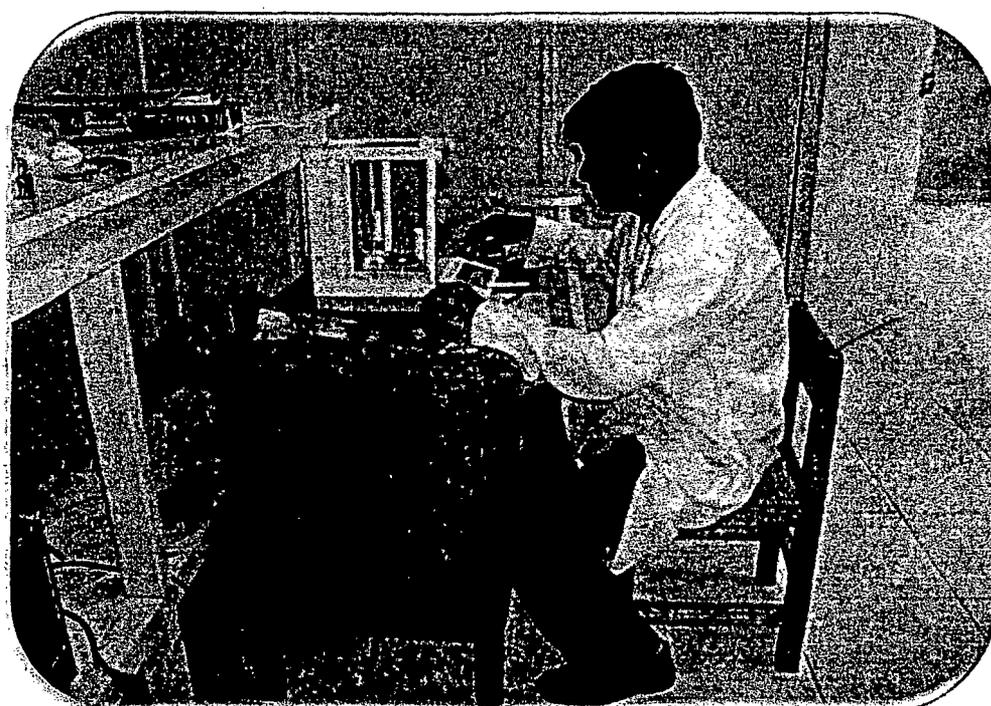
2.-ESTERILIZACION DE MATERIAL



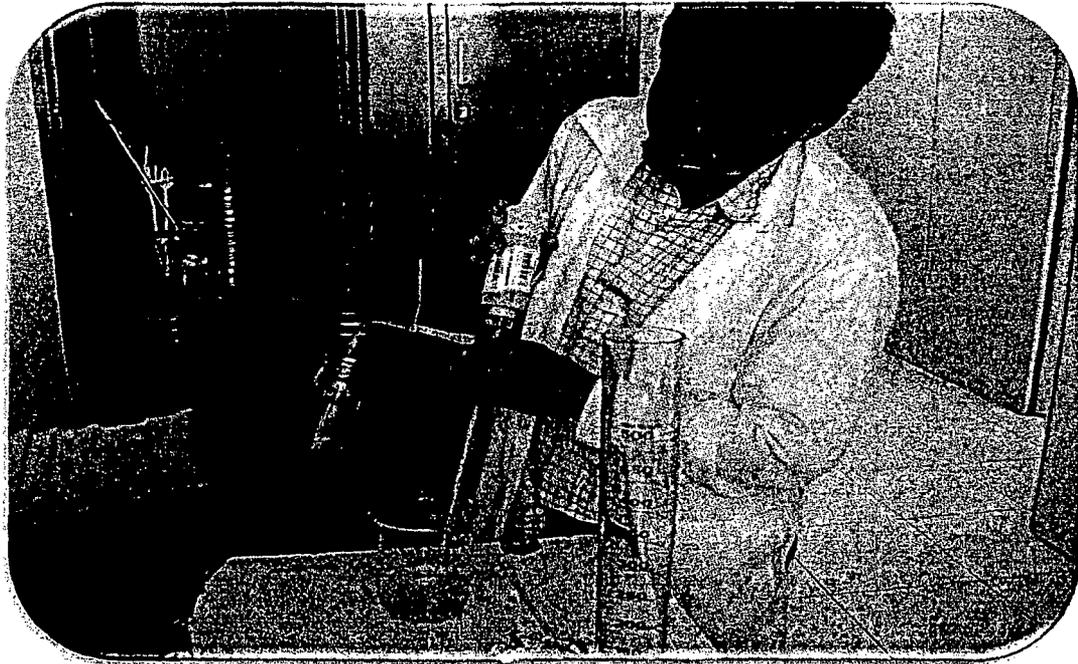
3.- DESTILACION DE AGUA



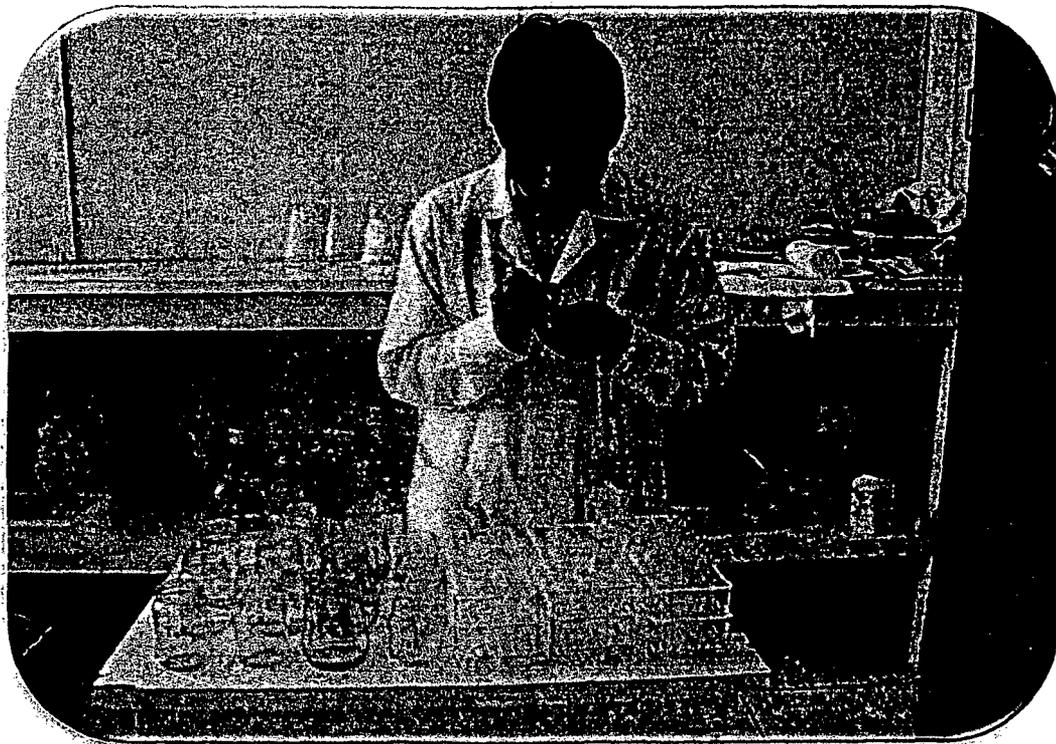
4.- PREPARACION DE DOSIS DE BAP Y ANA



5.- PREPARACION DE MEDIO CULTIVO



6.- IDENTIFICACION DE LOS TRATAMIENTOS



7.- EVALUACION



