

ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN *in vitro* de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, VARIEDAD 'Eirete'

In vitro ESTABLISHMENT AND MULTIPLICATION OF *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, 'Eirete' VARIETY

Lee-Espinosa, H.E.¹; Nieto-Agustín, E.D.¹; Murguía-González, J.¹; Leyva-Ovalle, O.R.¹; Landero-Torres, I.¹; Galindo-Tovar, M.E.¹; Ramírez-Hernández, T.¹; Dávila-Lezama, M.R.¹

¹Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Región Orizaba-Córdoba, Camino Peñuela-Amatlán Km 1. Amatlán de los Reyes C.P. 94945, Veracruz, México. Laboratorio de Micropropagación Vegetal.

*Autor de correspondencia: kalapana_66@hotmail.com

RESUMEN

Se llevó a cabo la multiplicación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni cv. Eirete, con el fin de determinar las mejores condiciones de cultivo para su establecimiento y emisión de brotes múltiples, y diseñar una estrategia para su micropropagación. Para el establecimiento *in vitro*, se seleccionaron como explantes secciones de tallo de ≈ 1.5 cm, con dos nudos, se pre desinfectaron en solución de Captán® (3.0 gr L^{-1}) en agitación por 15 minutos, seguido de inmersión en alcohol etílico (70% v/v) por 5 min. Posteriormente, bajo condiciones asépticas, se desinfectaron con NaClO (5% v/v) por 10 minutos, seguida de dos enjuagues con agua destilada esterilizada (ADE). Los explantes se establecieron en posición vertical y horizontal en el medio basal Murashige y Skoog (1962) suplementado con 6, Bencilaminopurina (BAP) en concentraciones de 0.0, 1.0, 1.5 y 2.0 mg L^{-1} . Las variables número de brotes, vigor y talla de los mismos, fue afectada por los tratamientos. El análisis de medias de Tukey mostró diferencias significativas en número de brotes, directamente proporcionales a la concentración de BAP, y en relación inversa con su aspecto y vigor. Determinar la concentración apropiada de BAP para el establecimiento *in vitro* e inducción de brotes múltiples es el inicio de una estrategia para la micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni spp.

Palabras clave: multiplicación, 6-benzylaminopurina (BAP), estevia, edulcorantes

ABSTRACT

The *in vitro* multiplication of *Stevia rebaudiana* Bertoni cv. Eirete was carried out, with the aim of determining the best cultivation conditions for their establishment and emission of multiple buds, and of designing a strategy for their micropropagation. For the *in vitro* establishment, stem sections of ≈ 1.5 cm, with two knots, were selected as explants; they were pre-disinfected in Captán® solution (3.0 gr L^{-1}) in agitation for 15 minutes, followed by immersion in ethylic alcohol (70 % v/v) for 5 min. Later, under aseptic conditions, they were disinfected with NaClO (5% v/v) for 10 minutes, followed by two washes with sterilized distilled water (SDW). The explants were established in a vertical and horizontal position in the Murashige and Skoog basal medium (1962) supplemented with 6-Benzylaminopurine (BAP), in concentrations of 0.0, 1.0, 1.5 and 2.0 mg L^{-1} . The variables number of buds, vigor and size of these, were affected by the treatments. The Tukey means analysis showed significant differences in number of buds, directly proportional to the concentration of BAP, and inversely related to their aspect and vigor. Determining the appropriate concentration of BAP for the *in vitro* establishment and induction of multiple buds is the beginning of a strategy for the micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni spp.

Keywords: multiplication, 6-Benzylaminopurine (BAP), stevia, sweetener.



INTRODUCCIÓN

Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni, es una planta herbácea perenne (Asteraceae), nativa de Paraguay (Sud América) y cultivada en países de casi todos los continentes, con gran importancia debido a su contenido en edulcorantes naturales bajos en calorías, lo cual es benéfico a la salud de personas diabéticas y con sobrepeso (Gantait *et al.*, 2015). El steviosido, es el principal endulzante presente en tejidos de hojas y tallos de stevia, y en su forma purificada registra 300 a 400 veces más dulzor que el azúcar de caña (*Saccharum officinarum* L.) (Kingham y Soejarto, 1985). Estos compuestos, que pueden extraerse de las hojas, se encuentran disponibles al público para endulzar una variedad de productos comestibles. Las hojas y extractos de stevia también se utilizan como suplementos en la dieta para el cuidado de la piel en Estados Unidos de Norteamérica (Behnaz Shafii *et al.*, 2012). En el ámbito mundial se ha generado una tendencia hacia el consumo de alimentos saludables, de origen natural, debido a que las personas se han dado cuenta de la importancia de cuidar su salud. De acuerdo a estudios realizados, en México, una de cada tres personas está afectada por obesidad, tanto hombres como mujeres (SS, 2013) y en el caso de Estados Unidos de América, un estudio reveló que existen cerca de 160 millones de personas que hacen uso de un sustituto dietético, resaltando el Aspartame como el edulcorante más utilizado para endulzar bebidas, lácteos, repostería, confitería, etcétera, sin embargo, la dependencia al consumo de estas sustancias puede traer consigo varios riesgos, tales como el aumento en los niveles de glucosa en sangre de personas con diabetes y personas con obesidad (Méndez y Saravia, 2012). Dado que México ocupa el segundo lugar en obesidad del mundo, y el aumento de diabetes en la población no disminuye, ha crecido la demanda de sustitutos de azúcar de caña especialmente para personas con enfermedades crónico degenerativas (Ramírez *et al.*, 2012). Debido a lo anterior, ha crecido el interés por elevar la producción de plantas de Stevia por distintos métodos, probando la propagación convencional por esquejes, estacas, raíces entre otros, evidenciando inconvenientes en estos métodos de propagación asexual el requerimiento de un número elevado de plantas madre así como, espacio especial para planta madre y enraizamiento. Los métodos biotecnológicos como el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, con fines comerciales representan una opción viable; ya que, a partir de muy pocas plantas donadoras de explantes, se puede lograr la producción clonal y masiva, garantizando vo-

lumen y calidad genética y plantas libres de patógenos, lo cual es difícil de mantener por métodos tradicionales de propagación asexual. En Stevia se han probado diferentes métodos de propagación *in vitro* y explantes que incluyen esquejes, hojas, segmentos nodales y yemas axilares (Gantait, 2015), sin embargo, es importante desarrollar un protocolo local para la propagación *in vitro* de Stevia utilizando explantes que permitan mejor uso del material vegetal (planta madre) con buen rendimiento. Con base en lo anterior, se evaluó el uso de mestacas como explantes y su respuesta a tres concentraciones de 6-benzylaminopurina (BAP).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionó la variedad 'Eirete' de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertouli, que fue desarrollada por el Instituto Agronómico Nacional (I.A.N o IPTA) de Paraguay y que presenta características de buena adaptación ambiental, así como hojas de mayor tamaño en comparación con otras variedades. Estas características aumentan considerablemente la capacidad de producción de kg de hojas por ha⁻¹, que anualmente oscilan entre 2 y 2.5 t ha⁻¹, cuando no se utilizan sistemas riego, y hasta 3 y 3.5 t ha⁻¹, bajo condiciones de riego. Las plantas que se utilizaron como fuente de explantes, se obtuvieron en la empresa *Stevia rebaudiana* en la ciudad de León, Guanajuato, México. Posteriormente fueron colocadas en el vivero de planta original y aclimatización de la Facultad de Ciencias Biológico Agropecuarias región Orizaba-Córdoba de la Universidad Veracruzana, y se sometieron a cuarentena con sustrato desinfectado, realizando aplicaciones, tanto de fungicida sistémico (Benomil®) al sustrato, como de contacto (Captán®) al follaje, cada ocho días.

Medios de cultivo

El medio de cultivo utilizado para el establecimiento de las miniestacas, fue el de Murashige y Skoog (1962) suplementado con 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 5 ml de solución de vitaminas de MS, 30 g L⁻¹ de sacarosa y 2.5 g L⁻¹ de Phytigel® como agente gelificante. Durante el establecimiento no se adicionaron reguladores de crecimiento vegetal; sin embargo, para inducir la proliferación de brotes múltiples, en la etapa de multiplicación y alargamiento, el medio básico de Murashige y Skoog (1962) fue suplementado en forma similar al medio de establecimiento, adicionado diferentes concentraciones de 6-benzylaminopurina (BAP): 0.0, 1.0, 1.5 y 2.0 mg L⁻¹, para probar su efecto inductor de la brotación. El pH fue ajustado a 5.7±0.1, y los medios fueron dosificados a

razón de 20 ml por frasco tipo "G", que posteriormente se esterizaron en autoclave durante 20 minutos a 1.05 kg cm^{-2} de presión y $121 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura.

Establecimiento *in vitro*

Pre-desinfección: Se cortaron 28 miniestacas consistentes en segmentos de tallo con dos nudos cada uno. Inicialmente se lavaron con detergente y agua corriente y colocaron en solución fungicida (Captan[®] 3 g L^{-1}) en agitación lenta durante 15 min; posteriormente se llevó a cabo una inmersión en alcohol etílico al 70% (v/v) durante 5 minutos.

Desinfección: Bajo condiciones de asepsia en campana de flujo laminar (CFL), los explantes fueron desinfectados con hipoclorito de sodio (NaClO) al 5% (v/v) en inmersión (10 min), agitando repetidamente. Transcurrido este tiempo se realizaron dos enjuagues con ADE, a fin de retirar el exceso de desinfectantes.

Sembrado: Bajo condiciones asépticas, en CFL, se ajustó el tamaño de las miniestacas hasta $\approx 1.5 \text{ cm}$ cortando los extremos, y colocaron en posición vertical y horizontal, en el medio de cultivo, a razón de dos explantes por frasco. Los frascos se colocaron en el área de incubación, a $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, fotoperiodo de 16 horas luz y ocho horas de oscuridad e intensidad luminosa de $25 \mu\text{M m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ proporcionada por lámparas fluorescentes marca Phillips[®] de 30 watts. La temperatura promedio fue de $24 \text{ }^\circ\text{C}$ por el día y $18 \text{ }^\circ\text{C}$ por la noche, llegando a $18 \text{ }^\circ\text{C}$ como mínima y $28 \text{ }^\circ\text{C}$ máxima.

Multiplicación y alargamiento

Para la inducción de múltiples brotes, se estableció un experimento completamente al azar, evaluando el efecto de diferentes concentraciones de BAP, distribuidas en tres tratamientos: $T_1=1 \text{ mg L}^{-1}$, $T_2=1.5 \text{ mg L}^{-1}$, y $T_3=2 \text{ mg L}^{-1}$, y un testigo sin BAP en medio de cultivo básico de Murashige y Skoog (1962). Se prepararon cinco repeticiones de cada tratamiento, consistentes cada una en un frasco de cultivo con dos miniestacas de $\sim 1.5 \text{ cm}$ de longitud, cada una con dos nudos, similares a las utilizadas para iniciar los cultivos axénicos, pero esta vez separadas de los brotes producidos de *novo* en los explantes colocados en posición vertical en la fase de establecimiento. Las evaluaciones de la producción de brotes múltiples se realizaron a 55 días de iniciado el experimento, monitoreando a intervalos de cinco días, posible contaminación, fenolización y en general el avance en la formación de brotes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El proceso de desinfección aplicado a explantes y su establecimiento *in vitro*, permitió el progreso y producción de brotes después de 15 días de desarrollo. Se observó mejor respuesta a la producción de brotes en explantes colocados verticalmente, ya que en aproxima-

damente 15 días, inició la producción de brotes a partir de las yemas axilares, los cuales por su altura ($>1.5 \text{ cm}$) y características (brotes completamente formados, con tallo y hojas bien definidas y aspecto vigoroso) se consideraron óptimos para la extracción de propágulos (Figura 1). Los explantes colocados horizontalmente produjeron escasos brotes cuya talla fue menor de 1.5 cm de altura; además tendieron a deshidratarse rápidamente durante su manejo *ex vitro* en CFL, por lo que no fueron utilizados para la fase de multiplicación y alargamiento.

Multiplicación y alargamiento de miniestacas

El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre tratamientos para la variable número de brotes (Figura 2). El tratamiento con 2 mg L^{-1} de BAP en el medio de cultivo MS, produjo en promedio 33 brotes por explante, considerado como el mayor promedio de brotación obtenido en el presente estudio, seguido del tratamiento con 1.5 mg L^{-1} de BAP, y 1 mg L^{-1} de BAP, que produjeron en promedio 19.6 y 13.6 brotes por explante respectivamente. El testigo produjo en promedio 2.2 brotes por explante.

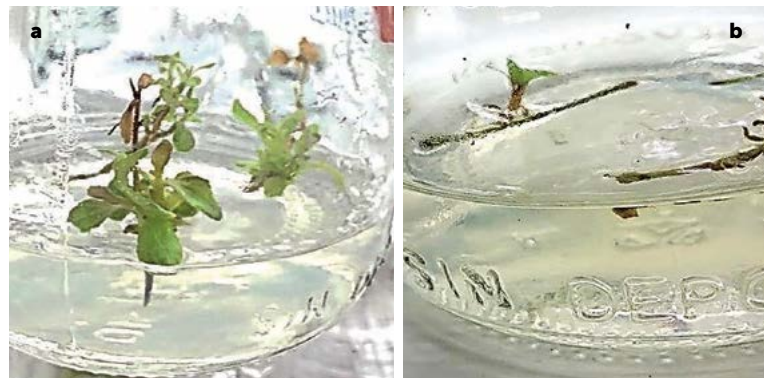


Figura 1. Desarrollo de brotes de *Stevia rebaudiana* Bert. var Eirete. a: miniestaca vertical mostrando la producción de brotes. b: miniestaca horizontal con desarrollo incipiente de brotes a 15 días de su crecimiento *in vitro*.

El aspecto general de los brotes fue variable; sin embargo, se observó influencia de las concentraciones de BAP en la longitud. Al aumentar la concentración de citocinina hasta 2 mg L^{-1} , aunque el número de brotes fue mayor, la longitud disminuyó y en menor medida, su vigor y coloración. La disminución del vigor estuvo dada por el grosor de los tallos y el color de hojas fue más pálido (Figura 3). Estos resultados coinciden con Sreedhard *et al.* (2008) quienes reportaron el mayor promedio de producción de brotes en explantes de hoja cuando utilizaban 2 mg L^{-1} de BAP, aunque en combinación con Kinetina 1 mg L^{-1} , y usando explantes de hojas inmaduras de *S. rebaudiana* spp. Sirvaram y Mukundan (2003), al comparar concentraciones de 2.2 mg L^{-1} hasta 13.3 mg L^{-1} de 6-Benziladenina, registraron mayor número de brotes con la menor concentración. Esto pone de manifiesto la importancia de determinar la mejor concentración en

la inducción de brotes y coincide con lo encontrado en este trabajo. Referente al vigor de los brotes, es mejor seleccionar el tratamiento que, aunque no produzca la mayor brotación, logre mejorar la calidad de brote e incremente su longitud y brotación en el subcultivo. En este experimento, en el tratamiento T2 los brotes producidos por explante (19.6), registraron al ser individualizados para su subcultivo, mayor elongación, y en general mayor vigor. El testigo, produjo únicamente 2.2 brotes promedio, con aspecto elongado y poco vigoroso.

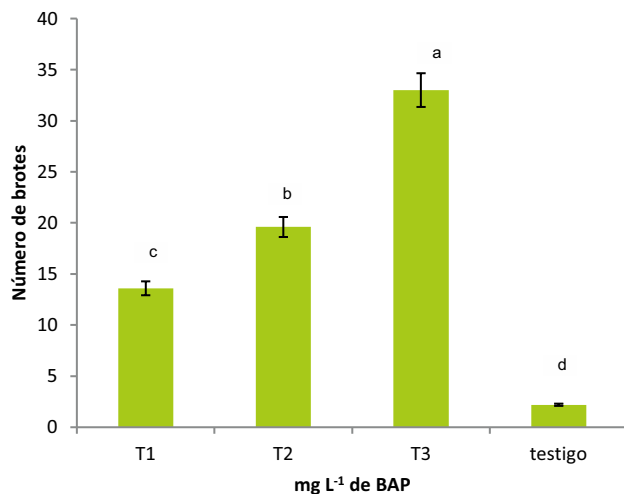


Figura 2. Efecto de concentraciones de BAP (mg L^{-1}): T₁=1, T₂=1.5, T₃=2, testigo=0 sobre la inducción de brotes en miniestacas de *Stevia rebaudiana* Bert. Var 'Eirete' cultivadas *in vitro*. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

CONCLUSIONES

La desinfección del 100% de explantes de *S. rebaudiana* Bert. Eirete, fue exitosa cuando se realizó en dos etapas: pre desinfección con Captan® (3 g L^{-1}) en agitación 15 min seguida de inmersión en alcohol etílico al 70% (v/v) 5 min, y desinfección bajo condiciones asépticas en NaClO1 5% (v/v) 10 min y posteriores enjuagues



Figura 3. Respuesta al desarrollo y proliferación de brotes múltiples de miniestacas de *Stevia rebaudiana* Bert. Var Eirete, en medio MS (1962) a diferentes concentraciones de BAP en los tratamientos: a-b: T₃=MS+BAP 2 mg L^{-1} ; c-d: T₂=MS+BAP 1.5 mg L^{-1} ; e-f: T₁=MS+BAP 1 mg L^{-1} .

con ADE. El tratamiento que mayor promedio de brotes produjo fue el T3, consistente en el medio de cultivo MS+2 mg L⁻¹ de BAP., sin embargo, el tratamiento adicionado con 1 mg L⁻¹ de BAP, con promedio de 19.6 brotes por explante, registró en la fase de subcultivos sucesivos mayor número de brotes y vigor, que lo hace más promisorio para micropropagación comercial.

LITERATURA CITADA

- Behnaz Shafii, Ramin Vismeh, Randy Beaudry, Ryan Warner & A. Daniel Jones. 2012. Large-scale profiling of diterpenoid glycosides from *Stevia rebaudiana* using ultrahigh performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403:2683–2690.
- Gantait S., D. Arpita, M. Nirmal. 2015. *Stevia*: A Comprehensive Review on Ethnopharmacological Properties and In vitro Regeneration. *Sugar Technology* 17:95–106.
- Kinghorn, A. D., & Soejarto, D. D. 1985. Current status of stevioside as a sweetening agent for human use. *Economic and medicinal plant research*/edited by H. Wagner, Hiroshi Hikino, Norman R. Farnsworth.
- Méndez E., F. D. y Saravia H., R. A. 2012. Extracción de un edulcorante natural no calórico a escala de laboratorio a partir de "*Stevia rebaudiana* Bertoni." y su aplicación en la industria de alimentos. Universidad de El Salvador Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Escuela de Ingeniería Química e Ingeniería de Alimentos. San Salvador. pp. 20-27.
- Murashige, T and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15:473-497.
- Ramírez, J. G., Avilés, B. W., Moguel, O. Y., Góngora, G. S., May, L. C. 2012. *Estevia* (*Stevia rebaudiana*, Bertoni), Un cultivo con potencial productivo en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Sureste. Mérida, Yucatán, México. 88 p.
- Sreedhar, R.V., I. Venkatachalam, R. Thimmaraju, N. Bhagyalakshmi, M.S. Narayan and G.A. Ravishankar. 2008. Direct organogenesis from leaf explants of *Stevia rebaudiana* and cultivation in bioreactor. *Biología Plantarum* 52: 355-360.
- Secretaría de Salud (SS). 2013. Estrategia Nacional para la Prevención y el Control del Sobrepeso, la Obesidad y la Diabetes. D.R. Secretaría de Salud. Ed IEPSA, Entidad paraestatal del Gobierno Federal. México.
- Sirvaram, L. & Mukundan, U. 2003. In vitro culture studies on *Stevia rebaudiana*. *In vitro cell development and Biology* 39: 520-523.

