



MICROPROPAGACIÓN MASIVA DE *Stevia rebaudiana* Bertoni EN SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL

Mass micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in temporary immersion systems

Silvana Alvarenga Venutolo[✉] y Tatiana Salazar Aguilar

ABSTRACT. *Stevia rebaudiana* Bertoni, Asteraceae, is a natural sweetener called “Stevia”. Its properties came from the diterpenoid glycosides presented in the leaves: a stevioside and rebaudiside. The percentage of seed germination of *S. rebaudiana* is very low and the plants produced are heterogeneous, so it is not suitable for mass propagation in the field. The tissue culture in temporary immersion systems, is an effective tool for micropropagation, since it increases the multiplication coefficient and produces the improvement in the quality of *in vitro* regenerated plants. This research determined the efficiency of propagation process using temporary immersion devices for scaling up the mass production of *Stevia rebaudiana*, with the use of liquid media in automated temporary immersion system (RITA[®]) and twin flasks system (BIT), compared with semisolid culture. Most of the treatments involving temporary immersion systems (BIT y RITA[®]), produced green plants and vigorous plants, with low levels of hyperhydricity. The highest average of regenerated leaves and shoots was obtained in the RITA[®] system, with 10 minutes of immersion every 8 hours. It was determined also that 10 minutes on immersion each 12 hour with the BIT produced vigorous plants, with an increased length, fresh and dry weight mass. The use of *in vitro* culture in temporary immersion bioreactors (RITA[®] and BIT), offers many advantages in the process of scaling the production of this kind of commercial plant, related to conventional propagation system and encouraging the process of acclimatization.

Key words: sweetener, *in vitro* culture, bioreactors, propagation, *Stevia*.

RESUMEN. *Stevia rebaudiana* Bertoni, familia Asteraceae, es conocida como “yerba dulce” por poseer un edulcorante natural. Sus propiedades provienen de la presencia de glicósidos diterpenos denominados esteviósidos y rebaudiósidos en las hojas. El porcentaje de germinación de las semillas de *S. rebaudiana* es muy bajo y las plantas producidas son heterogéneas, por lo que no es conveniente para la propagación masiva en campo. El cultivo en sistemas de inmersión temporal, es una herramienta eficaz para la micropropagación, ya que incrementa el coeficiente de multiplicación y produce el mejoramiento en la calidad del material regenerado *in vitro*. En esta investigación se determinó el proceso de propagación de inmersión temporal más eficiente para el escalamiento de la producción masiva de *Stevia rebaudiana*, con el empleo de medios líquidos en sistemas de inmersión temporal automatizado (RITA[®]) y vasos gemelos (BIT), en comparación con el cultivo en medio semisólido. La mayoría de los tratamientos en sistemas de inmersión temporal BIT y RITA[®] produjeron plantas verdes y vigorosas, con bajos niveles de hiperhidricidad. El mayor número promedio de regeneración de hojas y brotes se obtuvo en RITA[®] con 10 minutos de inmersión cada ocho horas. Se determinó que en el tratamiento que consistió en 10 minutos de inmersión cada 12 horas en BIT, produjo plantas muy vigorosas, con el mayor incremento en longitud, masa fresca y masa seca promedio. El empleo de cultivo *in vitro* en biorreactores de inmersión temporal (RITA[®] y BIT), ofrece muchas ventajas en el proceso de escalamiento de la producción de esta especie de interés comercial, respecto a los sistemas de cultivo convencional, favoreciendo el proceso de aclimatación.

Palabras clave: edulcorantes, cultivo *in vitro*, biorreactores, propagación, *Stevia*.

INTRODUCCIÓN

Stevia rebaudiana Bertoni, de la familia Asteraceae, es conocida como “yerba dulce” por poseer un edulcorante natural. Forma parte de la medicina tradicional indígena del Paraguay, por sus

Centro de Investigación en Biotecnología. Escuela de Biología. ITCR. Cartago. Costa Rica.

✉ salvarenga@itcr.ac.cr; tatiana.salazar@itcr.ac.cr.

usos como edulcorante y medicinal. Sus propiedades provienen de la presencia de glicósidos diterpenos denominados esteviósidos y rebaudiósidos (1, 2).

La *Stevia rebaudiana* acumula más de treinta esteviol glicósidos en diferentes concentraciones, dependiendo del genotipo y de las condiciones de cultivo. Los glicósidos más conocidos son los esteviósidos y el rebaudiósido A (3). Se ha reportado que la producción de esteviósidos varía en un rango del 5 al 22 % del peso seco de la hoja y del 25 al 54 % de rebaudiósidos y en la variedad mejorada "Morita" la producción de rebaudiósido puede alcanzar el 61,6 % (3, 4, 5, 6).

Las semillas de esta especie son muy pequeñas, por tanto, la colecta es muy lenta y se dificulta por la floración poco uniforme del cultivo en campo, lo que incide en la maduración de las mismas (7). El porcentaje de germinación de las semillas de *S. rebaudiana* es muy bajo. Se reporta que el mayor porcentaje de germinación fue de un 25,5 % a los nueve días de siembra en suelo, pero posteriormente decreció al 6,12 % de germinación, lo que se explica por una pérdida de viabilidad de las semillas si se almacenan por largos periodos, por lo que no es recomendable para la propagación masiva en campo (8).

Adicionalmente, la reproducción sexual produce poblaciones heterogéneas, con un gran rango de variabilidad en los niveles de glicósidos producidos. La propagación vegetativa está limitada, debido al bajo número de propágulos producidos en comparación con el uso de las técnicas de cultivo *in vitro* (9).

Se requiere el desarrollo de técnicas eficientes de propagación masiva en esta especie, para obtener plantas libres de patógenos y que conserven la tasa de producción de los metabolitos secundarios de interés, en este caso los glicósidos.

El empleo del cultivo en biorreactores en medios líquidos y biorreactores de inmersión temporal de vasos gemelos BIT, se han convertido en una herramienta eficaz para la micropropagación, ya que incrementa el coeficiente de multiplicación y produce el mejoramiento en la calidad del material regenerado *in vitro* (10, 11). El empleo de estos sistemas incide en la reducción de los costos de producción en el cultivo a escala, ampliamente documentado en gran número de especies de valor comercial (10, 12). Por otra parte, se controlan los tiempos de inmersión y se reducen los problemas de hiperhidricidad, frecuentes en sistemas de cultivo en medios líquidos (10, 11, 12).

En esta investigación se determinó el proceso de propagación de inmersión temporal más eficiente para el escalamiento de la producción masiva de *Stevia rebaudiana*, con el empleo de medios líquidos en sistemas de inmersión temporal automatizado RITA® y BIT, en comparación con el cultivo en medio semisólido.

MATERIALES Y MÉTODOS

INTRODUCCIÓN Y ESTABLECIMIENTO *IN VITRO*

La introducción y el establecimiento *in vitro* se realizó utilizando micro estacas de plantas cultivadas en el invernadero del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), ubicado en la provincia de Cartago en Costa Rica. Se introdujo y multiplicó el material en medio semi-sólido que contenía las sales y vitaminas (13), suplementado con 2 mg L⁻¹ de Pantotenato de Calcio, 0,5 mg L⁻¹ de ácido giberélico (AG₃), 30 g L⁻¹ de sacarosa y 3,2 g L⁻¹ de Phytgel®, a pH de 5,7. Los explantes permanecieron en condiciones de luz difusa a una temperatura de 25 ± 2 °C, y un fotoperiodo de 16 horas luz y ocho horas oscuridad.

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

MICROPROPAGACIÓN DE *S. rebaudiana*

EN SISTEMAS DE CULTIVO DE INMERSIÓN TEMPORAL AUTOMATIZADO RITA® Y DE INMERSIÓN TEMPORAL EN VASOS GEMELOS BIT

Las condiciones de cultivo fueron: 25±2 °C de temperatura, luz difusa y fotoperiodo de 16 horas luz y ocho horas de oscuridad. Los explantes consistieron en micro estacas de 12 mm de longitud, tomadas de vitroplantas vigorosas con coloración verde oscuro, con tres subcultivos y con un mes desde su última multiplicación.

SISTEMA 1. INMERSIÓN TEMPORAL EN RITA®

Se evaluaron cuatro tratamientos: cinco minutos de inmersión cada ocho horas (T1) y cada 12 horas (T2); 10 minutos de inmersión cada ocho horas (T3) y cada 12 horas (T4). Los recipientes de cultivo contenían 250 mL de medio de multiplicación líquido y 25 explantes, cada uno, por lo que para cada tratamiento se evaluaron cuatro RITA®, completando cuatro repeticiones.

SISTEMA 2. INMERSIÓN TEMPORAL EN BIT

Se construyeron prototipos de BIT, empleando frascos de vidrio de 1 L de capacidad con tapas autoclavables, tubos de vidrio para la entrada y salida de aire, empaques, mangueras y filtros hidrofóbicos de 0,22 µm (Figura 1). El sistema se evaluó mediante cuatro tratamientos: cinco minutos de inmersión cada ocho horas (T5) y cada 12 horas (T6); 10 minutos de inmersión cada ocho horas (T7) y cada 12 horas (T8). Cada recipiente contenía 500 mL de medio líquido y 50 explantes, cada tratamiento consistió en cuatro repeticiones.



Figura 1. Sistema de inmersión temporal de vasos gemelos (BIT).

TRATAMIENTOS TESTIGO

El tratamiento testigo T9 consistió en el cultivo de 25 explantes por frasco de cultivo con 250 mL de medio semi-sólido, en envases del sistema de inmersión temporal RITA®, con un total de cuatro repeticiones. El T10 consistió en el cultivo de cuatro repeticiones de 50 explantes cada una, en frascos de cultivo BIT con 500 mL de medio de cultivo.

En todos los sistemas se utilizó un medio de micropropagación con sales M&S, suplementado con 2 mg L⁻¹ de Pantotenato de Calcio y 0,5 mg L⁻¹ de AG₃, sin gelificante, excepto en el medio semisólido (tratamientos testigo).

Transcurrido el periodo de multiplicación de tres semanas, se determinó el número de brotes, el número de hojas, la longitud, la masa fresca y la masa seca. Se calcularon promedios de la variable por repetición en cada tratamiento. Solamente la medición de la masa seca se registró como un solo dato para cada repetición, se obtuvo colocando los explantes en la estufa a 70 °C durante 24 horas. Así mismo, se determinó el contenido de clorofila a y b utilizando 15 mg de tejido, que posteriormente se congeló con nitrógeno líquido, se maceró en un mortero y se homogenizó con 1 mL de acetona al 80 %. Los extractos se centrifugaron a 15000 g (12 500 rpm) por 15 minutos. Por último, se tomó el sobrenadante y se realizaron las lecturas a 646,8 y 663,2 nm en un espectrofotómetro. La concentración de clorofilas totales se calculó de acuerdo a las ecuaciones propuestas por Lichtenthaler (14).

Se evaluaron las características cualitativas de coloración e hiperhidricidad por tratamiento a través de la observación, y se documentaron a través de fotografías. El color se evaluó de acuerdo a una carta de Colores Pantone facilitados por la Escuela de Diseño Industrial del ITCR.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

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

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En gran número de especies se ha reportado la producción de mayor número de propágulos con el empleo de medios líquidos, ya que en este sistema los explantes están en contacto directo con el medio de cultivo, lo que incide en que la toma de nutrientes sea más efectiva; por otra parte, las sustancias de desecho se secretan al medio líquido por lo que afectan en menor medida al explante (11, 12, 15).

En el cultivo *in vitro* de *Stevia* en medio líquido en un biorreactor de columna de burbujeo se determinó un incremento en masa fresca de los brotes, en comparación con tratamientos utilizando matraces en agitación (16).

En este trabajo se utilizó la inmersión temporal en sistemas BIT y RITA®. Se realizó la comparación de medias del número de brotes, número de hojas, longitud, masa fresca y masa seca, las variables obtenidas en todos los tratamientos se muestran en la Tabla I.

NÚMERO DE BROTES

Los tratamientos T2, T3, T7 y T8 produjeron un mayor número promedio de brotes, entre 12,18 y 14,21, no evidenciando una diferencia significativa entre los tratamientos (Tabla I). El número de brotes promedio es un factor determinante en la tasa de multiplicación, por lo que es relevante en la estimación de costos de los procesos de propagación comercial.

En el caso de la micropropagación utilizando biorreactores se informa de la facilidad en la producción y manejo de un mayor número de plántulas, la estimulación de la tasa de crecimiento por la aireación forzada, así como por la supresión de la dominancia apical, que induce la estimulación de crecimiento de brotes laterales (17), lo que representa una ganancia en cuanto a cantidad y calidad de material *in vitro* disponible, lo que adquiere aún más relevancia cuando se trabaja con especies de difícil manejo en laboratorio, haciendo indispensable la implementación de tratamientos eficaces (11, 15, 18, 19, 20).

Tabla I. Comparación de medias del número de brotes, número de hojas, longitud, masa fresca y masa seca, obtenidos en todos los tratamientos de inmersión temporal, mediante la Prueba de Tukey con una diferencia significativa honesta de 1 %.

Sistema de cultivo	Tratamiento	Variable				
		Δ N° promedio de brotes	Δ N° promedio de hojas	Δ Longitud (mm)	Masa fresca promedio (mg)	Masa seca promedio (mg)
Inmersión temporal en RITA®	T1	8,14 bc	22,83 bcd	37,91 cd	178,86 bc	23,65 b c
	T2	12,18 ab	30,55 ab	60,87 bc	317,27 bc	40,12 bc
	T3	14,21 a	36,40 a	54,31 bcd	348,05 b	46,20 bc
	T4	7,24 bcd	21,40 bcd	38,70 cd	136,16 bc	20,01 bc
Inmersión temporal en BIT	T5	6,03 cd	12,99 de	47,84 bcd	210,46 bc	21,41 bc
	T6	7,31 bcd	16,06 cde	61,49 bc	162,47 bc	14,79 bc
	T7	12,41 ab	26,89 abc	75,91 b	418,35 b	47,42 ab
	T8	13,85 a	23,40 abcd	147,75 a	774,39 a	83,41 a
Control RITA®	T9	7,41 bc	17,64 bcde	44,65 cd	121,76 bc	10,69 c
Control BIT	T10	6,79 bcd	16,02 cde	33,36 cd	103,76 Bc	11,61 bc

NÚMERO DE HOJAS

En los sistemas BIT y RITA®, la inmersión por un periodo de 10 minutos cada ocho horas produjo el mayor número promedio de hojas, siendo mayor en el sistema RITA®. En cuanto al número de hojas regeneradas en las plántulas, se determinó que el tratamiento que presentó la mayor media 36,40 fue el T3 (10 minutos de inmersión cada ocho horas en RITA®); sin embargo, no se presentó diferencia significativa entre este tratamiento y los tratamientos T2 (10 minutos de inmersión, cada ocho horas, RITA®), con un promedio de 30,55 hojas y el T7 (10 minutos de inmersión, cada ocho horas, BIT), con 26,89 hojas promedio y el T8 (10 minutos cada 12 horas, BIT), con 23,40 hojas promedio producidas.

El número promedio de hojas es importante en *Stevia rebaudiana*, ya que los metabolitos secundarios de esta especie, los diterpenos glicósidos, que le confieren el sabor edulcorante, conocidos como esteviol glicósidos (esteviósido y rebaudiósidos) se acumulan en las hojas, en un rango de 4 a 20 % p/p en cultivos comerciales (15, 21), por lo que es de interés obtener plántulas con mayor número de hojas y mayor área foliar.

LONGITUD DE LAS PLÁNTULAS

El tratamiento que presentó el mayor promedio de longitud (147,74 mm), consistió en una inmersión de 10 minutos cada 12 horas en el sistema BIT. Produjo plantas de longitud casi 2,5 veces mayor al tratamiento en RITA®, de cinco minutos de inmersión cada 12 horas (T2). Estos dos tratamientos T2 y T8, presentaron diferencias significativas entre sí. Las plántulas regeneradas en el sistema BIT, mostraron una mayor vigorosidad. En el tratamiento inmersión de 10 minutos cada 12 horas, crecieron hasta el borde del frasco de cultivo. Probablemente las diferencias observadas entre los sistema BIT y RITA® estén relacionadas

con el tamaño efectivo del recipiente de cultivo para el crecimiento de las plantas, ya que, aunque los dos contenedores son de un litro de capacidad, en RITA®, se colocan los explantes sobre un soporte aproximadamente a la mitad del vaso de cultivo, teniendo las plantas el 50 % del espacio disponible para crecer unos 7,5 cm; en tanto, que el BIT no tiene soportes y los envases tienen una altura de 14,8 cm de altura, permitiendo un mayor crecimiento longitudinal de las plantas, lo que podría representar una ventaja del sistema BIT, si el objetivo del proceso es producir plantas de mayor tamaño aptas para la aclimatación.

La selección del sistema de inmersión a emplear, depende de la estrategia de la micropropagación a seguir. Por ejemplo, si se requiere mayor cantidad de brotes se podría utilizar un sistema de RITA® (T3) que requiere menos espacio y produce plantas de menor longitud pero con mayor número de brotes, si se desea obtener plantas con mayor longitud y vigorosidad para ser aclimatadas o llevadas directamente a campo, se puede elegir el sistema de BIT (T8).

ANÁLISIS DE MASA FRESCA

El mayor incremento en masa fresca obtenido fue de 774,39 mg en BIT, en el tratamiento T8 (10 minutos cada 12 horas). Este tratamiento fue estadísticamente diferente a todos los demás, con un nivel de confianza del 95 %.

ANÁLISIS DE MASA SECA

Los menores valores de masa seca se obtuvieron en los tratamientos control, el promedio mayor de masa seca de los tratamientos en RITA®, fue obtenido en el tratamiento que consistió en inmersiones de diez minutos cada ocho horas (T3); este superó más de cuatro veces a los promedios obtenidos en el control en RITA®. Sin embargo, no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos en RITA® (Tabla I).

En lo que respecta a los resultados de masa seca con el empleo del sistema BIT, el incremento de biomasa seca fue casi ocho veces mayor en el tratamiento de inmersión de diez minutos cada doce horas (T8), respecto al tratamiento control respectivo. Los tratamientos T8 y T7, que consistieron en una inmersión de 10 minutos cada ocho horas (Tabla I) mostraron diferencias significativas respecto a los otros tratamientos en BIT.

PRESENCIA DE CLOROFILA Y COLORACIÓN

En la Tabla II se observa el contenido de clorofila a y b de las plantas *in vitro* de *Stevia rebaudiana*. La coloración verde está asociada a la presencia de clorofila, esta medición se utiliza para determinar el estado fotosintético y las reacciones relacionadas con el proceso de fotosíntesis de las plantas (18).

Los colores entre 370 y 377 U corresponden a distintas tonalidades de verde, siendo el 377 U el más intenso, está presente en los tratamientos T1 (5 minutos cada ocho horas) y T3 (10 minutos cada ocho horas) de RITA®, T6 (5 minutos cada 12 horas) y T7 (10 minutos cada ocho horas) de BIT. El tratamiento T4 (10 minutos cada 12 horas, RITA®) presentó una coloración amarillenta, que corresponde al color 618U de la escala y el tratamiento T8 (10 minutos cada 12 horas, BIT) mostró una coloración verde-café (305-1U). Estos dos tratamientos tienen en común los tiempos de inmersión de mayor duración, diez minutos, y la frecuencia de inmersión a mayores intervalos de 12 horas, que corresponden a los mayores en duración y frecuencia que se evaluaron.

La alta concentración de clorofilas significa más centros de recolección de luz (LHC II) y por lo tanto, se presume que existe un mayor transporte de electrones, así como probablemente, una mayor tasa de fijación de CO₂. Las coloraciones de los tratamientos de inmersión por cinco minutos cada 8 y 12 horas (T5, T6), fueron verdes de mayor intensidad (22). Se reporta

que este sistema podría inducir a un comportamiento fotomixotrófico, como se ha probado en sistemas de inmersión temporal (BIT), en otras especies, como el plátano (CEMSA). En este cultivo se encontró que la inmersión completa, combinada con periodos de ausencia de medio de cultivo puede inducir cambios metabólicos en las hojas, entre ellos la pigmentación, que podría ofrecer a una forma de obtención de energía más favorable en la aclimatación (23).

Las plantas regeneradas en los sistemas de inmersión temporal, se caracterizaron por su apariencia vigorosa, con mayor grosor de tallo y área foliar, además presentaron un color verde intenso. Estas características se evidenciaron en los tratamientos de inmersión en vasos gemelos (BIT), T8 (10 minutos cada doce horas) y T7 (10 minutos cada ocho horas) y en el sistema de RITA® en el T2 (cinco minutos cada 12 horas).

HIPERHIDRICIDAD

La hiperhidricidad fue poco frecuente, se presentó en un 5 % de los explantes del tratamiento de RITA® T2 (cinco minutos cada 12 horas) y en dos de tratamientos de BIT, T5 (cinco minutos cada ocho horas) y T8 (10 minutos cada doce horas), se observó el 2,5 y el 5 % de hiperhidricidad, respectivamente. Por lo tanto, en BIT y en RITA®, la presencia de esta característica fue de 1,56 % de las plantas regeneradas, por lo que no representa un problema, como en las plantas crecidas en biorreactor de burbujeo, tratamiento incluido en los ensayos preliminares, no publicados en este artículo.

En otro estudio, se reportó la presencia de plantas hiperhídricas en el cultivo de *Stevia rebaudiana* en biorreactor giratorio de rodillo (24). En Jarras fermentadoras se determinó que no hubo presencia de hiperhidricidad, por el contrario, los brotes sumergidos en medio líquido mostraron mayor número de hojas, longitud de hojas y mayor tasa de multiplicación en comparación con explantes en medio semi-sólido (25).

Tabla II. Concentración de clorofila a, b y su respectiva relación en plantas *in vitro* de *Stevia rebaudiana*.

Sistema	Tratamiento	Clorofila (µg mL ⁻¹)			Coloración
		a	b	a/b	
RITA®	T1	5,71	3,00	1,90	377 U
	T2	8,05	4,11	1,96	376 U
	T3	8,27	4,02	2,06	377 U
	T4	2,11	1,40	1,51	618 U
BIT	T5	4,68	15,83	0,30	376 U y 370 U
	T6	0,56	1,11	0,50	377 U
	T7	7,08	5,37	1,32	377 U
	T8	1,16	2,40	0,48	305-1 U
Control RITA®	T9	0,99	5,63	0,18	376 U y 370 U
Control BIT	T10	3,80	6,10	0,62	376 U y 370 U

Los tratamientos en RITA® T3 (10 minutos de inmersión cada ocho horas, y BIT T8 (10 minutos de inmersión cada 12 horas) fueron los únicos que mostraron una diferencia estadística significativa en la producción promedio de brotes, respecto al tratamiento testigo que utilizó medio semi-sólido (Tabla I). Esto podría estar relacionado con los periodos de inmersión que fueron de 10 minutos en ambos tratamientos. Estos resultados difieren de los obtenidos por otros autores (16), quienes obtuvieron una mayor brotación en *Stevia rebaudiana* en todos los tratamientos que utilizaron medio de cultivo líquido estacionario o en agitación en matraces.

Según un estudio realizado en plátano (CEMSA), en Sistema de Inmersión Temporal (BIT), se determinó un aumento en el coeficiente de multiplicación y en la calidad de las plantas con respecto a otros sistemas de cultivo (23). Por otra parte, en otra investigación, se logró una mejora de la calidad morfológica de los brotes de plátano CEMSA ¼ cultivados en sistemas de inmersión temporal (26).

Resultados similares se observaron en este trabajo en sistemas BIT, en los tratamientos con inmersión de 10 minutos de duración T8 (cada doce horas) y T7 (cada ocho horas). En el T2 en RITA®, con inmersión de cinco minutos, cada 12 horas, se regeneraron plántulas de mayor calidad morfológica, con apariencia vigorosa, color verde intenso y mayor área foliar y tallos de mayor grosor. Así mismo, el cultivo de variedades de caña de azúcar (*Saccharum* sp), en sistemas de inmersión temporal estimuló la producción y el crecimiento de brotes (27). En otras especies, como *Ananas comosus* el empleo de inmersión temporal incrementó la producción de brotes y la masa seca de las plántulas^A.

Estudios realizados en *Caladium xhortulanum*, aráceo ornamental se obtuvo un coeficiente de multiplicación 12 veces mayor al obtenido en el cultivo en medios semi sólidos convencionales (28). Los resultados obtenidos en *S. rebaudiana* en este estudio coinciden con lo reportado en otras especies de plantas, ya que la tasa de multiplicación fue superior en la mayoría de los tratamientos de inmersión temporal empleados, respecto al sistema de cultivo convencional en medio semi sólido.

Probablemente el incremento en el número de brotes que se presentó con el empleo de los sistemas de inmersión temporal se relacione con el sistema de ventilación, ya que cada vez que el sistema inyecta aire al recipiente de cultivo durante la fase emergida se produce un intercambio de gases, especialmente de CO₂ y etileno que se volatilizan, estos gases inhiben

la multiplicación de brotes en muchas especies; por lo que, al realizarse un mayor número de inmersiones al día se favorece la ventilación y el intercambio de gases como el etileno y el CO₂ que al acumularse limitan la multiplicación de los brotes, razón por la cual es indispensable determinar la frecuencia de inmersión adecuada para cada especie. Autores aseguran que el tiempo de la fase de inmersión es muy importante, ya que determina la tasa de absorción de nutrientes y controla la hiperhidricidad. En este trabajo, los tiempos de inmersión de 10 minutos, tanto en RITA® como en BIT, indujeron la producción de brotes e incrementaron la masa seca y fresca de los explantes (29).

En este trabajo se obtuvo la producción masiva de plantas de mayor tamaño y peso, lo que incidió en la calidad de las plántulas regeneradas, además, con los sistemas de inmersión temporal se obtuvo un incremento del número de propágulos, que se pueden emplear en subcultivo, incrementando la tasa de micropropagación. Por otra parte, por tratarse de un proceso automatizado que provee condiciones de cultivo uniformes, el medio puede ser renovado fácilmente, sin tener que cambiar de contenedor, los medios de cultivo pueden esterilizarse por filtración, lo que disminuye el uso de autoclaves, se requiere de menos recipientes y se siembra una mayor cantidad de explantes por envase de cultivo.

Como se pudo comprobar en esta investigación, el empleo de cultivo *in vitro* de segunda generación, en numerosos sistemas de inmersión temporal, ofrece muchas ventajas en el proceso de micropropagación a escala de *Stevia rebaudiana*, planta de gran interés comercial.

CONCLUSIONES

La mayoría de los tratamientos en sistemas de inmersión temporal BIT y RITA® produjeron plantas vigorosas con bajos niveles de hiperhidricidad, mayor número promedio de hojas y brotes, así como un crecimiento activo con mayor masa seca promedio. El sistema de cultivo en RITA® T3, con inmersión de 10 minutos cada ocho horas indujo la regeneración de plantas *de novo* con valores promedio de número de brotes, número promedio de hojas, longitud de tallos, masa fresca y seca superiores al tratamiento control (T9).

El tratamiento T8, BIT con inmersión durante 10 minutos, cada 12 horas, produjo la regeneración de plantas con siete veces mayor masa fresca y seca, promedio, respecto al control (T10) además mostró los mayores índices promedio de brotes. En cuanto al incremento en longitud, el tratamiento T8 presentó diferencia significativa respecto a los demás tratamientos.

^A Escalona, M. *Propagación de la piña (Ananas comosus (L.) Merr.) en biorreactores de inmersión temporal* [Tesis de Doctorado], Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas, Santa Clara, Cuba, 1999, p. 94.

En este trabajo, el mayor crecimiento de los explantes y el incremento en la inducción de brotes, se produjo en los dos sistemas de inmersión temporal (RITA® y BIT), en los tratamientos con tiempos de inmersión de 10 minutos de duración, lo que podría ser un factor a considerar en el cultivo a escala de *Stevia rebaudiana* en sistemas de inmersión temporal.

AGRADECIMIENTOS

Las investigadoras agradecen el apoyo financiero de la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica y de la Comisión de Incentivos CONICIT-MICIT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-Ministerio de Ciencia y Tecnología de Costa Rica), que hicieron posible el desarrollo de la investigación.

Además, se agradece a la Ing. Karol Jiménez por la colaboración en la ejecución de los ensayos preliminares y el análisis de los resultados.

BIBLIOGRAFÍA

- Sairkar, P.; Chandravanshi, M.K.; Shukla, N.P.; Mehrotra, N.N. y others "Mass production of an economically important medicinal plant *Stevia rebaudiana* using *in vitro* propagation techniques", *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 3, no. 4, 2009, pp. 266–270, ISSN 1996-0875.
- Ohja, A.; Sharma, V.N. y Sharma, V. "An efficient protocol for *in vitro* clonal propagation of natural sweetener plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni)", *African Journal of Plant Science*, vol. 4, no. 4, 2010, pp. 319–321, ISSN 1996-0824.
- Wölwer-Rieck, U. "The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: a review", *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 60, no. 4, 2012, pp. 886–895, ISSN 1520-5118.
- Ohta, M.; Sasa, S.; Inoue, A.; Tamai, T.; Fujita, I.; Morita, K. y Matsuura, F. "Characterization of Novel Steviol Glycosides from Leaves of *Stevia rebaudiana* Morita", *Journal of Applied Glycoscience*, vol. 57, no. 3, 2010, pp. 199-209, ISSN 1344-7882, DOI 10.5458/jag.57.199.
- Thiyagarajan, M. y Venkatachalam, P. "Large scale *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* (bert) for commercial application: Pharmaceutically important and antidiabetic medicinal herb", *Industrial Crops and Products*, vol. 37, no. 1, mayo de 2012, pp. 111-117, ISSN 0926-6690, DOI 10.1016/j.indcrop.2011.10.037.
- Philippe, R.N.; De Mey, M.; Anderson, J. y Ajikumar, P.K. "Biotechnological production of natural zero-calorie sweeteners", *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 26, abril de 2014, (ser. Food biotechnology Plant biotechnology), pp. 155-161, ISSN 0958-1669, DOI 10.1016/j.copbio.2014.01.004.
- Sergio, G.G.; Yolanda, M.O.; Genovevo, R.J.; César, M.L. y Ildelfonso, A.B.W. *Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) un cultivo con potencial productivo en México* [en línea], 1.ª ed., edit. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Merida, Yucatán, México, 2011, p. 88, ISBN 978-607-425-685-7, [Consultado: 21 de marzo de 2015], Disponible en: <<http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/xmlui/handle/123456789/3234>>.
- Khalil, S.A.; Zamir, R. y Ahmad, N. "Selection of suitable propagation method for consistent plantlets production in *Stevia rebaudiana* (Bertoni)", *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 21, no. 6, diciembre de 2014, pp. 566-573, ISSN 1319-562X, DOI 10.1016/j.sjbs.2014.02.005.
- Alhady, M.R.A.A. "Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni—a new sweetening crop in Egypt", *Global Journal of Biotechnology & Biochemistr*, vol. 6, no. 4, 2011, pp. 178–182, ISSN 2078-466X.
- Mehrotra, S.; Goel, M.K.; Kukreja, A.K. y Mishra, B.N. "Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization", *African Journal of Biotechnology*, vol. 6, no. 13, 2007, ISSN 1684-5315, DOI 10.4314/ajb.v6i13.57591, [Consultado: 21 de marzo de 2015], Disponible en: <<http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/57591>>.
- Watt, M.P. "The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation", *African Journal of Biotechnology*, vol. 11, no. 76, 20 de septiembre de 2012, ISSN 16845315, DOI 10.5897/AJB12.1693, [Consultado: 21 de marzo de 2015], Disponible en: <<http://www.academicjournals.org/ajb/abstracts/abs2012/20Sept/Watt.htm>>.
- Berthouly, M. y Etienne, H. "Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation" [en línea], eds. Hvoslef-Eide, A.K. y Preil, W., *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, edit. Springer Netherlands, 2005, pp. 165-195, ISBN 978-1-4020-3199-1, [Consultado: 21 de marzo de 2015], Disponible en: <http://link.springer.com/chapter/10.1007/1-4020-3200-5_11>.
- Murashige, T. y Skoog, F. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures", *Physiologia Plantarum*, vol. 15, no. 3, 1 de julio de 1962, pp. 473-497, ISSN 1399-3054, DOI 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Lichtenthaler, H.K. "Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes.", *Methods in Enzymology*, vol. 148, 1987, pp. 350-382, ISSN 1557-7988, DOI 10.1016/0076-6879(87)48036-1.
- Preil, W. "General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture" [en línea], eds. Hvoslef-Eide, A.K. y Preil, W., *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, edit. Springer Netherlands, 2005, pp. 1-18, ISBN 978-1-4020-3199-1, [Consultado: 21 de marzo de 2015], Disponible en: <http://link.springer.com/chapter/10.1007/1-4020-3200-5_1>.

16. Javad, S.; Naz, S.; Ilyas, S.; Ali, A.; Aslam, F. y Munir, N. "Study of the effect of physical state of medium and different concentrations of sucrose, ferric ethylenediamine-tetraacetic acid (FeEDTA) and CuSO₄ in enhancing the micropropagation system of *Stevia rebaudiana*", *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 6, no. 9, 2012, pp. 1800–1805, ISSN 1996-0875, DOI 10.5897/JMPR11.1655.
17. Takayama, S. y Akita, M. "The types of bioreactors used for shoots and embryos", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 39, no. 2, 1 de noviembre de 1994, pp. 147-156, ISSN 0167-6857, 1573-5044, DOI 10.1007/BF00033922.
18. Jain, P.; Kachhwaha, S. y Kothari, S.L. "Improved micropropagation protocol and enhancement in biomass and chlorophyll content in *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni by using high copper levels in the culture medium", *Scientia Horticulturae*, vol. 119, no. 3, 3 de febrero de 2009, pp. 315-319, ISSN 0304-4238, DOI 10.1016/j.scienta.2008.08.015.
19. Das, A.; Gantait, S. y Mandal, N. "Micropropagation of an elite medicinal plant: *Stevia rebaudiana* Bert", *International Journal of Agricultural Research*, vol. 6, no. 1, 2011, pp. 40–48, ISSN 1816-4897, DOI 10.3923/ijar.2011.40.48.
20. Hassanen, S.A. y Khalil, R. "Biotechnological studies for improving of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) *in vitro* plantlets", *Middle-East Journal of Scientific Research*, vol. 14, no. 1, 2013, pp. 93–106, ISSN 1990-9233, DOI 10.5829/idosi.mejsr.2013.14.1.194.
21. Puri, M.; Sharma, D. y Tiwari, A.K. "Downstream processing of stevioside and its potential applications", *Biotechnology Advances*, vol. 29, no. 6, noviembre de 2011, pp. 781-791, ISSN 0734-9750, DOI 10.1016/j.biotechadv.2011.06.006.
22. González, M.; Mogollón, N.; Alvarado, G.; Giménez, A. y Capote, T. "Efecto del medio de cultivo *in vitro* y la fuente nitrogenada sobre el crecimiento del cocuy (*Agave cocui* Trelease)", *Bioagro*, vol. 24, no. 1, 2012, pp. 39–44, ISSN 1316-3361.
23. Aragón, C.E.; Escalona, M.; Capote, I.; Cejas, Inaudis.; Rodríguez, R.; Sandoval, J.; Roels, S.; Debergh, P. y González-Olmedo, J.L. "Aspectos metabólicos del crecimiento y desarrollo de las plántulas de plátano (CEMSA ¾) micropropagadas en biorreactores de inmersión temporal (BIT)", *Cultivos Tropicales*, vol. 27, no. 1, 2006, pp. 39-44, ISSN 0258-5936.
24. Bondarev, N.; Reshetnyak, O. y Nosov, A. "Features of Development of *Stevia rebaudiana* Shoots Cultivated in the Roller Bioreactor and their Production of Steviol Glycosides", *Planta Medica*, vol. 68, no. 8, agosto de 2002, pp. 759-762, ISSN 00320943, 14390221, DOI 10.1055/s-2002-33809.
25. Kalpana, M.; Anbazhagan, M. y Natarajan, V. "Utilization of liquid medium for rapid micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni", *Journal of Ecobiotechnology*, vol. 1, no. 1, 2009, pp. 16–20, ISSN 20770464.
26. Roels, S.; Escalona, M.; Cejas, I.; Noceda, C.; Rodríguez, R.; Canal, M.J.; Sandoval, J. y Debergh, P. "Optimization of plantain (*Musa AAB*) micropropagation by temporary immersion system", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 82, no. 1, 1 de julio de 2005, pp. 57-66, ISSN 0167-6857, 1573-5044, DOI 10.1007/s11240-004-6746-y.
27. De Feria, M.; Jiménez, E. y Chávez, M. "Empleo de sistemas de inmersión temporal para la multiplicación *in vitro* de brotes de *Saccharum* spp. var", *Biología Vegetal*, vol. 2, no. 3, 2002, pp. 143-147, ISSN 1609-1841.
28. Daquinta, M.; Mosqueda, O.; González, M.T.; Benega, R. y Teixeira da Silv, J. "Shoot Proliferation of *Caladium x hortulanum* in a Temporary Immersion System", *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, vol. 1, no. 1, 2007, pp. 70-72, ISSN 1749-0294.
29. Etienne, H. y Berthouly, M. "Temporary immersion systems in plant micropropagation", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 69, no. 3, 1 de junio de 2002, pp. 215-231, ISSN 0167-6857, 1573-5044, DOI 10.1023/A:1015668610465.

Recibido: 15 de mayo de 2014

Aceptado: 12 de septiembre de 2014

¿Cómo citar?

Alvarenga Venutolo, Silvana y Salazar Aguilar, Tatiana. Micropropagación masiva de *Stevia rebaudiana* Bertoni en sistemas de inmersión temporal. [en línea]. *Cultivos Tropicales*, 2015, vol. 36, no. 3, pp. 50-57. ISSN 1819-4087. [Consultado: ____]. Disponible en: <-----/>