

# Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un endulzante natural a través de explantes con meristemas pre-existentes

## Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni, a natural sweetener, through pre existing meristem explants

Isidro E. Suarez\*, Irma R. Quintero\*\*

### Resumen

Las hojas de *Stevia rebaudiana* son fuente de esteviosidos y rebaudiosidos, sustancias endulzantes con bajo contenido calórico. La propagación sexual y clonal de estevia es difícil debido a la calidad de la semilla y el tamaño reducido de la planta. Para evaluar la multiplicación, brotes establecidos *in vitro* fueron cultivados en 1/2 MS con cinco concentraciones de BAP (0.0, 2.22, 4.44, 8.88 y 17.6 µM). Posteriormente, los tallos multiplicados se subcultivaron en presencia de cinco concentraciones de ANA (0.0, 2.69, 5.37, 10.74 de 21.48 µM) para evaluar enraizamiento. Finalmente, tallos multiplicados sin enraizar, tratados o no con 0.4% de ANA, y otros enraizados *in vitro* fueron transferidos a condiciones *ex vitro*. Todos los experimentos fueron distribuidos usando un DCA. Los resultados indicaron que el medio 1/2MS adicionado con BAP indujo una mayor tasa de multiplicación. 10.74 µM de ANA indujo el mejor enraizamiento; sin embargo, los tallos sin enraizamiento resultaron en la mayor supervivencia *ex vitro*.

**Palabras clave:** estevia, esteviosido, micropropagación, reguladores de crecimiento vegetal.

### Abstract

*Stevia rebaudiana* Bertoni leaves are source of stevioside and rebaudioside, non-caloric sweetener substances. Seed and cutting estevia propagation is difficult due to seed sterility and small size plant, respectively. To evaluate shoot proliferation, *in vitro*-established estevia shoots were cultured in 1/2 MS with five (0.0, 2.22, 4.44, 8.88 and 17.6 µM) BAP levels. Thereafter, proliferated shoots were cultured on 1/2 MS with five NAA levels (0.0, 2.69, 5.37, 10.74 and 21.48 µM) to evaluate shoot rooting. Finally, non-rooted shoots, *in vitro*-rooted shoots and non-rooted shoots treated with a 0.4% NAA powder were transferred to *ex vitro* conditions. All experiments were distributed using a complete randomized design. The data indicated that BAP treated shoots showed a higher rate of shoot proliferation. An 87% of rooting and higher number of roots per explant was achieved with 10.74 µM of NAA. Non-rooted shoots transferred directly from Stage II showed the best survival rate.

**Key words:** Stevia, stevioside, micropropagation, plant growth regulator.

**Recibido:** febrero 15 de 2013

**Aprobado:** abril 4 de 2014

### Introducción

*Stevia rebaudiana* (Asteraceae) es fuente de esteviosidos y rebaudiosidos, unos glucósidos de diterpenos no tóxicos y no mutagénicos usados comercialmente como edulcorantes naturales bajos en calorías y propicios para pacientes diabéticos ya que no aumentan los niveles de glucosa en la sangre (Kinghorn y Soejarto, 1986; Ishima y Katayama, 1976; Tanaka, 1982; Matsui et al., 1996; Brandle, 2000). La propagación sexual de estevia es difícil debido a los bajos porcentajes de

germinación, dificultad para cosechar la semilla y los altos grados de variabilidad genética (Toffler y Orio, 1981). Alternativamente, el hábito de crecimiento y el tamaño limitado de la planta hacen la propagación por estacas lenta e ineficiente para producir grandes cantidades de plantas (Sakaguchi y Kan, 1992; Machado y Zaidan, 1995). La micropropagación ha mostrado ser un método que garantiza alta eficiencia y gran estabilidad genética en las plantas producidas; sin embargo, los estudios en producción masiva *in vitro* de plantas

\* Universidad de Córdoba, Departamento de Ingeniería Agronómica y Desarrollo Rural, Carrera 6 No. 76-103. Montería-Colombia. isuarez@sinu.unicordoba.edu.co. Fax: (57-1) (4) 786 0255

\*\* MSc. Universidad del Magdalena. Carrera 32 No. 22 - 08. Santa Marta - Colombia.

de estevia son limitados (Tamura *et al.*, 1984; Beshpalhok *et al.*, 1992), y las publicaciones recientes enfatizan la necesidad de técnicas para la producción *in vitro* de los esteviosidos y rebaudiosidos (Akita *et al.*, 1994; Bondarev *et al.*, 2001; Bondarev *et al.*, 2003) o incremento del material vegetativo vía organogénesis (Bondarev *et al.*, 2003; Jain *et al.*, 2009). El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar un método eficiente para producir masivamente plantas de estevia en condiciones *in vitro* mediante el cultivo de explantes con meristemos pre-existentes.

## Materiales y métodos

### Material vegetativo

Los explantes fueron colectados a partir de plantas de estevia variedad Morita I de aproximadamente dos meses de edad y en estado de desarrollo vegetativo plantadas en la Granja Experimental de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Córdoba, Montería – Colombia (8° 52" LN y 76° 48" LO). Las plantas fueron mantenidas en eras alzadas con incidencia controlada de luminosidad (polisombra del 50%) y riegos diarios por aspersión.

### Establecimiento y multiplicación

Los explantes, consistentes de segmentos de tallos con un par de yemas axilares (1.0 – 2.0 cm), fueron trasladados al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Córdoba (Montería – Colombia, 8° 52" LN y 76° 48" LO). Una vez enjuagados con agua potable por aproximadamente media hora, fueron desinfectados superficialmente con 1.25% hipoclorito de sodio por 15 minutos, enjuagados tres veces con agua estéril y establecidos en medios de 1/2 (MS) Murashige y Skoog (1962) y suplementado (en mg L<sup>-1</sup>) con sacarosa (30,000), myo-inositol (100), tiamina HCl (0.4) y TC-agar (Sigma®) (6,000), con cambios a medio fresco de la misma formulación cada tres semanas.

Los explantes, de 1.0 a 1.5 cm de longitud, se establecieron *in vitro* en medio 1/2 MS adicionado con cinco concentraciones de benzilaminopurina (BAP) (0.0, 2.22, 4.44, 8.88 y 17.6 µM). Estos fueron incubados durante cuatro semanas, al final de los cuales se evaluaron las variables de respuesta; tasa de multiplicación (número de nuevos brotes por explante), longitud promedio de los brotes (mm) y el número de nuevas hojas por planta producidas.

### Enraizamiento y aclimatización

Los tallos multiplicados fueron independientemente subcultivados durante cuatro semanas en 1/2 MS con cinco concentraciones (0.0, 2.69, 5.37, 10.74 y 21.48 µM) de ácido naftalenacético (ANA). Al final de perío-

do del cultivo se evaluó el porcentaje de enraizamiento, el número de raíces por tallo y la longitud promedio de raíces de cada tratamiento.

Los tallos enraizados *in vitro* y sin enraizar que se obtuvieron en la fase de multiplicación (sin tratamiento adicional o tratados con polvo enraizador al 0.4% de ANA en la base), fueron trasplantados en una mezcla de sustrato 1:1 (suelo:arena) contenida en bandejas plásticas de 30 alveolos cada una. Un total de 200 tallos por cada tratamiento fueron establecidos (600 unidades experimentales), los cuales fueron mantenidos cubiertos con una polisombra del 50% y con riego permanente durante ocho semanas, al final de las cuales se registró el número de plantas adaptadas a condiciones *ex vitro*.

### Consideraciones generales

El pH de todos los medios fue ajustado a 5.7-5.8 previo a la adición del agar y esterilizado a 121 °C y 1.1 kg-f cm<sup>2</sup> por 15 min. Los cultivos fueron mantenidos a 25 °C, con 12 horas de luz diaria (40 µM m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Los tratamientos de los experimentos *in vitro* fueron distribuidos con un diseño completamente al azar con 15 repeticiones por tratamiento, cada repetición consistió de un explante establecido en un recipiente y cada experimento fue repetido una vez. Los datos fueron analizados con un análisis de varianza con base en el modelo estadístico  $Y_{ij} = \mu + a_i + \varepsilon_{ij}$ , donde  $\mu$  es el promedio general,  $a_i$  fue el efecto de los reguladores BAP o ANA y  $\varepsilon_{ij}$  el efecto del error experimental. Los promedios fueron separados con la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

## Resultados

### Multiplicación

Los nuevos brotes crecieron a partir de los meristemos axilares presentes en los explantes (figura 1a y 1b). El análisis de varianza ( $Pr = 0.017$ ) y la separación de medias muestra que la presencia de BAP en el medio de cultivo incrementa significativamente el número de nuevos brotes producidos por cada explante en comparación al tratamiento control, alcanzándose un promedio máximo de 5.5 nuevos brotes por cada explante cuando el medio 1/2 MS es adicionado con 8.8 µM de BAP (tabla 1). Con la variable longitud de brotes, existieron diferencias significativas entre los tratamientos con y sin fitohormona, siendo el tratamiento control donde la longitud de los brotes resultó significativamente mayor ( $Pr = 0.0014$ ) comparado con aquellos desarrollados en los tratamientos suplementados con BAP (tabla 1). Con la variable número de hojas se encontraron diferencias significativas ( $Pr = 0.0150$ ) entre tratamientos siendo la menor concentración (BAP 2,22 µM) la que registró un valor significativamente mayor con 30.30 hojas por vitroplanta producida. A mayor

concentración de BAP se observa una disminución del número de hojas aunque para las concentraciones de 4.44 y 8.88  $\mu\text{M}$  de BAP el nivel de significancia es igual.

### Enraizamiento y aclimatización

El crecimiento de raíces adventicias ocurrió en todos los tratamientos (figura 1c); sin embargo, el mayor porcentaje de enraizamiento (87%) se registró en presencia de 10.74  $\mu\text{M}$  de ANA (tabla 2). El ANOVA permitió detectar diferencias estadísticas ( $P < 0.001$ ), mientras que la prueba de Tukey mostró que la presencia de 10.74  $\mu\text{M}$  de ANA en el medio indujo el mayor número de raíces por tallo. Diferencias significativas fueron igualmente detectadas ( $P < 0.0001$ ) con la variable longitud de raíces (tabla 2); sin embargo, las diferencias entre el tratamiento sin y con enraizador fueron mínimas, mostrando que el enraizamiento *in vitro* no fue necesario para la adaptación *ex vitro* de las plantas micropropagadas (figura 1d). El 67% de los tallos micropropagados sin enraizar y sin tratamiento exógeno con enraizador lograron adaptarse a condiciones *ex vitro*, seguido por los tallos enraizados *in vitro* (50% de supervivencia), mientras que solo el 33% de los tallos sin enraizar y tratados con 0.4% de ANA sobrevivieron.

### Discusión

Se determinó una tasa de multiplicación de 5.5 nuevos brotes por explante con la concentración de 8.88  $\mu\text{M}$  de BAP adicionado al medio de cultivo, lo cual representa un incremento en la tasa de multiplicación con una disminución en la concentración utilizada en estudios previos. Tamura *et al.*, (1984) reportaron el desarrollo de uno a tres nuevos brotes por explante de las mismas características cultivados en presencia de 9.29  $\mu\text{M}$  de kinetina y una tasa menor de multiplicación cuando la misma cantidad de kinetina fue utilizada en combinación con 1.07  $\mu\text{M}$  de ANA. Un comportamiento similar en cuanto a disminución de la tasa de multiplicación fue observado con la interacción ANA y

BAP utilizada para multiplicar brotes obtenidos a partir de explantes con meristemos pre-existentes (Suárez *et al.*, 2006). Sivaran y Mukundan (2003), trabajando con la variedad Morita II, reportaron una mayor tasa de multiplicación en presencia de 4.44 o 8.88  $\mu\text{M}$  de BAP registrando 6.3 y 8.5 nuevos brotes por explante, respectivamente, superando las tasas de multiplicación del presente estudio; sin embargo, en el actual estudio se registró una respuesta morfogénica más rápida obteniendo brotes de *Stevia rebaudiana* en menor tiempo. Bondarev *et al.* (2003) reportan que al comparar el efecto de 6.66  $\mu\text{M}$  de BAP solo o en combinación con 8.05  $\mu\text{M}$  de ANA en el medio de cultivo no se encontraron diferencias significativas; sin embargo, cuando se comparan estos tratamientos con el tratamiento control sin suministro de reguladores de crecimiento se obtiene un incremento de 1.5 veces en el número de nuevos brotes. Esto muestra que la interacción de ANA y BAP incide favorablemente no solo en el número de brotes/explante, sino también en el incremento del tamaño de los brotes producidos, lo cual contrasta con lo reportado por los resultados de Suárez *et al.* (2006) donde se observa una disminución significativa de la longitud de los tallos cuando BAP y ANA son combinados en el medio de cultivo. Anbazhagan *et al.* (2010) observaron una tasa de multiplicación de ocho nuevos tallos producidos a partir de explantes nodales con yemas axilares cultivados en un medio con 4,44  $\mu\text{M}$  de BAP y 8.05  $\mu\text{M}$  de ANA en un período de 40 días de cultivo. En la presente investigación se observó una disminución en la longitud de los tallos producidos en presencia de BAP, la cual se agudiza con el incremento de la dosis de esta fitohormona. Efectos similares fueron registrados por Bondarev *et al.* (2003) cuando adicionaron BAP en el medio.

Recientemente, Jain *et al.* (2009) reportaron incrementos significativos hasta de seis nuevos brotes caulinares a partir de explantes consistentes de hojas de estevia cuando estas fueron establecidas en medios suplidos

**Tabla 1.** Efecto de diferentes concentraciones de BAP sobre la multiplicación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

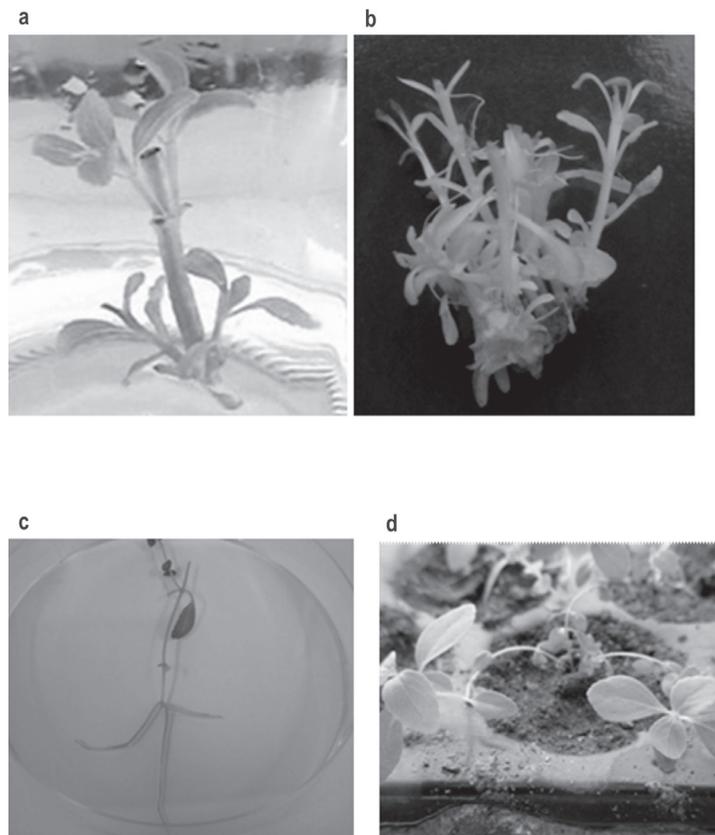
BAP ( $\mu\text{M}$ )	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número de hojas
0.00	1.78 b	6.21 a	15.11 b*
2.22	4.86 a	1.53 b	30.30 a
4.44	4.89 a	1.96 b	21.70 ab
8.88	5.50 a	1.95 b	21.00 ab
17.76	4.60 a	1.64 b	18.00 b
Media	4.32	2.66	21.22
$r^2$		0.93	0.88
C.V.		3.23	5.17

\* Valores con la misma letra dentro de columnas no difieren significativamente (Tukey  $P \leq 0.05$ )

**Tabla 2.** Efecto de diferentes concentraciones de ANA sobre el enraizamiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

ANA ( $\mu\text{M}$ )	Enraizamiento (%)	Número de raíces por tallo	Longitud de raíces (cm)
0.00	60	1.20 b	2.79 a
2.69	77	2.80 ab	2.87 a
5.37	80	2.46 ab	2.37 b
10.74	87	4.07 a	2.82 a
21.48	40	1.13 b	2.42 b
Media	68.8	2.33	2.25
$r^2$		0.89	0.91
C.V.		5.42	4.96

Valores con la misma letra dentro de columnas no difieren significativamente (Tukey  $P \leq 0.05$ )



**Figura 1.** Micropropagación de estevia: **a:** Establecimiento de explantes; **b:** Multiplicación de propágulo; **c:** Enraizamiento *in vitro*; **d:** Adaptación *ex vitro*.

con concentraciones de  $\text{CuSO}_4$  cinco veces por encima de la cantidad normal del medio MS. Estos resultados pueden considerarse en futuros estudios para incrementar las tasas de multiplicación a partir de explantes con meristemos pre-existentes.

Similarmente a lo observado en la presente investigación, reportes anteriores muestran poca correlación con respecto a los efectos de la presencia de BAP u otros reguladores sobre la producción de hojas *in vitro* de estevia (Sivaran y Mukundan, 2003; Bondarev *et al.*, 2003).

De acuerdo con los resultados, un incremento en el suministro de ANA favorece un mejor enraizamiento de los brotes micropropagados. Esto contrasta con lo reportado por Bondarev *et al.* (2003) quienes no observaron diferencias en el enraizamiento *in vitro* de estevia con ANA. A diferencia de Sivaran y Mukundan (2003) quienes reportaron un 100% de enraizamiento y un promedio de 12 raíces por tallo con  $4.9 \mu\text{M}$  de ácido indolbutírico (AIB), indicando que posiblemente el AIB tiene un mayor efecto auxínico sobre el enrai-

zamiento *in vitro* de estevia. Los resultados obtenidos en la fase de adaptación de plantas a las condiciones *ex vitro*, permiten obviar el estado de enraizamiento *in vitro*, lo cual permitiría reducir significativamente los costos y los riesgos de pérdida de material *in vitro*, como lo refieren Martin *et al.* (2003 y Lara *et al.* (2003). Los resultados permiten estimar una producción aproximada de  $4.5 \times 10^6$  nuevas plantas a partir de un solo explante en un año.

## Agradecimientos

Los autores del presente trabajo expresan sus agradecimientos a la Universidad de Córdoba y a la División de Investigaciones por su apoyo en la realización del presente estudio.

## Referencias bibliográficas

- Akita, M.; Shigeoka, T.; Koizumi, Y.; Kawamura, M. 1994. Mass propagation s shoots of *Stevia rebaudiana* using a large scale bioreactor. *Plant Cell Reports*. 13:180-183.
- Anbazhagan, M.; Kalpana, M.; Rajendran, R.; Natarajan, V.; Dhanaivel, D. 2010. *In vitro* production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 22(3):216-222
- Bespalhok, J.; Hashimoto, J.; Vieira, L. 1992. Factores influenciando a micropropagação *in vitro* de gemas axilares de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 4:59-61.
- Bondarev, N.; Reshetnyak, O.; Nosov, A. 2003. Effect of nutrient media composition on development of *Stevia rebaudiana* shoots cultivated in the roller bioreactor and their production of steviol glycosides. *Plant Science*. 165:845-850.
- Bondarev, N.; Reshetnyak, O.; Nosov, A. 2001. Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Sciences*. 161:155-163.
- Brandle, J. *Stevia*. Natures natural low calorie sweetener. [http://res2.agr.ca/London/faq/stevia\\_e.htm](http://res2.agr.ca/London/faq/stevia_e.htm). [Accedido el: 06-25-2006]
- Ishima, N.; Katayama, O. 1976. Sensory evaluation of stevioside as sweetener. *Reports National Food Research Institute*. 31:80-85.
- Jain, P.; Kachhwaha, S.; Kothari, S. 2009. Improved micropropagation protocol and enhancement in biomass and chlorophyll content in *stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni by using high sopper levels in the culture medium. *Scientia Horticulturae*. 119:315-319
- Kinghorn, A.; Soejarto, D. 1986. Sweetening agents fo plant origin. *Critical Review Plant Sciences*. 4:79-120.
- Lara, A.; Valverde, R.; Gomez, L.; Hidalgo, A. 2003. Micropropagación de la planta medicinal *Psychotria acuminata*. *Agronomía Costaricense*. 27:7-20.
- Machado, M.; Zaidan, L. 1995. Propagation of *Stevia rebaudiana* from stem cuttings. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 30:201-206.
- Martin, K.; Beena, M.; Joseph, D. 2003. High frequency axillary bud multiplication and ex vitro rooting of *Wedelia chinensis* (Osbeck) Merr.–a medicinal plant. *Indian Journal of Experimental Botany*. 42:262-266.
- Matsui, M.; Matsui, K.; Kawasaki, Y.; Oda, Y.; Noguchi, T.; Kitagawa, M.; Sawada, M.; Hayashi, M.; Nohmi, T.; Yoshihira, K.; Ishidate, M.; Sofuni, T. 1996. Evaluation of the genotoxicity of stevioside and setviol using six *in vitro* and one *in vivo* mutagenicity assays. *Mutagenesis*. 11:573-579.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15:473-497.
- Sakaguchi, R.; Kan, T. 1982. Japanese studies on *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni and steviosida. *Ci Culture*. 34:235-248.
- Sivaran, L.; Mukundan, U. 2003. *In vitro* culture studies on *Stevia rebaudiana*. *In Vitro Cell and Developmental Biology-Plant*. 39:520-523.
- Suarez, I.; Espitia, M.; Quintero, I. 2006. Efecto de auxinas y citocininas en la multiplicación y enraizamiento de *Stevia rebaudiana*. *Fitotecnica Colombiana*. 2006; 6(2):1-8.
- Tamura, Y.; Nakamura, S.; Fukui, H.; Tabata, M. 1984. Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni by stem-tip culture. *Plant Cell Reports*. 3:183-185.
- Tanaka, O. 1982. Steviol-glycosides: new natural sweeteners. *Trends Anal Chemistry*. 1:246-248.
- Toffler, F.; Orio, A. 1981. Acceni sulla piñata tropicale 'Kaa-he-e' ou dolce'. *Rev. Soc. It. Sci. Aliment*. 4:225-230.