

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**



**TESIS DE GRADO**

**ADAPTACIÓN DE VITROPLANTAS DE STEVIA (*Stevia rebaudiana*) A  
CUATRO SUSTRATOS ABONADOS BAJO AMBIENTE PROTEGIDO**

Patricia Leonor Peralta Fernández

La Paz, Bolivia  
2007

Universidad Mayor de San Andrés  
Facultad de Agronomía  
Carrera de Ingeniería Agronómica

**ADAPTACIÓN DE VITROPLANTAS DE STEVIA (*Stevia rebaudiana*) A  
CUATRO SUSTRATOS ABONADOS BAJO AMBIENTE PROTEGIDO**

*Tesis de Grado presentado como requisito  
parcial para optar el Título de  
Ingeniera Agrónoma*

Patricia Leonor Peralta Fernández

**Asesores:**

Dr. Vladimir Orsag Céspedes

\_\_\_\_\_

Ing. Edgar Gómez Villalba

\_\_\_\_\_

**Comité Revisor:**

Dr. David Cruz Choque

\_\_\_\_\_

Dr. Alberto Figueroa Soliz

\_\_\_\_\_

**APROBADA**

**Presidente:**

\_\_\_\_\_

## DEDICATORIA

*Quiero dedicar el presente trabajo, a las personas que me dieron el mejor regalo que es la vida: a mi mami Leonor Vda. de Peralta por tu esfuerzo, valor, dedicación y apoyo constante.  
A la memoria de mi padre Valerio Peralta Vera por que el recuerdo que conservo de ti, es tu amor incondicional.  
A mis hermanas y hermanos.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Mayor de San Andrés y en especial a la Facultad de Agronomía y con ella a todo su plantel de docentes por mi formación académica.

Por la colaboración brindada agradezco al Instituto de Genética y Biotecnología Vegetal en especial a la Dr. Maria Eugenia Ascarrunz.

Por el tiempo dedicado, por toda su paciencia y correcciones acertadas quiero agradecer a mis asesores: al Dr. Vladimir Orsag Céspedes y al Ing. Edgar Gómez Villalba.

Por su dedicación y correcciones para enriquecer el presente trabajo de investigación, agradezco a los señores revisores de tesis: Dr. David Cruz Choque y Dr. Alberto Figueroa Soliz.

Un agradecimiento especial a la Ing. Esther López Siangas por su colaboración incondicional en la elaboración del proyecto.

Agradezco al mejor amigo de mi vida universitaria el Sr. Juan Carlos Siácara, un millón de gracias por tu afecto, comprensión y colaboración en todo momento.

Por darme todas sus enseñanzas que formaron mi carácter agradezco a mis profesores Rosario Huerta y Luis Zamorano, gracias por brindarme las armas para vivir feliz.

A todas las amigas y amigos que me ofrecieron su amistad sincera y desinteresada mil gracias, principalmente a: Liliam, Gisela, Patty, Marcela, Carmen, Jacky, Brigida, Fátima, Diercina, Juana, Cristina, Chela, Sandra, Max, Julio, Víctor, Iván, José, Richard, Franklin, Williams, José Luis, Rubén, Freddy, Alcides, Rosendo, Carlos Alberto y Jaime.

## RESUMEN

La stevia es una planta herbácea originaria del Paraguay, de ella se puede extraer un edulcorante llamado steviósido el cual en estado puro y cristalino es 300 veces más dulce que el azúcar de caña. Debido a sus propiedades medicinales y su sabor dulce ha sido muy utilizada para aliviar muchos malestares. La raíz es la única parte de la planta que no tiene dulce, después tallos, ramas y principalmente hojas tienen alto contenido de steviósido. La dificultad que tiene esta especie es el bajo porcentaje de germinación de sus semillas este alcanza solo a un 40%, por ello se justifica la reproducción *in vitro*. Es utilizada como condimento, también es utilizada en infusiones y sus hojas se consumen en forma de té. En la medicina se utiliza para estimular la secreción de insulina, regula la cantidad de azúcar en la sangre de las personas diabéticas. En la industria se la está utilizando para endulzar dulces, chicles, gaseosas, dentífricos y medicamentos en general.

El presente trabajo fue desarrollado con el objetivo de evaluar la adaptabilidad de la *Stevia rebaudiana* obtenida a través del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* a cuatro sustratos abonados bajo condiciones protegidas. La preparación del medio nutritivo (Murashig Skoog) y la micropropagación se llevó a cabo en laboratorio este último consistió en segmentar una vitroplanta en una cámara de flujo laminar y multiplicar su número, partiendo de 30 vitroplantas hasta conseguir 300, estos explantes fueron colocados en una sala de crecimiento por el lapso de un mes hasta formar raíces. Al mismo tiempo se preparó la carpa solar (ubicada en el campus universitario de la Facultad de Agronomía), se hizo la mezcla de los sustratos abonados, su desinfección con Basamid, toma de datos de la temperatura, aislamiento del área experimental y delimitación de las unidades experimentales. El diseño experimental que se utilizó fue bloques completos al azar producto de cuatro tratamientos y cuatro repeticiones. Los tratamientos que se utilizaron fueron T1 (arena fina-tierra del lugar); T2 (arena fina-aserrín-humus); T3 (arena fina-turba-aserrín) T4 (arena fina-turba-humus). El trasplante se realizó por la mañana para evitar que los rayos solares dañen las raíces, se regó abundantemente, luego se cubrió cada plantín con un vaso de plástico para mantener la humedad, también se hicieron semisombra, escardas, aporque y control fitosanitario. Una semana después del trasplante se realizó la reposición de acuerdo a la cantidad de plantas muertas, a medida que transcurrían los días se fueron haciendo orificios en los vasos plásticos de manera que las vitroplantas se acostumbren al aire, realicen fotosíntesis y sus estomas se tornen funcionales, este proceso fue el de adaptación y se llevó a cabo en un mes, al finalizar esta fase se retiraron los vasos plásticos y las semisombras, allí comenzó la fase de crecimiento misma que tuvo duración de cuatro meses, en ambas fases se evaluaron el porcentaje de adaptación, altura de las plantas, número de tallos, largo y ancho de hojas, además el rendimiento de materia verde y materia seca, también se hizo un análisis económico. Al concluir el trabajo en campo se evaluaron los resultados, siendo el tratamiento cuatro el más recomendado para la adaptación de vitroplantas de stevia sin desmerecer al tratamiento dos, ambos tratamientos fueron buenos por contener en su mezcla arena y humus principalmente. Dejando descartado completamente al tratamiento tres debido a la acidez de la turba.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
Objetivo General .....	2
Objetivos Específicos .....	2
Hipótesis .....	2
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
2.1 Origen .....	3
2.2 Variedades de Stevia .....	3
2.3 Importancia del cultivo.....	3
2.4 Clasificación Sistemática.....	4
2.5 Descripción botánica.....	5
2.6 Ecología del cultivo .....	6
2.7 Multiplicación.....	7
2.8 Cuidados culturales.....	8
2.9 Plagas y enfermedades.....	8
2.10 Cosecha .....	9
2.11 Manejo de post cosecha .....	9
2.12 Composición de la hoja seca de stevia .....	9
2.13 Descripción del glucósido.....	10
2.14 Características del steviósido.....	10
2.15 Usos.....	10
2.15.1 Utilización en forma natural.....	10
2.15.2 Utilización en forma industrializada.....	11
2.16 Propiedades y virtudes.....	11
2.17 Concepto de cultivo <i>in vitro</i> .....	12
2.18 Características de las vitroplantas.....	13
2.19 Concepto de adaptación o aclimatación.....	15
2.20 Técnicas de aclimatación .....	16
2.21 Importancia de adaptación <i>in vitro</i> de plantas .....	17
2.22 Definición de sustrato.....	18
2.23 Características de un buen sustrato.....	19
2.24 Propiedades físico-químicas de los sustratos .....	21
2.24.1 Propiedades físicas de los sustratos.....	21
2.24.2 Propiedades químicas de los sustratos .....	22
2.24.3 Propiedades biológicas.....	24
2.25 Materiales empleados en la elaboración de sustratos.....	24
2.26 Ambientes atemperados .....	28
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.1 Ubicación del área de estudio .....	31
3.2 Materiales.....	31
3.2.1 Material genético vegetal .....	31
3.2.2 Materiales de laboratorio .....	31
3.2.3 Reactivos .....	32
3.2.4 Equipos.....	33

3.2.5 Materiales de campo.....	33
3.3 Metodología .....	34
3.3.1 Diseño experimental .....	34
3.3.2 Factores en estudio .....	34
3.4 Trabajo de laboratorio .....	35
3.5 Trabajo de invernadero .....	36
3.6 Trasplante .....	37
3.7 Fase de adaptación y reposición.....	38
3.8 Fase de crecimiento .....	38
3.9 Labores culturales .....	39
3.10 Cosecha.....	40
3.11 Post cosecha.....	40
3.12 Variables de respuesta.....	41
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>42</b>
4.1 Condiciones climáticas.....	42
4.1.1 Temperatura .....	42
4.1.2 Humedad relativa.....	43
4.2 Características físico-químicas de los sustratos .....	45
4.2.1 Clase textural .....	45
4.2.2 Materia orgánica, saturación de bases y nitrógeno total (%) .....	47
4.2.3 Conductividad eléctrica (CE).....	49
4.2.4 Contenido de fósforo.....	49
4.2.5 Potencial hidrógeno (pH) .....	50
4.2.6 Capacidad de intercambio catiónico (CIC).....	51
4.3 Evaluación de las variables de respuesta .....	54
4.3.1 Supervivencia de vitroplantas .....	54
Análisis de varianza para supervivencia de vitroplantas.....	54
4.4 Fase de adaptación.....	57
4.4.1 Altura de la planta .....	57
Análisis de varianza para altura de planta .....	57
4.4.2 Número de tallos.....	59
Análisis de varianza para número de tallos .....	60
4.4.3 Número de hojas.....	62
Análisis de varianza para número de hojas .....	62
4.4.4 Ancho de hojas .....	64
Análisis de varianza para ancho de hojas.....	65
4.4.5 Largo de hojas .....	66
Análisis de varianza para largo de hojas .....	67
4.5 Fase de crecimiento .....	69
4.5.1 Altura de la planta .....	69
Análisis de varianza para altura de planta .....	69
4.5.2 Número de hojas.....	71
Análisis de varianza para número de hojas .....	72
4.5.3 Ancho de hojas .....	74
Análisis de varianza para ancho de hojas.....	75
4.5.4 Largo de hojas .....	76
Análisis de varianza para largo de hojas .....	77

4.6 Rendimiento de materia verde .....	78
Análisis de varianza para rendimiento de materia verde .....	79
4.7 Rendimiento de materia seca.....	81
Análisis de varianza para rendimiento de materia seca.....	81
4.7.1 Correlación lineal entre altura de la planta y peso de materia seca.....	83
4.7.2 Correlación lineal entre número de hojas y peso de materia seca.....	84
4.8 Etapa de floración. ....	85
4.9 Incidencia de plagas.....	85
4.10 Comparación económica de los sustratos.....	86
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>93</b>
<b>6. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>96</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>105</b>

## CUADROS

Cuadro 1: Composición de la hoja seca de <i>Stevia rebaudiana</i> .....	9
Cuadro 2: Características físico-químicas del steviósido .....	10
Cuadro 3: Material utilizado .....	35
Cuadro 4: Análisis físico-químico de los sustratos .....	45
Cuadro 5: Supervivencia en los diferentes sustratos .....	54
Cuadro 6: Análisis de varianza para supervivencia de vitroplantas.....	54
Cuadro 7: Análisis de varianza para altura de planta .....	58
Cuadro 8: Análisis de varianza para número de tallos .....	60
Cuadro 9: Análisis de varianza para número de hojas .....	63
Cuadro 10: Análisis de varianza para ancho de hojas .....	65
Cuadro 11: Análisis de varianza para largo de hojas .....	67
Cuadro 12: Análisis de varianza para altura de planta .....	70
Cuadro 13: Análisis de varianza para número de hojas .....	73
Cuadro 14: Análisis de varianza para ancho de hojas .....	75
Cuadro 15: Análisis de varianza para largo de hojas .....	77
Cuadro 16: Análisis de varianza para rendimiento de materia verde .....	79
Cuadro 17: Análisis de varianza para rendimiento de materia seca.....	82
Cuadro 18: Incidencia de plagas .....	86
Cuadro 19: Costos fijos .....	87
Cuadro 20: Costos variables .....	88
Cuadro 21: Costo total por tratamiento .....	89
Cuadro 22: Costo total .....	89
Cuadro 23: Número de plantas adaptadas por tratamiento.....	90
Cuadro 24: Ingresos esperados por tratamiento .....	91
Cuadro 25: Relación beneficio – costo .....	91
Cuadro 26: Análisis de dominancia de los tratamientos .....	92

## FIGURAS

Figura 1: Temperaturas máximas y mínimas dentro y fuera de la carpa solar .....	42
Figura 2: Humedad relativa, dentro y fuera de la carpa solar .....	44
Figura 3: Clase textural.....	46
Figura 4: Materia orgánica, saturación de bases y nitrógeno total.....	47
Figura 5: Conductividad eléctrica.....	49
Figura 6: Contenido de fósforo .....	50
Figura 7: Capacidad de intercambio catiónico (CIC) .....	52
Figura 8: Supervivencia de vitroplantas.....	55
Figura 9: Tendencia de altura de la planta .....	57
Figura 10: Altura de la planta.....	58
Figura 11: Tendencia de número de tallos .....	60
Figura 12: Número de tallos.....	61
Figura 13: Tendencia de número de hojas .....	62
Figura 14: Número de hojas .....	63
Figura 15: Tendencia de ancho de hojas.....	64
Figura 16: Ancho de hojas .....	65
Figura 17: Tendencia de largo de hojas .....	66
Figura 18: Largo de hojas .....	67
Figura 19: Tendencia de altura de la planta.....	69
Figura 20: Altura de planta.....	70
Figura 21: Tendencia de número de hojas .....	72
Figura 22: Número de hojas .....	73
Figura 23: Tendencia de ancho de hojas.....	74
Figura 24: Ancho de hojas .....	75
Figura 25: Tendencia de largo de hojas .....	76
Figura 26: Largo de hojas .....	77
Figura 27: Tendencia del rendimiento de materia verde.....	79
Figura 28: Rendimiento de materia verde.....	80
Figura 29: Tendencia del rendimiento de materia seca .....	81
Figura 30: Rendimiento de materia seca .....	82
Figura 31: Correlación lineal entre altura y materia seca .....	83
Figura 32: Correlación lineal entre número de hojas y materia seca.....	84



# 1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento constante de la población mundial, ha motivado la búsqueda de productos alimenticios, medicinales y de nuevas materias primas que cubran las necesidades de la población. La sacarosa, consumida por la mayor parte de la población conlleva a una serie de patologías en cantidades cada vez más significativas, por esta razón surgió la búsqueda de un edulcorante de origen natural que sustituyera los productos químicamente compuestos, es así que la población dirigió su mirada hacia el edulcorante de la *Stevia rebaudiana* que es completamente inocuo por no metabolizarse en el organismo.

González (1995), indica que la stevia es una planta herbácea, que contiene un glucósido llamado steviósido cuyo poder edulcorante en estado puro y cristalino es 300 veces mayor que el azúcar de caña, no existiendo en el mundo otro sustituto edulcorante de origen natural con estas características.

Villalobos (1997) menciona que Paraguay exporta hojas secas de stevia a Estados Unidos a un precio de 3 a 3,5 \$us/k; a este precio, el ingreso bruto por hectárea en Bolivia estaría alrededor de los 5.000 \$us. El costo de implantación de una hectárea se calcula en 2.500 \$us y su costo de mantenimiento en 1.000 \$us/año. De acuerdo a esto, la stevia se puede convertir en una buena alternativa al cultivo de la coca, por la cual el agricultor en sus mejores precios, obtiene un ingreso bruto de 1.200 a 1,500 \$us/ha. En los Yungas de La Paz, el rendimiento promedio estimado es de 2,0 t/ha como hoja seca, en dos a tres cortes al año.

En países como el Paraguay, Japón y Estados Unidos la stevia está siendo utilizada en mayores cantidades dentro de la explotación agrícola, debido al alto valor comercial, medicinal y rentabilidad que de acuerdo a Inga Stevia Industrial S.A. (1987) llega a una superioridad de 25 a 1 con relación a la soya.

Sin embargo según Encinas (1997), menciona que la esterilidad de las semillas y su carácter microblástico (breve poder germinativo), hacen dificultosa su propagación haciendo inaplicable su reproducción por esta vía, por lo cual la propagación *in vitro* se constituye en una alternativa. Aguirre (1997) afirma que una etapa complementaria al cultivo *in vitro* y su micropropagación es la aclimatación y adaptación del material vegetal al medio ambiente, esta etapa tiene mucha importancia ya que incidirá enormemente en la eficiencia del cultivo.

En consecuencia se ha considerado realizar el presente estudio, con el fin de seleccionar la mezcla del sustrato más adecuado (utilizando para ello arena, turba, humus y aserrín) de tal manera que permita incrementar la adaptabilidad de las vitroplantas de *Stevia rebaudiana* a condiciones de medio ambiente, evitando pérdidas masivas al ser trasplantadas al suelo, considerando para ello los siguientes objetivos:

### **Objetivo General**

- Estudiar la adaptabilidad de la *Stevia rebaudiana* obtenida a través del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* a cuatro sustratos abonados bajo condiciones protegidas.

### **Objetivos Específicos**

- Determinar el porcentaje de prendimiento de las plántulas de Stevia en cuatro sustratos abonados.
- Evaluar el comportamiento morfológico de las plántulas de Stevia.
- Evaluar la incidencia de plagas y enfermedades en el cultivo.
- Análisis de costos parciales de los cuatro tratamientos.

### **Hipótesis**

- Ho: No existe diferencia en el porcentaje de prendimiento de las plántulas de Stevia frente a los tratamientos utilizados en la investigación.
- Ho: No existe diferencia en el comportamiento morfológico de la Stevia.
- Ho: No existe incidencia de plagas y enfermedades en el cultivo.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Origen

Bertohna (1986) indica que esta planta es originaria de las serranías de Amambaí del Paraguay, donde se encuentra con mayor abundancia en forma silvestre. Existiendo sin embargo *Stevia* cultivada en todo el territorio Paraguayo, en el norte de Argentina y la región sur del Brasil en el estado de Mato-Grosso. Por otro lado Encinas (1997), menciona que la *Stevia rebaudiana* es un arbusto nativo del Paraguay y Brasil.

### 2.2 Variedades de *Stevia*

Existen dos variedades de *Stevia rebaudiana*: *Blanca* y *Morita*. Además existen más de 150 especies entre las cuales podemos nombrar: *Stevia cruzii*, *Stevia hirsuta*, *Stevia lemmonii*, *Stevia palmeri*, *Stevia triangularis*, *Stevia estrellensis*, *Stevia amambayensis*, etc., sin embargo la *Stevia rebaudiana* es la única especie con principios edulcorantes en las hojas y de mucha importancia económica a escala mundial. Robinson (1982).

### 2.3 Importancia del cultivo

El incremento de los productos de consumo denominados light por una parte y la creciente demanda de productos de carácter natural, por otra, hace que la necesidad de edulcorantes no calóricos sea cada vez mayor.

Cardozo (1992) y Sumida (1997) afirman que el ciclo biológico de la stevia es de cuatro meses, después de cada corte vuelve a rebrotar. Casme S.R.L. (2000) informa que la producción de hojas de stevia en el mundo solo cubre el 10% de la demanda mundial.

Los países consumidores de Stevia según Ungarreto (1999) son: Estados Unidos, Japón, Corea, Taiwán, Unión Soviética, Indonesia, Tailandia, Alemania, Francia, Italia, Inglaterra, España. En Latino América estarían el Brasil, México, Argentina y Paraguay.

Fortuna Stevia del Paraguay (1989), indica que el precio a escala internacional del kilo de hoja seca, hasta con una humedad del 10% es variable y oscila entre 2 a 5 dólares. El otro caso es el precio del steviósido que en el mercado mundial oscila entre los 120 \$us a 150 \$us por kilo, dependiendo de la calidad, concentración y pureza. Una manera más de comercialización es el extracto o miel de hoja, donde un litro de extracto equivale a 48,6 kilogramos de azúcar, y 1cc contiene 20 gotas.

Inga Stevia Industrial S.A. (1987), menciona que con un costo de producción de mil dólares para Paraguay y Brasil se obtiene 5 a 7 mil dólares brutos /hectárea, con un rendimiento de 1.500 k/ha de hojas, y comparando con la rentabilidad de la soya, la stevia se sitúa en una superioridad de 25 a 1.

## 2.4 Clasificación Sistemática

Fortuna Stevia del Paraguay (1989), afirma que en 1905 Moisés Santiago Bertoni describió botánicamente a la Stevia y la clasificó como *Stevia rebaudiana Bertoni*, en honor al químico paraguayo Ovidio Rebaudi. Su clasificación es la siguiente:

DIVISIÓN	:	Traqueofita
SUBDIVISIÓN	:	Magnoliophyta
CLASE	:	Magnoliopsida
SUBCLASE	:	Asteridae
ORDEN	:	Asterales
FAMILIA	:	<i>Asteraceae</i>
GENERO	:	<i>Stevia</i>
ESPECIE	:	<i>rebaudiana</i>
NOMBRE VULGAR	:	Stevia, ka`a-ehe, azúcar-cao, hierba dulce.

## 2.5 Descripción botánica

Jordán (1994) la Stevia es una planta herbácea, perenne, sub-leñosa, de tipo arbustivo, alcanza una altura de 60 cm en condiciones de máximo crecimiento vegetativo, cuando hay emisión de inflorescencia puede llegar a 100 cm de altura, tiene **raíz** filiforme, fibrosa, fina y de abundante cepa, apenas ramifican y no profundizan, distribuyéndose cerca de la superficie; es el único órgano de la planta que no contiene steviósido.

El **tallo** es principal durante su desarrollo inicial, tornándose multicaule después del primer ciclo vegetativo. El tallo es más o menos pubescente que emerge de un rizoma con varias yemas, tiene tendencia a inclinarse, es de color verde con diferentes tonos. La parte aérea del tallo puede morir todos los años ya sea por cuestiones de temperatura, ciclo reproductivo sexual o por razones ambientales. Queda un tallo subterráneo con un sistema de raíz que luego forma cepas, surgiendo nuevos brotes en la base del tallo anterior.

Las **hojas** son pequeñas simples, de color verde claro a oscuro, a veces con variado tinte púrpura, lanceoladas, elípticas u ovaladas; opuestas, alternas, sésiles o con pequeño pecíolo (1 a 3 mm); borde o margen dentado, festonado a aserrado; a veces en verticilos; a veces ligeramente pubescentes o avelludadas en ambas caras. La hoja es el órgano con mayor contenido del edulcorante.

La **flor** es hermafrodita, agrupados en panículas carimbosas terminales o axilares; tiene entre 2 a 6 flores de 5 mm de longitud por inflorescencia. El color expuesto es blanco o púrpura. La corola es de forma campanular, abierta en cinco puntos o lóbulos. El estilo es largo y se bifurca en puntas curvadas. El estambre es sinandrio y la antera está debajo.

El **fruto** es un aquenio que se clasifica en tres tipos de acuerdo a la fecundación claro estéril, oscuro fértil y oscuro estéril. El aquenio es alargado delgado (2 a 3 mm) de color moreno pardo oscuro, coronado por pelos persistentes más claros en color (plumosos en forma de paracaídas) de 2 a 5 mm, en la punta, lo que facilita la dispersión por el viento. El aquenio claro es estéril y se produce cuando no hay polinización. Si ocurre polinización,

pero el crecimiento del tubo polínico es interrumpido, se produce un aquenio oscuro estéril. Si hay fecundación normal el color es igualmente oscuro con un aquenio fértil. Los aquenios varían de peso de 100 a 540 microgramos. Según Katamaya mencionado por Jordán (1994) mil semillas pesan 0,4 gramos. La semilla es exalbuminoide como el caso de las habas.

## 2.6 Ecología del cultivo

Según Cardozo (1992) la Stevia es un cultivo de **clima** tropical y subtropical semi húmedo, cuyo requerimiento promedio de precipitación es 1400 a 1800 mm anuales, con una distribución regular todo el año.

Molinas (1986) las **temperaturas** extremas que soporta la Stevia son de 6°C como temperatura mínima y de 43°C como temperatura máxima. Y una temperatura óptima para el buen desarrollo de la planta de 20 a 25°C. Puede llegar a soportar de -3 °C en determinado tiempo, es sensible a heladas y lluvias excesivas.

De acuerdo con Cardozo (1992) la exigencia de **humedad** es alta y de manera continua; es decir, no se debe dar la falta de agua durante las diferentes etapas de su desarrollo, esto es explicable debido a la morfología de su sistema radicular.

Bertohna (1986) menciona que la Stevia es sensible al **fotoperiodo**, pudiendo florecer en días cortos de 8 horas, como en días largos de 16 horas, pero esta sensibilidad se acentúa en determinados estados de crecimiento, favoreciendo las condiciones de fotoperiodo largo para un mayor desarrollo vegetativo.

Bertohna (1986) esta planta tiene la capacidad de adaptación a diferentes tipos de suelo de buen drenaje, con declive de 5% y una profundidad entre 30 a 50 cm. Está clasificado en suelos profundos de textura mediana, bien drenados. No tolera agua por varios días o prolongadas inundaciones, son moderadamente sensibles a la salinidad. Presenta un pH de 5.5 – 7.5.

## 2.7 Multiplicación

La siembra directa según Leigue (1995) se efectúa al voleo a semilla descubierta por su carácter fotoblástica (necesita luz directa para germinar).

Para la siembra indirecta es necesario emplear 10 gramos de stevia, con 40% de germinación para poder producir 700 plantas por metro cuadrado en germinadores. Cuando las plántulas tienen de 10 – 15 cm pueden ser transplantadas al campo definitivo en hileras a 50 cm de distancia y 20 cm entre plantas.

Bertohna (1986) indica que la multiplicación vegetativa puede realizarse por:

- Separación de brotes, cuando las plantas alcanzan 10-15 cm.
- Brotes apicales cortadas antes que la planta florezca.
- Separación de hijuelos.
- Enraizamiento de estacas.
- Cultivo de tejidos *in vitro* realizados en laboratorio, a través de la utilización de meristemos apicales.

Según Cardozo (1992) el ciclo biológico de la stevia es de cuatro meses (120 días). Después del primer corte, vuelve a rebrotar cada cuatro meses, originando tres cosechas al año, en condiciones de clima tropical.

La densidad de siembra está considerada entre 100.000 plantas/ha 50 cm entre hileras y 20 cm entre plantas (sistema de hileras simples). Existen tres épocas de siembra: Agosto a Septiembre; Diciembre a Enero; Marzo a Abril.

La **fertilización** según Encinas (1997) se puede realizar con la incorporación de **abono orgánico**: entre 30 - 40 toneladas por hectárea de estiércol de vacunos y aves. Esta recomendación es para suelos con bajo contenido de materia orgánica. Por otro lado tenemos la **fertilización química**: que consiste en la aplicación de nitrógeno (N) como cobertura, se recomienda aplicar a los 30 y 60 días después del trasplante. La aplicación de fertilizantes con fuentes de potasio (K) y fósforo (P) se debe realizar como abono

distribuidos a chorro en el fondo del surco y luego cubrirlos ligeramente para evitar su contacto con las raíces de las mudas.

En cuanto al **riego** Gaitán (1997) menciona que la stevia requiere una lámina diaria de 5 mm. Sobre todo durante el trasplante y después de cada cosecha se debe tener bien húmedo el suelo, así para suelos arenosos regar cada 5 días, en arcillosos cada 7 días.

## 2.8 Cuidados culturales

Molinas (1986) la producción de stevia exige frecuentes cuidados culturales, tales como: deshierbes, aporques, tratamientos fitosanitarios, desde la siembra como a lo largo del desarrollo del cultivo.

**Deshierbes:** esta práctica es muy importante para la producción de la Stevia, debido a que este cultivo requiere estar limpio de malezas ya que no tolera la competencia de nutrientes y agua. La carpida o deshierbe debe efectuarse desde el inicio de su desarrollo.

**Aporques:** es una labor imprescindible en la producción de la Stevia, porque le ayuda a evitar el acame de las plantas, como también le ayuda a retener la humedad del suelo alrededor de la planta.

**Fumigaciones:** se debe realizar aspersiones con insecticidas y fungicidas químicos de baja toxicidad. La aplicación de estos debe realizarse por lo menos 30 días antes del corte, para eliminar el efecto residual de los productos.

## 2.9 Plagas y enfermedades

Jordán (1994) los siguientes representantes de la fauna han sido informados u observados alguna vez atacando la planta.

Pulgones, orugas del follaje y cortadoras (lepidópteros), cochinillas, babosas, hormigas, arañas rojas, nemátodos noduladores. Entre los hongos que causan enfermedades tenemos los que atacan las hojas: *Alternaria steviae* y *Septoria steviae*. Entre los que atacan tallos y raíces tenemos: *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*.

## 2.10 Cosecha

Bertohna (1986) las horas recomendables para realizar el corte o cosecha de la planta, es después de la evaporación del rocío hasta las 10 de la mañana, con el fin de secar la planta el mismo día y evitar pérdidas. El corte debe realizarse a 10 cm del suelo, con ayuda de machete o tijera de podar.

Molinas (1986) las plantas deben cosecharse cuando empieza a emitir los botones florales o cuando empiezan abrirse las primeras flores, en esta etapa del cultivo las hojas presentan el máximo contenido de steviósido.

## 2.11 Manejo de post cosecha

**Secado:** El material cosechado se extiende sobre un polietileno y se expone de manera directa a los rayos solares por un periodo de 7 a 8 horas reduciendo la humedad de las hojas de 85 a 10% aproximadamente. (Fortuna Stevia del Paraguay 1989).

## 2.12 Composición de la hoja seca de stevia

La *Stevia rebaudiana* está principalmente compuesta de hidratos de carbono y la composición de la hoja seca en gramos por ciento (**Cuadro 1**) sobre hojas secas es la siguiente:

**Cuadro 1: Composición de la hoja seca de *Stevia rebaudiana***

Componentes	Cantidades en por ciento (%)
Proteínas	6,25
Hidratos de carbono	52,84
Grasa	5,65
Calcio	0,62
Fósforo	0,089
Hierro	0,055
Ceniza	7,53
Humedad	9,75

Fuente: Molinas (1986)

## 2.13 Descripción del glucósido

Kinghom y Soejarto (1989), indican que el glucósido diterpeno con aglicon del dulce de la Stevia ha sido asunto de varios repasos, aunque hubo gran interés hace muchos años no se hizo progresos significativos hacia la caracterización química. Estudios subsecuentes han llevado a determinar las proporciones típicas de los principales componentes del glucósido, a base del peso seco de la planta nativa, siendo 0.3% dulcósido, 0.6% rebaudiosido C, 3.8% rebaudiosido A y 9.1% steviósido.

## 2.14 Características del steviósido

Sumida (1997), expresa que el steviósido es una sustancia extraída de las hojas de la planta de Stevia, posee características físico-químicas (**Cuadro 2**) que le otorgan una naturaleza glucosídica, es decir que contiene compuestos naturales que por hidrólisis dan origen a la glucosa y no se descompone, cambia o desaparece ante el calor, por ello además de procesos en frío puede ser utilizado en procesos térmicos, sin que pierda su capacidad edulcorante.

**Cuadro 2: Características físico-químicas del steviósido**

Estado Cristalizado	Blanco marfil e inoloro
Solubilidad	en agua (mínimo 800 mg/l)
Punto de fusión	168 a 200 °C
Fórmula química	$C_{38} H_{60} O_{18}$
Peso molecular	804.90
Nombre químico	19 – O – B – glucopiranosil – 13 – O - (B - glucopiranosil 1,2) - (B - glucopiranosil) – Steviol (2,4)

Fuente: Sumida (1997)

## 2.15 Usos

### 2.15.1 Utilización en forma natural

De acuerdo con Fortuna Stevia del Paraguay (1989) el consumo a nivel interno va en aumento principalmente con el extracto acuoso como aditivo alimentario para endulzar

jugos y refrescos, además en panificados y confituras, pues reduce en un 50% calorías en los panes.

Según el mismo autor la parte leñosa molida y las hojas se pueden mezclar con la yerba mate para obtener un mate dulce sin necesidad de agregar azúcar, especialmente para diabéticos. También las hojas tiernas son utilizadas como un té natural.

### **2.15.2 Utilización en forma industrializada**

Según la Fundación Bolivia Exporta (1992) la stevia representa un amplio campo de aplicación industrial como endulzante de alimentos, bebidas dietéticas, gomas de mascar, pastas dentales, productos edulcorantes no calóricos de mesa y farmacéutica como en la producción de medicamentos y cosméticos.

Fortuna Stevia del Paraguay (1989) la Asociación Internacional de Diabéticos, viene incluyendo la stevia en la dieta de sus pacientes en la preparación de alimentos dulces, teniendo la ventaja que no posee calorías y no es asimilado por el organismo.

Además de las hojas se utilizan los tallos y ramas como colorantes y mejoradores de bebidas alcohólicas, provocando el añejamiento, suavidad y gusto agradable.

### **2.16 Propiedades y virtudes**

Ungarreto (1999), indica que la stevia contiene las siguientes propiedades y virtudes:

**Acción hipoglicemia:** Mejora la circulación pancreática estimulando la secreción de insulina hasta el punto de, si se ingiere permanentemente, liberar de la insulina a la persona dependiente. En otras palabras, reduce el nivel de azúcar en la sangre de las personas diabéticas.

**Contra la obesidad:** El continuo uso de la hoja de stevia en infusiones disminuye la absorción de hidratos de carbono a nivel intestinal, actuando como adelgazante.

**Cardiotónico:** Se ha demostrado el valor benéfico que tiene la stevia para el funcionamiento regular del corazón. Su ingestión constante refuerza el sistema vascular y circulatorio, por ello también es recomendado para personas que sufren de colesterol.

**Acción digestiva:** Sus propiedades diuréticas y antiácidas la convierten en un té digestivo por excelencia al eliminar vía urinaria las toxinas acumuladas por mala alimentación.

**Anticaries:** Al no fermentar se la utiliza actualmente en dentífricos y chicles, ya que protege el esmalte dental al combatir las bacterias. La masticación de la hoja, además de combatir las caries, es un pasatiempo más dulce que el chicle.

**Combate la ansiedad:** Relaja el sistema nervioso. Es ideal para las personas con bastante actividad cerebral para contrarrestar ataques de ansiedad, que inducen a la depresión.

**Efecto dérmico:** La capacidad de revitalizar células epiteliales le han dado fama últimamente al extracto de la stevia como un limpiador profundo de la piel. Es muy efectivo sobre el acné, la dermatitis, la seborrea capilar, eczemas, e incluso están en estudio las respuestas que puede tener sobre la lepra, soriasis y cáncer de la piel.

## **2.17 Concepto de cultivo *in vitro***

Pérez (1998), menciona que los orígenes del cultivo *in vitro* se remontan a 1902 con la teoría de la totipotencialidad celular, enunciada por Haberlandt, quien postula que toda célula vegetal individual es capaz de regenerar una planta completa genéticamente idéntica a él. Pueden ser fragmentos de planta extraídos con finalidad reproductiva e inducidos en un medio nutritivo para producir raíces. Las plantas enraizadas de esta manera serán idénticas a sus progenitoras.

Pierick (1990), indica que el cultivo *in vitro* se define como “El cultivo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles, de plantas, semillas, embriones, órganos, explanto, tejidos, células y protoplastos de plantas superiores.

## 2.18 Características de las vitroplantas

Las vitroplantas indica Aguirre (1997), tienen características anatómicas y fisiológicas que difieren de las plantas crecidas "*in vivo*", y que tienen una influencia directa sobre su supervivencia; entre estas se citan:

- Estructura de la cutícula.
- Actividad estomática.
- Anatomía de los órganos aéreos.
- Fotosíntesis.

La cutícula es una membrana compuesta por cutina y cera; su función principal es limitar la pérdida de agua producto de la transpiración. El paso del agua a través de la misma está influenciado por la estructura y la cantidad de las ceras cuticular y epicuticular. Estas ceras en las vitroplantas tienen mayor proporción de ésteres y de complejos polares, además de un número significativamente menor de carbohidratos de cadena larga que las plantas cultivadas *in vivo*, como los complejos polares son menos hidrofóbicos permiten una mayor permeabilidad al agua que los carbohidratos de cadena larga y por este concepto se plantea que ocurre una pérdida mayor de agua.

La estructura de los estomas y su funcionamiento están relacionados con el balance de agua presente en las vitroplantas una vez extraídas del medio de cultivo. Se conoce que mientras las plantas se encuentran "*in vitro*" los estomas se encuentran completamente abiertos, y muestran incapacidad de cerrarse. Esto contribuye a que en los primeros 5 – 6 días de aclimatación las hojas pierdan agua en una proporción mucho más rápida que las plantas de invernadero.

A pesar de que la mayoría de los estomas se cierran entre 12-14 horas después del transplante, se plantea que la cantidad de agua perdida en 24 horas es equivalente a 2-3 veces el peso inicial de la planta. Esto indica que el exceso de transpiración al no reponer esa agua puede llevar a un stress hídrico severo.

Quezada (1992) señala además que un examen de secciones histológicas de hojas de vitroplantas muestra que las mismas son más delgadas y tienen un parénquima de empalizada pobremente desarrollado con gran cantidad de espacio aéreo en el mesófilo al compararlas con las plantas cultivadas *in vivo*. Los tallos de las plántulas presentan mucho menos tejido de resistencia que las cultivadas *in vivo*.

Fisiológicamente, el traslado de una vitroplanta del medio de cultivo al suelo es análoga a la transición de las reservas de la semilla a la fotosíntesis de las plantas; sin embargo en el caso de las vitroplantas esta transición ocurre casi instantáneamente de un medio con suministro de sacarosa e intercambio limitado de luz y gases a un medio con características totalmente opuestas, de ser heterótrofas a ser autótrofas, tornándose imprescindible la fotosíntesis para la supervivencia.

Rosell (1990), señala que las plantas producidas *in vitro* difieren de las plantas propagadas convencionalmente en lo siguiente: las plantas *in vitro* fueron cultivadas bajo condiciones de asepsia, han permanecido en un ambiente controlado, y su crecimiento requiere de fuentes de carbono exógeno, es decir, son plantas heterótrofas.

Y aún cuando puedan parecer fisiológicamente funcionales, es difícil que exista alta actividad fotosintética, incluso si la clorofila está presente en las hojas, es probable que las enzimas responsables de la fotosíntesis estén inactivas o ausentes. Esto es debido al pobre desarrollo del aparato fotosintético de las plantas producidas por cultivo de tejidos, puede ser un factor muy importante para que al momento del trasplante sean vulnerables a cualquier deficiencia en el ambiente.

Por otra parte, las plantas propagadas *in vitro* se han desarrollado en presencia de una humedad relativa alta (cerca del 100%); debido a esto, las hojas presentan células en empalizada con grandes espacios intercelulares y bajas frecuencias de estomas, esta características hace que dichas plantas sean más sensibles a pérdidas de agua.

Además, estudios realizados con el microscopio electrónico de barrido, han revelado una considerable disminución o ausencia total de ceras en la cutícula de las hojas en plantas producidas *in vitro* situación que las hace más susceptibles de deshidratarse

El fenotipo de las plantas que crecen *in vitro* presentan tallos más delgados, menor cantidad de ceras cuticulares y epicuticulares, reducción de los tejidos mecánicos de soporte, incremento del contenido de agua en las células, escasa capacidad fotosintética, estomas con baja funcionalidad y crecimiento heterótrofo o mixótrofo con respecto a las plantas que se desarrollan *in vivo* (Denng y Donnelly, 1993 mencionados por Pérez 1998).

Todo esto indica que los cambios fenotípicos son inducidos por las condiciones ambientales del recipiente de cultivo, es decir, como respuesta a la ausencia de las condiciones estresantes que se presentan en los invernaderos y en el campo (estrés hídrico, nutricional, etc.).

## **2.19 Concepto de adaptación o aclimatación**

Rivadeneira (1995), describe adaptación como el proceso por el que un organismo realiza modificaciones estructurales, bioquímicas o de otro tipo, para satisfacer las condiciones del medio y poder sobrevivir.

Pierick (1990), indica que es el proceso por el cual un organismo se adapta fisiológicamente a los cambios en su medio ambiente, que en general tienen relación directa con el clima. Se produce después de un período de tiempo en el que se ha sometido al individuo a una cierta condición.

Por otro lado Brauer (1973), define adaptación de las plantas, como la capacidad de aprovechar mejor el agua, la energía lumínica, las sustancias nutritivas y en general las condiciones del medio ambiente.

Poehlman (1979), indica que cuando un cultivo es introducido por primera vez a una nueva área de producción, en principio puede parecer no tener buena adaptación, pero después de ser cultivada varias veces presentan mejor adaptación y productividad. Así la

aclimatación es la capacidad de las plantas para adaptarse a un nuevo clima dependiendo de:

- La forma de polinización, especies alógamas se adaptan más fácilmente que las autógamias.
- Grado de variabilidad genética de la especie, mientras sea más variable más rápida será la adaptación.
- La longevidad de la especie, las anuales tienen mayor posibilidad de adaptarse que las perennes.

## **2.20 Técnicas de aclimatación**

Hurtado (1994), indica que durante la fase de aclimatación los cultivos deberán ser colocados durante una o dos semanas bajo un ambiente controlado, donde la intensidad lumínica deberá ser de 10.000 lux; tanto la temperatura como el fotoperíodo serán regulados de acuerdo con las necesidades del cultivo.

La plántula dentro del tubo de ensayo se encuentra bajo condiciones de esterilidad y con alta humedad relativa, la cual deberá reducirse eliminando el papel parafilm (si se usa) unos cinco días antes del trasplante al suelo, lo que dará a la planta mayor tolerancia a la baja humedad relativa del medio ambiente, facilitándole su posterior adaptación a condiciones autótrofas, donde tendrá que regular adecuadamente sus procesos de absorción, traslocación y transpiración de agua.

Darias (1993), menciona que las técnicas más eficaces son las encaminadas a lograr gradualmente menos humedad relativa, más luz, crecimiento autotrófico y un medio séptico, todo lo cual es característico del invernadero y del campo.

El proceso de aclimatación se puede comenzar desde que la planta está aún "*in vitro*", lo mismo induciendo los factores antes señalados que destapando los recipientes que las contienen unos días antes del trasplante. Ziv (1999) logró incrementar el porcentaje de supervivencia hasta el 90% con 9 días destapando los explantes antes de ser llevados al invernadero.

(Miller 1983 citado por Darías 1993) propuso destapar los frascos en el mismo campo. Contrario a lo que se supone, la contaminación del medio que contiene sacarosa no se convierten en un problema a menos que las vasijas se encuentren destapadas mucho tiempo; el destapado puede hacerse por etapas, y es muy útil en los lugares en que no se tenga control de la humedad.

Cuando las vitroplantas son extraídas de la vasija para su transplante, debe eliminarse por completo el agar de las raíces porque la sacarosa y los nutrientes presentes pueden servir de medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos. Es preferible el uso del agua tibia para limpiar las raíces del resto del sustrato.

Rosell (1990), menciona que se ha recomendado colocar los recipientes de los cultivos en el invernadero por algunos días antes de sacar las plantas, esto con la finalidad de lograr una pre-adaptación a los regímenes de luz y temperatura que prevalecerán en el invernadero durante el transplante. Con tal procedimiento se puede ocasionar un problema de acumulación de calor al tener los recipientes de cultivo tapados debido a un “doble efecto invernadero”.

Este problema puede remediarse removiendo la tapa de los recipientes de cultivo siempre y cuando se procure su desecación. En este punto, la posible introducción de microorganismos contaminantes, también puede ser un problema de importancia. Bajo estas condiciones y para promover un crecimiento autótrofo (Takatori *et al.* 1968 mencionado por Rosell 1990) indica que eliminaron los residuos del medio de cultivo y llenaron diariamente durante una semana los recipientes con la solución nutritiva de Hoagland a la mitad de su concentración, lo que les permitió obtener buenos resultados.

## **2.21 Importancia de adaptación *in vitro* de plantas**

Hurtado (1994), señala que las condiciones microambientales de las plantas difieren mucho en la fase de laboratorio y en las de invernadero y campo, por ello es necesario que sean sometidas a un tratamiento de adaptación para evitar pérdidas de muchos propágulos valiosos al ser transplantados al suelo.

García (1993) menciona que esta es la etapa más difícil del cultivo, cuando las plántulas salen del ambiente estéril y rico en nutrientes (heterótrofo) del tubo de ensayo para iniciar su desarrollo en tierra (autótrofo). Esta fase requiere de condiciones adecuadas y grandes cuidados para que las plántulas no mueran por pérdidas excesivas de agua o por el ataque de microorganismos, produciendo grandes pérdidas económicas.

Pérez (1998), indica que la fase de adaptación o aclimatación es trascendental para la propagación comercial, pues del resultado de ésta, dependerá en gran medida la calidad final de las plantas y la eficiencia total del proceso.

Rosell (1990), menciona que los laboratorios en todo el mundo que producen muchas veces a escalas comerciales han visto la falta de investigar los problemas relacionados con el establecimiento y manejo *in vivo* de las plantas producidas *in vitro*. Esto debido a la necesidad de manejar en el invernadero plantas a gran escala durante el período de adaptación, con un alto grado de sobrevivencia, y a bajo costo. Ya que es evidente que hay importantes diferencias entre crecer plantas en el laboratorio y el invernadero.

La habilidad para que las plantas producidas *in vitro* sobrevivan el período de transición, puede ser un limitante para el uso comercial del cultivo de tejidos vegetales; sin embargo sabemos que algunas especies se adaptan más fácilmente que otras.

## **2.22 Definición de sustrato**

Pérez (1998), menciona que se considera sustrato, a los materiales sólidos y porosos de origen natural o sintéticos, que solos o combinados garantizan un adecuado crecimiento de las plantas bajo condiciones ambientales controladas (Abad, 1989 mencionado por Pérez 1998). Estos tienen como función dar a la planta sostén mecánico y a la vez permiten que las raíces tomen aire y agua, este puede o no intervenir en complejo proceso de la nutrición vegetal (Tortosa, 1990 mencionado por Pérez 1998). Los sustratos se emplean en canteros o en contenedores de diferentes materiales.

López (1994), indica que un sustrato es todo material sólido distinto del suelo, natural, de síntesis o residual, mineral u orgánico, que, colocado en un contenedor, en forma pura o en mezcla, permite el anclaje del sistema radicular de la planta, desempeñando, por tanto, un papel de soporte para la planta. El sustrato puede intervenir o no en el complejo proceso de la nutrición mineral de la planta.

Videla (1996), menciona que el sustrato es el medio donde la planta encuentra sustancias minerales, agua y oxígeno necesario para su crecimiento y desarrollo vegetativo. Al mismo tiempo hace de soporte a la planta. Los sustratos artificiales normalmente se obtienen por la mezcla de varios productos. Es la suma de las características de cada uno de esos productos o componentes de la mezcla la que le dará las características óptimas al sustrato.

### **2.23 Características de un buen sustrato**

Pérez (1998) indica que uno de los requisitos fundamentales que debe cumplir el sustrato para su utilización es la sanidad. Cuando estos no se elaboran, almacenan o manejan correctamente, pueden contaminarse y provocar serios daños a las plantas durante la aclimatización, por esta razón son preferidos como componentes para su elaboración, materiales inertes como la zeolita o aquellos en los cuales el proceso de obtención garantice la mayor desinfección posible, como es el caso del humus de lombriz y el compost.

También Hidalgo *et al.* (1997) sostiene que hay diversos sustratos y mezclas que se usan en la multiplicación de vitroplantas. Para obtener buenos resultados el sustrato debe reunir las siguientes características.

- Debe tener suficiente firmeza y densidad para mantener las plantas en su lugar durante el cultivo.
- Su volumen no debe variar mucho cuando esta seco o mojado; no es conveniente que el sustrato reduzca excesivamente su volumen cuando se seca.
- Debe retener suficiente humedad para evitar los riegos frecuentes.

- Deber ser lo suficientemente poroso, de modo que se escurra el exceso de agua y permita una aireación adecuada.
- Debe estar libre de malezas, nemátodos y otros organismos patógenos nocivos.
- No debe tener un nivel excesivo de salinidad.
- Debe ser esterilizado con vapor de agua y productos químicos; no debe tener efectos nocivos en las plantas.

Darias (1993), añade que el sustrato que se utilice debe de ser un medio uniforme, en el cual la planta crezca adecuadamente, tenga el pH requerido y con suficiente porosidad para permitir el drenaje y una aireación adecuada. En trabajos realizados en la Universidad Central de Las Villas (Cuba) se han obtenido muy buenos resultados con sustratos a base de suelo y humus de lombriz en diferentes proporciones.

Videla (1996), menciona que el sustrato ideal debe ser estable, es decir, no perder fácilmente sus cualidades físicas (apelmazamiento). Debe ser ligero, es decir con una baja densidad aparente. Debe tener macroporos que permitan la aireación de las raíces. Este espacio debe ser un 20 % del volumen total. Su pH debe estar alrededor de 6-6.5 que es el ideal para casi todas las plantas. Tiene que ser estéril, es decir, libre de organismos patógenos para las plantas. Tiene que tener capacidad de retención de nutrientes, y para ello debe estar presente la materia orgánica que tiene buena capacidad de intercambio iónico. Debe permitir retener agua pero sin poner en peligro la aireación. Este volumen de agua retenida debe ser el 25 % del volumen total.

López (1994) Las distintas especies pueden desarrollarse bien en diferentes sustratos, sin que exista una norma general para todas las plantas con respecto a que sustrato utilizar; sin embargo, es aconsejable emplear los sustratos con las siguientes características:

*a) Propiedades físicas:*

- Elevada capacidad de retención de agua fácilmente disponible.
- Suficiente suministro de aire.
- Distribución del tamaño de las partículas que mantenga las condiciones anteriores.

- Baja densidad aparente.
- Elevada porosidad.
- Estructura estable, que impida la contracción (o hinchazón del medio).

*b) Propiedades químicas:*

- Baja o apreciable capacidad de intercambio catiónico, dependiendo de que la fertirrigación se aplique permanentemente o de modo intermitente, respectivamente.
- Suficiente nivel de nutrientes asimilables.
- Baja salinidad.
- Elevada capacidad tampón y capacidad para mantener constante el pH.
- Mínima velocidad de descomposición.

*c) Otras propiedades:*

- Libre de semillas de malas hierbas, nematodos y otros patógenos y sustancias fitotóxicas.
- Reproductividad y disponibilidad.
- Bajo costo.
- Fácil de mezclar.
- Fácil de desinfectar y estabilidad frente a la desinfección.
- Resistencia a cambios externos físicos, químicos y ambientales.

## **2.24 Propiedades físico-químicas de los sustratos**

### **2.24.1 Propiedades físicas de los sustratos**

Videla (1996), *Densidad Aparente*: La densidad aparente de un sustrato debe ser baja, ya que de esta manera las raíces tienen facilidad para penetrar a través del mismo, al tiempo que el peso de la maceta no es grande.

Los sustratos artificiales normalmente son orgánicos en gran parte, ya que la materia orgánica tiene propiedades tales como baja densidad, elevada porosidad, gran capacidad de intercambio iónico, alta capacidad de retención de agua, etc. La otra parte del sustrato artificial está formada por sustancias minerales naturales o artificiales (tierra volcánica,

arena, perlita, vermiculita, etc.). Estos productos minerales tienen una elevada densidad real y una densidad aparente muy baja y son muy porosos.

En general un sustrato artificial tiene una granulometría mucho más gruesa que un suelo, lo que facilita la aireación aunque en detrimento de la retención de agua. Por ello, al hacer una mezcla a base de sustancias orgánicas y minerales, hay que tratar de buscar el equilibrio entre retención de agua y aireación.

*Porosidad:* Es el volumen total del medio no ocupado por las partículas sólidas, y por tanto, lo estará por aire o agua en una cierta proporción. Su valor óptimo no debería ser inferior al 80-85 %, aunque sustratos de menor porosidad pueden ser usados ventajosamente en determinadas condiciones.

*Estructura:* Puede ser granular como la de la mayoría de los sustratos minerales o bien fibrilar. La primera no tiene forma estable, acoplándose fácilmente a la forma del contenedor, mientras que la segunda dependerá de las características de las fibras. Si son fijadas por algún tipo de material de cementación, conservan formas rígidas y no se adaptan al recipiente pero tienen cierta facilidad de cambio de volumen y consistencia cuando pasan de secas a mojadas.

*Granulometría:* El tamaño de los gránulos o fibras condiciona el comportamiento del sustrato, ya que además de su densidad aparente varía su comportamiento hídrico a causa de su porosidad externa, que aumenta de tamaño de poros conforme sea mayor la granulometría.

### **2.24.2 Propiedades químicas de los sustratos**

Videla (1996), indica que las propiedades químicas de un sustrato son importantes, ya que de ellas dependerá en gran parte la disponibilidad de nutrientes. Según sea el pH del sustrato estarán disponibles en mayor o menor medida los iones de unos u otros minerales. Así por ejemplo, con un pH bajo están poco disponibles los iones de Calcio, Azufre y Potasio, mientras que a pH alto son poco asimilables los iones de Fósforo, Hierro,

Manganeso, Cinc, etc. Por estos motivos el pH de un sustrato debe estar alrededor de 6,5 ya que este es al parecer el punto de máxima disponibilidad de nutrientes.

El sustrato ideal debe tener nutrientes en forma asimilable para la planta (nitrógeno, potasio, fósforo, azufre, calcio, magnesio y hierro entre los macroelementos y cobre, cinc, sodio, manganeso, boro, cloro y molibdeno entre los microelementos). Estos nutrientes, sobre todo el N,P y K, deben ser aportados mediante abonados ya que las necesidades de la planta son grandes y el espacio con sustrato de una maceta es pequeño.

López (1994), menciona que la reactividad química de un sustrato se define como la transferencia de materia entre el sustrato y la solución nutritiva que alimenta las plantas a través de las raíces. Esta transferencia es recíproca entre sustrato y solución de nutrientes y puede ser debida a reacciones de distinta naturaleza:

*a) Químicas.* Se deben a la disolución e hidrólisis de los propios sustratos y pueden provocar:

- Efectos fitotóxicos por liberación de iones  $H^+$  y  $OH^-$  y ciertos iones metálicos como el  $Co^{+2}$ .
- Efectos carenciales debido a la hidrólisis alcalina de algunos sustratos que provoca un aumento del pH y la precipitación del fósforo y algunos microelementos.
- Efectos osmóticos provocados por un exceso de sales solubles y el consiguiente descenso en la absorción de agua por la planta.

*b) Físico-químicas.* Son reacciones de intercambio de iones. Se dan en sustratos con contenidos en materia orgánica o los de origen arcilloso (arcilla expandida) es decir, aquellos en los que hay cierta capacidad de intercambio catiónico (C.I.C.). Estas reacciones provocan modificaciones en el pH y en la composición química de la solución nutritiva por lo que el control de la nutrición de la planta se dificulta.

*c) Bioquímicas.* Son reacciones que producen la biodegradación de los materiales que componen el sustrato. Se producen sobre todo en materiales de origen orgánico, destruyendo la estructura y variando sus propiedades físicas. Esta biodegradación libera  $CO_2$  y otros elementos minerales por destrucción de la materia orgánica.

### **2.24.3 Propiedades biológicas.**

Cualquier actividad biológica en los sustratos es claramente perjudicial. Los microorganismos compiten con la raíz por oxígeno y nutrientes. También pueden degradar el sustrato y empeorar sus características físicas de partida. Generalmente disminuye su capacidad de aireación, pudiéndose producir asfixia radicular. La actividad biológica está restringida a los sustratos orgánicos y se eliminarán aquellos cuyo proceso degradativo sea demasiado rápido.

Así las propiedades biológicas de un sustrato se pueden concretar en:

*a) Velocidad de descomposición.* La velocidad de descomposición es función de la población microbiana y de las condiciones ambientales en las que se encuentre el sustrato. Esta puede provocar deficiencias de oxígeno y de nitrógeno, liberación de sustancias fitotóxicas y contracción del sustrato. La disponibilidad de compuestos biodegradables (carbohidratos, ácidos grasos y proteínas) determina la velocidad de descomposición.

*b) Efectos de los productos de descomposición.* Muchos de los efectos biológicos de los sustratos orgánicos se atribuyen a los ácidos húmicos y fúlvicos, que son los productos finales de la degradación biológica de la lignina y la hemicelulosa. Una gran variedad de funciones vegetales se ven afectadas por su acción.

*c) Actividad reguladora del crecimiento.* Es conocida la existencia de actividad auxínica en los extractos de muchos materiales orgánicos utilizados en los medios de cultivo.

### **2.25 Materiales empleados en la elaboración de sustratos**

Videla (1996) Existe un elevado número de materiales aptos para la formación de sustratos. En general los más conocidos son: Las turbas, los residuos forestales (hojas y cortezas), las arenas y los materiales sintéticos (perlita, vermiculita, lana de roca, poliestireno, etc.) para cultivos en macetas. Para cultivos en pleno suelo también se elaboran sustratos con estiércoles, mantillos, tierra vegetal, etc.

Hidalgo *et al.* (1997) manifiestan que existen diferentes tipos de sustratos entre los cuales se menciona.

**Arena:** Según Hidalgo (1997) la arena está formada por pequeños gránulos de piedra de 0.05-2.0 mm de diámetro que se originan por la intemperización de diversas rocas. La arena es más usada en los sustratos para enraizamiento. La arena virtualmente no contiene nutrientes minerales y no tiene capacidad amortiguadora (buffer) respecto a las sustancias químicas.

La arena es una de las sustancias más utilizada en la mezcla de sustratos, aunque se emplea en pequeñas cantidades. La arena mejora la estructura del sustrato, pero aporta peso al mismo. Las arenas utilizadas no deben contener elementos nocivos tales como sales, arcillas o plagas. El grano no debe ser grueso. La arena de río, que es la mejor, debe estar limpia para ser utilizada en sustratos. La arena utilizada en construcción no es buena porque lleva mucha arcilla y se compacta.

**Humus de lombriz:** Moreno (1997), indica que el humus es el último estadio de la materia orgánica, rico en ácidos orgánicos suaves (ácido húmicos), y actúa en las propiedades de agregación de las partículas (estructura), estando también íntimamente ligado a la materia mineral (complejo Arcilla-Humus).

Resulta de la transformación de materiales orgánicos al pasar por el intestino de las lombrices, en donde se mezcla con elementos minerales, microorganismos y fermentos, que provocan cambios en la bioquímica de la materia orgánica. Estas lombrices son la *Eisenia foetida* y la *Lombricus rubellus* o híbridos próximos, comercialmente denominada lombriz roja de California. Sade (1980).

Pérez (1998) indica que el humus de lombriz es un abono orgánico producido por las deyecciones de las lombrices conocido como vermicompost, es el abono orgánico más completo e integral que se conoce, de fácil manejo y obtención, su presencia física es de color negro, similar a la borra de café, muy liviano e inodoro, posee los nutrientes esenciales para la planta tales como: N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn y Mo, tiene la facilidad de convertir con mayor facilidad el nitrógeno y el fósforo orgánico a formas asimilables.

**Turbas:** es un conjunto de materiales orgánicos producidos por la descomposición lenta de follaje de árboles, vegetales y pastos en regiones con exceso de humedad y deficiente oxigenación. Sade (1980).

Pérez (1998), menciona que la turba es un material natural que se utiliza como enmienda orgánica o como sustrato de cultivo. Consiste en una masa esponjosa enriquecida en carbono proveniente de la descomposición de masas vegetales. La descomposición de éstos restos vegetales es parcial pues ocurre en zonas pantanosas bajo condiciones anaeróbicas. Los vegetales que le dan origen, fundamentalmente los musgos del género *Sphagnum*, tienen la propiedad de ser muy higroscópicos aún después de muertos.

Moreno (1997), indica que las turbas son los materiales más empleados en la elaboración de sustratos para macetas debido a sus cualidades. Las turbas rubias o poco descompuesta debido a su estructura posee una excelente porosidad y es buena receptora de soluciones nutritivas, proporcionando gran aireación a las raíces.

Las turbas negras, más descompuestas son de peor calidad, retienen peor el agua y poseen menos aireación para las raíces. Para utilizar la turba hay que desmenuzarla y humedecerla ligeramente, ya que de otra manera se hace difícil su manipulación.

**Compost:** Es el producto de la mezcla de todos los desechos vegetales y estiércol en pilas bien ordenadas y almacenadas, con el objetivo de que sufran la descomposición microbiana mediante fermentación, convirtiéndose en un tiempo prudencial en humus, dependiendo esto del grado de descomposición de la materia prima empleada, los microorganismos inoculados y el manejo realizado a las pilas (Pérez 1998).

**Musgo:** El musgo comercial está constituido por los restos deshidratados de plantas de los pantanos ácidos del género *Sphagnum*, como *S. papillosum*, *S. capillaceum* y *S. palustre*. Los residuos de estas plantas usualmente están libre de patógenos, son de poco peso y tienen una gran capacidad de retención de agua; puede absorber unas 10 a 20 veces su peso. Para mezclar este material con suelo y arena por lo general se despedaza a mano o por medios mecánicos. El musgo con frecuencia se añade a la arena en

proporciones diversas para aumentar la capacidad de retención de agua de la mezcla. Esta combinación es un buen sustrato para la siembra de semillas sexuales, plántulas y tubérculos-semillas de la mayoría de los cultivares de papa (Hurtado 1997).

**Residuos forestales:** El más conocido y utilizado es la corteza de pino, que es bastante estable y airea el sustrato. Debe estar triturada en trozos muy pequeños (1-2 cm.) y se mezcla con turba en cantidades variables. También se utiliza el aserrín siempre que no provenga de maderas tratadas con productos tóxicos para las plantas. En los sustratos que utilicen estos residuos hay que aportar dosis complementarias de abonos nitrogenados, ya que estos residuos forestales no aportan nitrógeno.

### **Sustancias artificiales:**

*Perlita:* Es de origen volcánico. Sometida a altas temperaturas se expande y da unas partículas blancas de poco peso, estériles y muy útiles para proporcionar porosidad y aireación al sustrato. Posee una capacidad de retención de agua de hasta 5 veces su peso. Tiene un pH de 7-7.5

*Arcilla expandida:* Obtenida a partir de cierta arcilla sometida a altas temperaturas que forman unas bolas que poseen baja capacidad de retención de agua y buena capacidad de aireación. Su pH está entre 5-7.

*Lana de roca:* Obtenida al fundir a altas temperaturas rocas volcánicas calcáreas y carbón de Cock, dando origen a unas fibras que se mezclan con una resina para estabilizarlas. Pueden retener hasta el 80% de su volumen en agua y tienen una porosidad elevada. Su pH oscila entre 7-9.5.

*Poliestireno expandido:* Es un plástico desmenuzado de color blanco muy ligero y con poca capacidad de retención de agua y mucha porosidad. Su pH oscila entre 6-6.3.

## 2.26 Ambientes atemperados

### *Carpas solares, camas orgánicas, walipinis*

Estrada (1995), los define como ambientes donde se crean las condiciones adecuadas para el desarrollo del cultivo, es decir un clima artificial con la protección de un material plástico, en estos casos a diferencia de los invernaderos no se tiene un control de los factores ambientales.

### *Invernaderos*

Alpi (1999), expresa que un invernadero es toda aquella estructura cerrada cubierta por materiales transparentes, dentro de la cual es posible obtener unas condiciones artificiales de microclima, teniendo el control de todos los factores ambientales como ser temperatura, humedad relativa, iluminación, CO<sub>2</sub> y con ello cultivar plantas fuera de estación en condiciones óptimas.

Bernat (1987), indica que el invernadero de cristal, es un invernadero propiamente dicho, y solía disponer de sistema de calefacción, iluminación artificial, ventilación controlada, etc. La evolución de los materiales plásticos hace que se utilicen cada vez más en la construcción de invernaderos. En definitiva, podemos hablar de invernaderos “equipados” y de “simples cubiertas protectoras”.

### *Ventajas del empleo de invernaderos:*

- Precocidad en los frutos.
- Aumento de la calidad y del rendimiento.
- Producción fuera de época.
- Ahorro de agua y fertilizantes.
- Mejora del control de insectos y enfermedades.
- Posibilidad de obtener más de un ciclo de cultivo al año.

### *Inconvenientes:*

- Alta inversión inicial.
- Alto costo de operación.
- Requiere personal especializado, de experiencia práctica y conocimientos teóricos.

El desarrollo de los cultivos, en sus diferentes fases de crecimiento, está condicionado por cuatro factores ambientales o climáticos: temperatura, humedad relativa, luz y CO<sub>2</sub>. Para que las plantas puedan realizar sus funciones es necesaria la conjunción de estos factores dentro de unos límites mínimos y máximos, fuera de los cuales las plantas cesan su metabolismo, pudiendo llegar a la muerte.

### *Temperatura.*

Este es el parámetro más importante a tener en cuenta en el manejo del ambiente dentro de un invernadero, ya que es el que más influye en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Normalmente la temperatura óptima para las plantas se encuentra entre los 10 y 20° C. Para el manejo de la temperatura es importante conocer las necesidades y limitaciones de la especie cultivada.

### *Humedad relativa.*

La humedad relativa es la cantidad de agua contenida en el aire, existe una relación inversa de la temperatura con la humedad por lo que a elevadas temperaturas, aumenta la capacidad de contener vapor de agua y por tanto disminuye la HR. Con temperaturas bajas, el contenido en HR aumenta.

### *Iluminación.*

A mayor luminosidad en el interior del invernadero se debe aumentar la temperatura, la HR y el CO<sub>2</sub>, para que la fotosíntesis sea máxima; por el contrario, si hay poca luz pueden descender las necesidades de otros factores.

Para mejorar la luminosidad natural se usan materiales de cubierta con buena transparencia, orientación adecuada del invernadero y materiales que reduzcan al mínimo las sombras interiores. Por el contrario para reducir la luminosidad se emplean: blanqueo de cubiertas, mallas de sombreo.

## *CO<sub>2</sub>*

El anhídrido carbónico de la atmósfera es la materia prima imprescindible de la función clorofílica de las plantas. El enriquecimiento de la atmósfera del invernadero con CO<sub>2</sub>, es muy interesante en muchos cultivos, tanto en hortalizas como en flores.

La concentración normal de CO<sub>2</sub> en la atmósfera es del 0,03%. Este índice debe aumentarse a límites de 0,1-0,2%, cuando los demás factores de la producción vegetal sean óptimos, si se desea el aprovechamiento al máximo de la actividad fotosintética de las plantas. Las concentraciones superiores al 0,3% resultan tóxicas para los cultivos.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Ubicación del área de estudio

El presente estudio estuvo dividido en dos etapas, la primera se realizó en el Laboratorio del Instituto de Genética y Biotecnología Vegetal, ubicada en la Facultad de Ciencias Puras de la ciudad de La Paz.

La segunda etapa se llevó a cabo en la carpa solar del campus universitario de la Facultad de Agronomía ubicada en la zona de Cota Cota, Provincia Murillo del departamento de La Paz, la misma se encuentra a una altitud de 3420 msnm, 16°34' de latitud sur y 68°05' de longitud oeste, a media hora del centro de la ciudad. (Estación de Ovejuyo, 1995-1996).

### 3.2 Materiales

#### 3.2.1 Material genético vegetal

**Vitroplantas de *Stevia rebaudiana*:** En 1995 el Egr. Walter Bautista en su proyecto de tesis realizado en el Instituto de Genética y Biotecnología Vegetal, introduce la stevia *in vitro* por cultivo de tejidos a partir de meristemos (**Ilustración 1**), la variedad utilizada fue "*Blanca*". El objetivo de dicho trabajo era evaluar el medio nutritivo más adecuado para la micropropagación de la stevia. Cabe recalcar que el presente estudio es una continuación al anterior trabajo, por ello se utilizó el medio nutritivo más óptimo recomendado por Bautista para la micropropagación de stevia, logrando obtener hasta 300 vitroplantas.

#### 3.2.2 Materiales de laboratorio

- Termómetro.
- Cajas petri.
- Frascos.
- Pipetas.

- Probeta de 1000 ml.
- Vaso de precipitado de 50, 100 y 1000 ml.
- Bisturí.
- Pinzas de disección.
- Micropipetas de 20, 100, 1000 ul.
- Piceta.
- Gradilla.
- Mechero.
- Algodón.
- Detergente.
- Papeles filtro, madera y aluminio.

### 3.2.3 Reactivos

Solución nutritiva de Murashig Skoog para 1000 ml:

<b>REACTIVO</b>	<b>CANTIDAD</b>
<b>Macros:</b>	
KNO <sub>3</sub>	1900 mg
<b>Micros I:</b>	
ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	8.6 mg
<b>Micros II:</b>	
FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	27.85 mg
<b>Vitaminas y otros:</b>	
Tiamina	0.1 mg
Kinetina	0.5 mg
Inositol	100 mg
Agar	6 g
Sucrosa	30 g
<b>Reguladores:</b>	
Ácido 3 indol butírico	0.30 mg
Ácido giberélico	0.10 mg

### **3.2.4 Equipos**

- Cámara de flujo laminar de aire.
- Destilador de agua.
- Phmetro.
- Agitador magnético.
- Balanza analítica de precisión.
- Autoclave.
- Refrigerador.

### **3.2.5 Materiales de campo**

- Pala.
- Picota.
- Cinta métrica.
- Lienzo.
- Marbetes.
- Macetas de polietileno (bolsas) 20 x 25 cm.
- Vasos plásticos desechables.
- Bolsa nylón.
- Tela a manera de tul.
- Balanza.
- Regaderas.
- Tijeras podadoras.
- Libreta de campo.

#### ***Insumos:***

- Funguicidas (Benlate, Mancozeb)
- Insecticida (Dimetoato)
- Desinfectante de sustratos (Dazomet).

### 3.3 Metodología

El trabajo realizado fue dividido en dos etapas: trabajo de laboratorio y de invernadero. El trabajo de invernadero fue dividido en dos fases, una de adaptación y la otra de crecimiento.

#### 3.3.1 Diseño experimental

El presente estudio se realizó bajo el diseño estadístico de **Bloques Completamente al Azar**, producto de 4 tratamientos y 4 repeticiones distribuidos aleatoriamente a través de permutaciones al azar. Calzada, (1982).

#### Modelo lineal aditivo

$$Y_{ij} = \mu + B_j + T_i + E_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = observación individual

$\mu$  = media de la población

$B_j$  = efecto del j-ésimo N° de bloques

$T_i$  = efecto del i-ésimo N° de tratamientos

$E_{ij}$  = error experimental

La prueba de comparación de medias se realizó a través de la prueba estadística de Duncan al 5%.

#### 3.3.2 Factores en estudio

El **Cuadro 3** describe los materiales utilizados y las cantidades presentes en las que se encuentran en cada tratamiento.

### Cuadro 3: Material utilizado

Tratamientos	Proporción de las mezclas	Descripción de los sustratos
T1	1:3:0	Arena fina – tierra del lugar
T2	1:1:2	Arena fina – aserrín – humus
T3	1:2:1	Arena fina – turba – aserrín
T4	2:1:1	Arena fina – turba – humus

Fuente: Elaboración propia

Las dimensiones del ensayo son las siguientes:

Nº de tratamientos	4
Nº de repeticiones	4
Nº de plantas por unidad experimental	9
Largo de las unidades experimentales	1m
Ancho de las unidades experimentales	1m
Área de las unidades experimentales	1m <sup>2</sup>
Ancho de los pasillos	0.50m
Área total del ensayo	30m <sup>2</sup>

Croquis de campo. (Véase Anexo 2)

### 3.4 Trabajo de laboratorio

**a) Asepsia del laboratorio:** Todo el material de vidrio y de disección a utilizarse en laboratorio debe estar completamente estéril, para proceder con la preparación del medio de cultivo. Para el presente proyecto se utilizó el medio nutritivo más óptimo, recomendado por Bautista, (1995) en su proyecto de tesis de grado.

**b) Micropropagación:** Según García (1993), la micropropagación consiste en cultivar segmentos apicales y nodales con su yema axilar en un medio nutritivo estéril, por medio de esta se puede producir un gran número de plantas, en un período relativamente corto.

- El trabajo se realizó en la cámara de flujo laminar.
- Se destaparon los tubos de ensayo que contenían a las plantas.
- Se flamearon los tubos de ensayo para evitar la contaminación.
- Con una pinza esterilizada se extrajo la planta.
- Se seccionó el tallo en segmentos que contenían los nudos y sus respectivas yemas axilares de aproximadamente 1 cm de largo.
- Inmediatamente se sembró en el medio de cultivo contenida en frascos de multiplicación (**Ilustración 2**).
- Se flameó el frasco y después de taparlo se procedió a sellar el mismo con papel parafilm para evitar pérdida de humedad.

Luego de la micropropagación estos explantes fueron colocados en una sala de crecimiento con las siguientes condiciones:

Iluminación	2.000 lux
Temperatura	23 grados centígrados
Fotoperíodo	16 horas luz y 8 horas sombra

Las vitroplantas permanecieron en este ambiente por un lapso de un mes hasta formar raíces y alcanzar una altura aproximada de 10 (cm), en esta etapa de estudio se realizó una selección del material, separando los frascos contaminados con hongos.

Se realizaron cuatro repiques y habiendo partido de 30 tubos de ensayo aproximadamente se obtuvo un total de 300 vitroplantas sanas para posteriormente ser trasladadas a la carpa solar.

### **3.5 Trabajo de invernadero**

El trabajo de invernadero fue dividido en dos fases: la fase de adaptación que tuvo una duración de un mes y la fase de crecimiento que abarcó un periodo de cuatro meses.

**a) Preparación de las unidades experimentales:** Se realizó una limpieza general del terreno, para luego proseguir con el nivelado del mismo. Posteriormente se demarcó la

ubicación de los bloques con ayuda de una cinta métrica y un lienzo, formando de esta manera 4 bloques y 16 unidades experimentales.

**b) Desinfección de los sustratos:** Primero se procedió a pesar los distintos sustratos, seguidamente se realizó las mezclas en diferentes cantidades, éstos últimos fueron esterilizados por medio de un desinfectante de suelos granulado llamado Basamid (Dazomet 98%) (**Ilustración 3**), eficaz contra hongos, nemátodos, insectos del suelo, malezas y sus semillas.

Entre la aplicación del producto y el trasplante se esperó un tiempo de aireación de aproximadamente 40 días, para evitar daños en las plántulas por vestigios de gases. La dosis recomendada según el envase para pequeñas cantidades de sustrato es de 200 a 250 g/m<sup>3</sup>. Después de este lapso se procedió al llenado de bolsas plásticas, al riego y a su distribución en las unidades experimentales.

**c) Toma de datos de temperatura:** El cultivo de la stevia es susceptible a cambios bruscos de temperaturas (según Molinas 1986), es así que un mes antes del trasplante se tomaron datos de la temperatura para ver las fluctuaciones dentro de la carpa solar.

**d) Aislamiento del área experimental:** Debido a que las vitroplantas son un material bastante delicado y completamente séptico (según Darías 1993), además para evitar fluctuaciones de temperatura se realizó un aislamiento alrededor del área experimental utilizando una tela a manera de tul separándola del resto de la carpa solar. Con esto se logró que las temperaturas subsiguientes no fueran muy extremas, el aislamiento fue retirado al cabo de un mes después del trasplante (ver **Ilustración 4**).

### **3.6 Trasplante**

El trasplante fue manual y se realizó en la mañana para evitar los rayos directos del sol. Se procedió a extraer las plántulas con cuidado usando pinzas para facilitar su salida de los frascos (**Ilustración 5**), luego se lavaron las raíces con agua destilada para eliminar residuos adheridos del agar.

Después del lavado se sumergieron las raíces en una solución de fungicida al 2,5% de Benomyl cuyo nombre comercial es Benlate, a continuación se hicieron hoyos de 3 cm de diámetro y una profundidad de 10 cm en los sustratos con la ayuda de un punzón.

Las plántulas fueron introducidas en los sustratos, cuidando que las raíces no sean dañadas y que las 2/3 partes de la plántula queden inmersos en el suelo, éstas apenas deben salir de la superficie del suelo, se presionó el sustrato alrededor de la planta para mejorar el contacto de las raíces con el suelo evitando la presencia de bolsones de aire. Después de un riego ligero usando una solución de Benlate al (0.1%), se cubrió cada planta con un vaso plástico desechable para mantener una alta humedad (**Ilustración 6**).

Además de los vasos plásticos, y siguiendo la recomendación de Pérez. (1998), se cubrió cada una de las unidades experimentales con cobertores de polietileno, siempre con el fin de evitar pérdidas de humedad, los cuales fueron retirados al cabo de cinco días.

### **3.7 Fase de adaptación y reposición**

En esta fase se realizaron los tres primeros orificios en los vasos plásticos con la finalidad de ir disminuyendo poco a poco la humedad, este procedimiento se realizó día por medio incrementando el número de orificios a medida que pasaba el tiempo. Los vasos plásticos fueron retirados en un lapso de 30 días, tiempo que dura la fase de adaptación.

Una semana después del trasplante se realizó la reposición de acuerdo a la cantidad de plantas muertas por unidad experimental y tratamiento.

### **3.8 Fase de crecimiento**

Esta fase se contabilizó después del mes de adaptación. Consistió en medir las mismas variables de respuesta que para la fase de adaptación (altura de la planta, números de tallos por planta, número de hojas por planta, ancho y largo de hojas) hasta la floración, alcanzando un periodo que corresponde a tres meses. (**Ilustración 7**).

### 3.9 Labores culturales

**Sombreado:** Considerando que las altas temperaturas en la carpa solar provocan una excesiva evapotranspiración y pérdida de agua que marchita las plantas, se proporcionó una semi-sombra con una tela mojada en la fase de adaptación, con el fin de atenuar las altas temperaturas registradas en la carpa solar en horas pico. El sombreado fue retirado al cabo de un mes.

**Deshierbes:** La existencia de hierbas fue muy escasa, en las macetas plásticas sin embargo se realizaron deshierbes a medida que se notó su presencia. No obstante se realizaron deshierbes una vez al mes dentro la carpa solar alrededor del experimento, notándose la presencia de hierbas como mostacilla (*Brassica campestris*), kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), alfalfa (*Medicago polymorpha*).

**Escardas:** Se realizaron dos escardas por mes para evitar la compactación de los sustratos y facilitar el mejor drenaje del agua al igual que la oxigenación.

**Aporque:** Se realizó un aporque para evitar el acame del vástago de la planta, para ello se adicionó sustrato a cada maceta, y así proveer un mejor soporte a la planta según su desarrollo.

**Control fitosanitario:** Se efectuó dos aspersiones con el fungicida sistémico Benlate en una dosis de 15 gramos para 20 litros de agua a los 30 y 60 días. Pese a todo existió la presencia de manchas foliares, por consiguiente de manera preventiva las aspersiones posteriores se realizaron con Mancozeb en una dosis recomendable de 60 gramos para 20 litros de agua.

También se efectuaron aspersiones con Dimetoato al 40% para contrarrestar el ataque de la mosca blanca de invernaderos (**Ilustración 8**), que según García de la Rosa (1991) las ninfas y adultos se alimentan extrayendo la savia del floema, causando amarillez, achaparramiento, marchitez, clorosis y otros. La dosis recomendada para este insecticida es de 1.000cc para una hectárea.

**Riego:** Los primeros 5 días el riego se realizó a diario en una cantidad no mayor a los 20 cc para cada maceta plástica, posterior a este tiempo la cantidad de agua se incrementó a 50cc para mantener la humedad del suelo, debido a que fue retirado el nylon que protegía cada bloque, a medida que las plantas fueron creciendo se aumentó la cantidad de agua y el lapso entre riegos se prolongó cada 3 y 5 días.

### **3.10 Cosecha**

La cosecha se realizó a los cinco meses después del trasplante antes de la apertura de los botones florales. Esta cosecha fue realizada por bloques cumpliendo el mismo lapso de tiempo que se tuvo en el trasplante, teniendo cuidado de no mezclar los tratamientos.

El corte de las plantas se realizó a 10 cm de la superficie del suelo con ayuda de tijeras podadoras. Esta práctica se realizó por la mañana para facilitar el mejor secado durante el día.

### **3.11 Post cosecha**

**Secado:** Tan pronto se efectuó el corte, las ramas fueron transportadas a la sombra donde se esparcieron convenientemente para que no se marchiten y conserven el color verde de las hojas, una vez en la sombra las hojas fueron removidas dos veces al día. En tales condiciones, las hojas secan rápidamente, pudiendo amontonarse sin inconveniente desde el 5<sup>to</sup> a 6<sup>to</sup> día del corte.

**Limpieza:** Consistió en quitar ramas y hojas marchitas.

**Almacenamiento:** Se embolsó y almacenó en un lugar seco y ventilado.

### 3.12 Variables de respuesta

Las principales características consideradas como variables de evaluación fueron:

- **Prendimiento de plántulas (%):** Se procedió al conteo, cuando el 50% de las plántulas prendieron (15 días después del trasplante). Los datos obtenidos se llevaron a porcentaje.
- **Altura de planta:** Para medir esta variable se utilizó un flexómetro, se midieron cuatro plantas por unidad experimental, se midió cada planta desde el cuello de la raíz hasta el ápice de la hoja superior.
- **Número de tallos por planta.-** Se contaron los tallos de cuatro plantas seleccionadas por unidad experimental.
- **Número de hojas por planta.-** Se contabilizó las hojas de cuatro ramas para obtener luego un total por planta, las plantas seleccionadas por unidad experimental para ser contabilizadas fueron cuatro.
- **Ancho y Largo de hojas.-** Con la ayuda de un flexómetro se midió 10 hojas por planta de cuatro plantas seleccionadas la medición se hizo de borde a borde de la hoja para el ancho y de la base al ápice de la hoja para el largo.
- **Incidencia de plagas y enfermedades.-** Para esta variable se contaron todas las plantas enfermas por unidad experimental, y se utilizó la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de daño} = \frac{N^{\circ} \text{ de plantas atacadas}}{\text{Total de plantas evaluadas}} * 100$$

- **Días a la floración.-** Para esta variable se tomó en cuenta el tiempo transcurrido desde el trasplante de las vitroplantas hasta tener un 50% de inflorescencias abiertas.

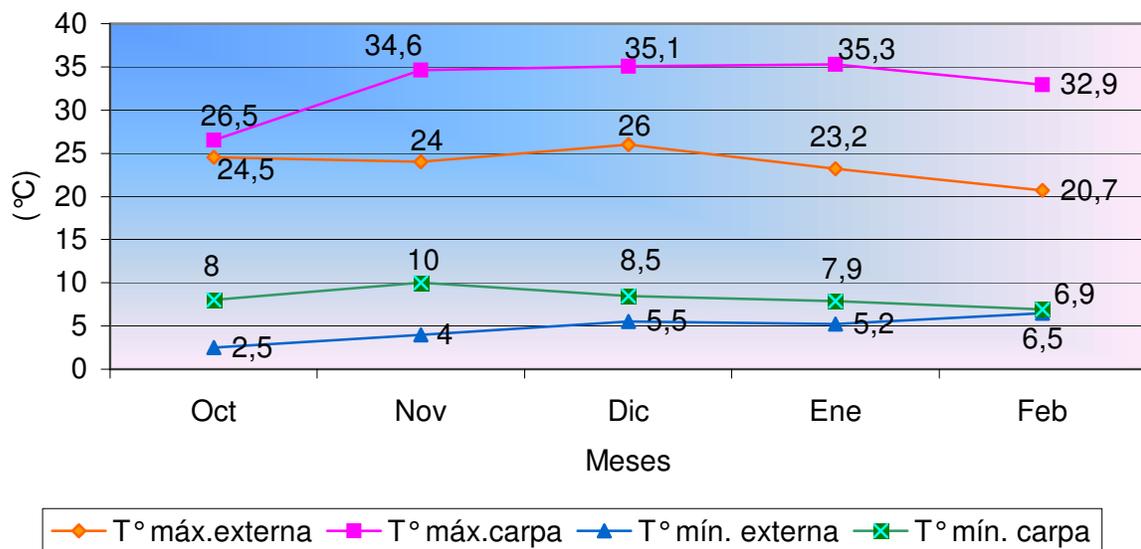
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Una vez identificadas las variables de respuesta, a continuación se muestran los resultados obtenidos en el presente ensayo con sus respectivos análisis de varianza, gráficas, interpretación y discusión.

### 4.1 Condiciones climáticas

#### 4.1.1 Temperatura

La **Figura 1** muestra las temperaturas máximas y mínimas registradas dentro y fuera de la carpa solar, en ella se observa que las temperaturas más altas dentro de la carpa solar se registraron en los meses de diciembre y enero (35,1 y 35,3°C) respectivamente.



**Figura 1: Temperaturas máximas y mínimas dentro y fuera de la carpa solar**

La temperatura más baja dentro la carpa solar se registró en febrero con 6,9 °C. Las temperaturas máximas y mínimas de la carpa solar siguieron la misma tendencia que las temperaturas externas, pero en la **Figura 1** se observa claramente que las temperaturas

registradas dentro de la carpa solar fueron superiores a las registradas fuera de la carpa, siendo que las temperaturas para las vitroplantas deben ser mayores se justifica el uso de una carpa solar.

El promedio de temperatura externa fue de 14,5°C y la registrada dentro de la carpa fue de 22°C. Por lo tanto las temperaturas registradas en el presente estudio están dentro el rango para el cultivo de la Stevia, como corrobora Molinas (1986) quien indica que la Stevia soporta temperaturas de 6 a 43 °C, siendo lo óptimo 20 a 25 °C.

A su vez Sade (1980), indica que las fluctuaciones de temperatura afectan el crecimiento de las plantas es así que en ensayos realizados con plantas de tomate híbrido, se observó que las plantas detienen su crecimiento y su floración a temperaturas excesivas a 37°C. Para evitar las fluctuaciones de temperatura dentro la carpa solar, se justifica el uso de un aislamiento.

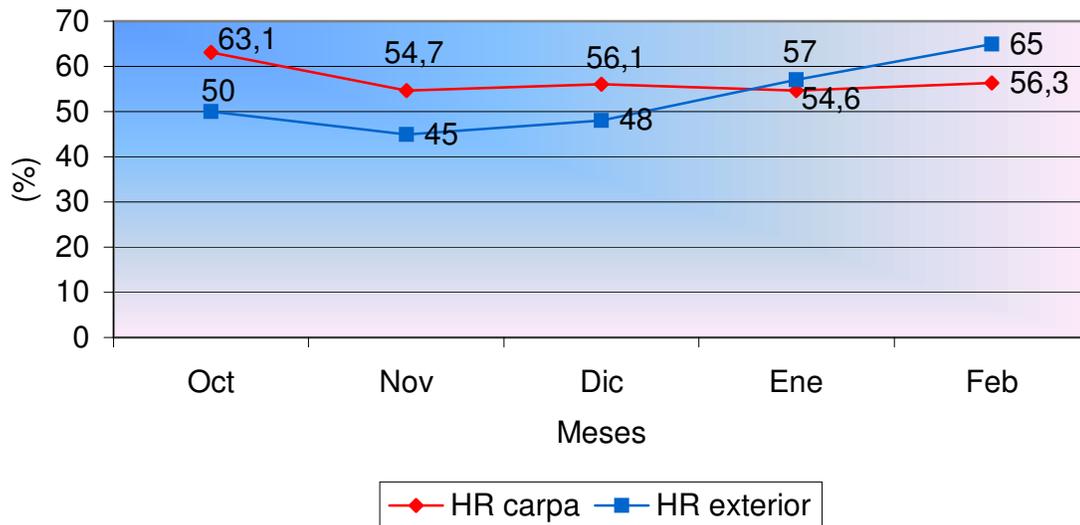
Hartmann (1990), indica que el aislamiento de un ambiente atemperado es muy importante para conseguir un óptimo balance térmico, también Sade (1980) añade que la temperatura puede considerarse como factor limitante y estimulante de los procesos fisiológicos que se originan en todos los órganos de las plantas.

#### **4.1.2 Humedad relativa**

La humedad relativa dentro de la carpa solar es una variable de mucha importancia, puesto que para la adaptación de vitroplantas se requiere que esta sea elevada de acuerdo con Hermoso. (1999), quien indica que la humedad relativa ambiente ideal para las plantas gira alrededor del 50-70%; tales condiciones son beneficiosas para el desarrollo de las plantas y son desfavorables para las enfermedades. Por otro lado el mismo autor sostiene que valores elevados de humedad relativa por espacio de más de 20 horas propician el desarrollo de patógenos y enfermedades del follaje de la planta.

La **Figura 2** muestra que el porcentaje de humedad relativa registrada dentro de la carpa solar fue mayor para los meses de octubre, noviembre y diciembre (63.1, 54.7, 56.1%) con

relación a la humedad externa, ello debido al riego que fue imprescindible para elevar la humedad en la fase de trasplante de las vitroplantas y garantizar su sobrevivencia.



**Figura 2: Humedad relativa, dentro y fuera de la carpa solar**

Quezada (1992), indica que la cantidad de agua perdida en 24 horas es equivalente a 2-3 veces el peso inicial de la planta. Además (Amar *et al.*, 1995) indica que los estomas de las vitroplantas se encuentran abiertos debido a su capacidad reducida de formar cutículas cerosas, también Ziv (1999) añade que otra manera de pérdida de humedad en las plantas es el exceso de transpiración de las plantas jóvenes, hasta que éstas logren un adecuado desarrollo de los estomas y la cutícula.

Aguirre (1997), indica que cuando no se repone la pérdida de agua, conlleva a un stress hídrico severo. Por lo mencionado anteriormente se justifica el incremento de humedad relativa generada por el riego.

Para los meses de enero y febrero los valores de humedad relativa dentro la carpa solar disminuyeron hasta un promedio de 55% debido principalmente a la falta de riego que a un principio se proporcionó a las plantas para favorecer su adaptación. Según Hurtado (1994), menciona que el riego debe ir disminuyendo a medida que las plantas crecen y se van adaptando.

## 4.2 Características físico-químicas de los sustratos

La calificación del grado de fertilidad de un sustrato está estrechamente vinculada con sus contenidos de materia orgánica y macroelementos; es decir que las cantidades de carbono, nitrógeno orgánico, fósforo y potasio son determinantes indicadores del potencial o real uso al que puede ser sometido el mismo, según Reicosky *et al.* (1995).

A continuación el **Cuadro 4** muestra un resumen del análisis físico-químico (Para ver el análisis completo ver Anexo 3) de los cuatro sustratos y sus respectivas características, obtenidos por el laboratorio del Instituto Boliviano de Ciencia y Tecnología Nuclear (IBTEN).

**Cuadro 4: Análisis físico-químico de los sustratos**

Identificación	Tratamientos			
	T1	T2	T3	T4
Clase textural	FYA	FYA	FYA	FYA
PH	5.48	6.88	4.77	6.23
C. E. dS m <sup>-1</sup>	0.421	0.832	0.922	1.182
CIC cmol(+)/kg.	13.926	21.734	16.948	20.969
% SB	99.5	99.7	99.6	99.8
% M.O.	11.71	25.78	32.54	12.28
% N total	0.53	0.57	0.47	0.42
P ppm	15.34	39.17	9.56	48.17
K ppm	0.28	3.68	0.4	2

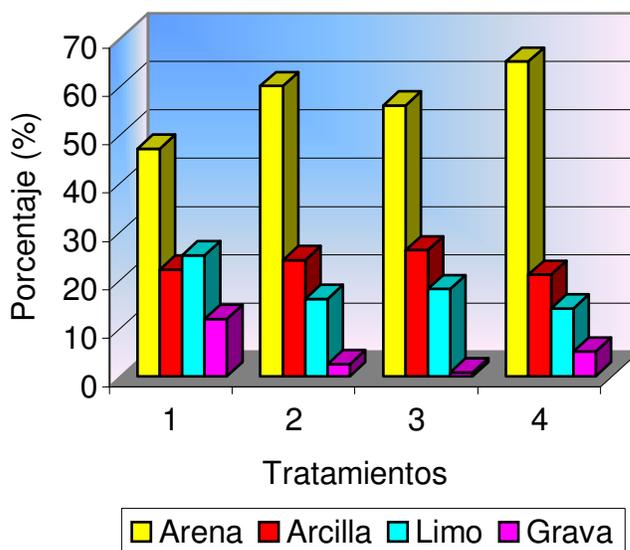
Fuente: IBTEN (1999)

### 4.2.1 Clase textural

Como se observa en el análisis físico los cuatro tratamientos presentaron una textura franco arcillo arenoso, sin embargo se puede apreciar en la **Figura 3** que el tratamiento

cuatro presentó mayor cantidad de arena (65%), seguido del tratamiento dos con (60%), el sustrato tres (56%) y el que obtuvo menor cantidad de arena es el tratamiento uno (47%).

Al respecto Damiano (1980), citado por Cadno (1990), menciona que es importante que el sustrato sea poroso, con buen drenaje y buena aireación, en tal caso el tratamiento cuatro reúne mejores condiciones por contener mayor cantidad de arena en su mezcla, seguido por el tratamiento dos.



**Figura 3: Clase textural**

Por otro parte el tratamiento tres muestra ser más pesado por contener mayor cantidad arcilla (26%), menor cantidad de arena y de grava. Según Galloway y Borgo (1993) no se deben utilizar tierras pesadas, sin aireación, ni drenaje adecuado, porque estos reducen la formación de raíces sanas y favorecen el ataque de hongos.

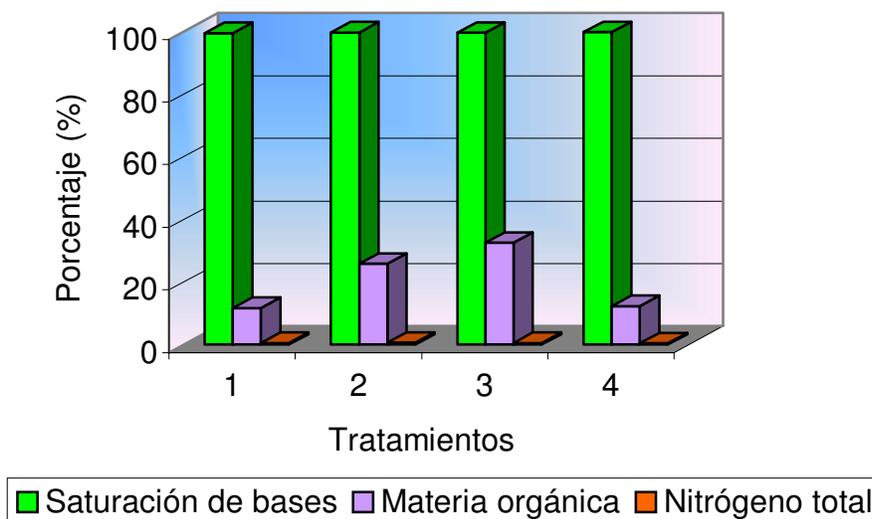
El limo está presente en mayor cantidad en el tratamiento uno (25%) debido a que en su mezcla tiene un 50% de tierra, seguido del sustrato tres (18%), el tratamiento dos con (16%) y el que tiene menor cantidad es el tratamiento cuatro (14%).

La grava se halló en mayor cantidad en el tratamiento uno (11,8%) debido a la tierra que tiene en mayor cantidad, seguido del tratamiento cuatro (5,1%), el tratamiento dos con (2,5%) y el que obtuvo menor cantidad es el tratamiento tres (0,7%).

#### 4.2.2 Materia orgánica, saturación de bases y nitrógeno total (%)

La productividad de los suelos está fuertemente relacionada con la materia orgánica, la que es controlada por muchos factores, que pueden resumirse en un simple balance de masas de entrada y salidas de carbono, según Reicosky *et al.* (1995).

La **Figura 4** muestra las cantidades en porcentaje de materia orgánica, saturación de bases además del nitrógeno total existentes en los cuatro tratamientos.



**Figura 4: Materia orgánica, saturación de bases y nitrógeno total**

En tal caso se puede observar que el tratamiento tres presentó mayor porcentaje de materia orgánica con (32,5%) seguido del tratamiento dos (25,8%), el sustrato del tratamiento cuatro (12,3%) y por último el tratamiento uno (11,7%) según Chilón (1997), estos datos se encuentran dentro del rango de alto contenido.

El alto contenido de materia orgánica se debería a la turba para el tratamiento tres, que según Arias (1986) la turba contiene de 35 a 70% de materia orgánica. Para los

tratamientos dos y cuatro se deberían al humus que según el CIDE (1999), los contenidos de la materia orgánica son superiores a 28% en el humus.

La cantidad de humus afecta también a las propiedades físicas del suelo tan importantes como su estructura, color, textura y capacidad de retención de la humedad (Haynes 1996).

El porcentaje de saturación de bases fue elevado y no existieron diferencias entre los cuatro sustratos, estos porcentajes estuvieron dentro del rango de alta fertilidad actual del suelo, según las normas de interpretación de los análisis físico-químicos y biológicos del suelo propuestos por Chilón (1997).

En cuanto al nitrógeno total su disponibilidad depende de dos parámetros ambientales que son determinantes para la mineralización del nitrógeno, estas son: la temperatura del suelo (Watts y Hancks 1988) y la oferta hídrica (Kolberg *et al.* 1999).

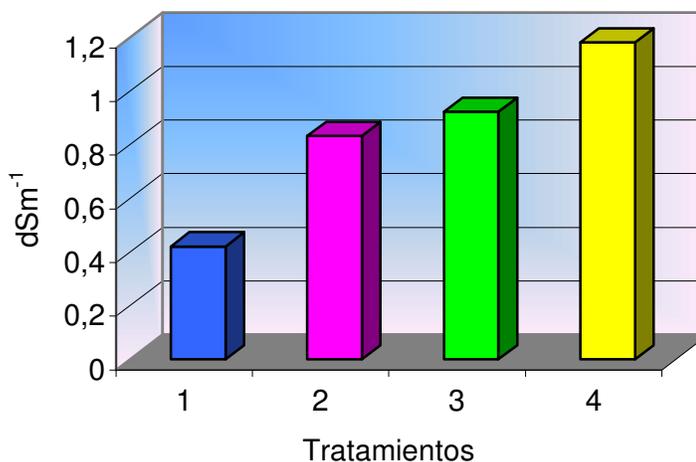
Los cuatro sustratos se encontraron dentro el rango de alto contenido de este elemento, debido a la incorporación de materia orgánica, que incrementó el contenido de nitrógeno en los sustratos, según Haynes (1996) el nitrógeno total en el humus es de 1.6%.

El CIDE (1999), indica que el nivel de nitrógeno en el humus es superior a 2% lo que justificaría su incremento. Además Rodríguez (1992), indica que la materia orgánica proporciona altos niveles de nutrientes, especialmente Nitrógeno, Fósforo y Potasio.

También Tisdale *et al.* (1991) indican que la materia orgánica es un abono nitrogenado. Por lo que se atribuye a la materia orgánica incorporada a los sustratos la mayor disponibilidad del nitrógeno para las plantas.

### 4.2.3 Conductividad eléctrica (CE)

Según Chilón (1997), no existen problemas de salinidad en suelos con valores que se encuentren por debajo de  $2 \text{ dS m}^{-1}$ , la conductividad eléctrica en el caso de los cuatro sustratos como se puede observar en la **Figura 5** alcanzaron valores por debajo de  $1.5 \text{ dS m}^{-1}$ , mostrando claramente que no existen problemas de salinidad en ninguno de los tratamientos.



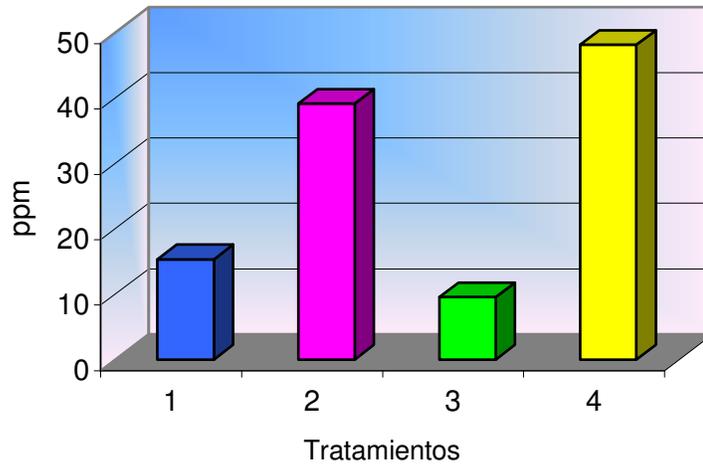
**Figura 5: Conductividad eléctrica**

### 4.2.4 Contenido de fósforo

El sustrato del tratamiento cuatro alcanzó un valor superior que el resto ( $48.2 \text{ ppm}$ ), seguido del tratamiento dos ( $39.2 \text{ ppm}$ ), el tratamiento uno ( $15.3 \text{ ppm}$ ), estos valores se atribuyen al humus y turba que contienen, según Chilón (1997) estos sustratos muestran estar dentro el rango de alto contenido de fósforo.

A su vez Rodríguez (1992), indica que la materia orgánica proporciona altos niveles de nutrientes, especialmente nitrógeno, fósforo y potasio. Haynes (1996) añade que el humus aporta nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, boro y los libera gradualmente interviniendo en la fertilidad física del suelo, aumentando la superficie activa. El mismo autor menciona que el humus contiene  $1.3\%$  de  $\text{P}_2\text{O}_5$ .

Hein y Panigatti (1991) indican que el humus contiene N, P, K y es rico en enzimas y microflora que aceleran el proceso de degradación de la materia regenerando los suelos agotados.



**Figura 6: Contenido de fósforo**

Como se puede apreciar en la **Figura 6** el tratamiento tres muestra tener menor concentración de fósforo (9.56 ppm), debido principalmente a la acidez que presenta el sustrato con relación a los demás tratamientos. Según Chilón (1997) este valor se halla dentro el rango de mediano contenido de fósforo, Haynes (1996) indica que el alto contenido orgánico y el exceso de líquido pueden crear condiciones anaeróbicas que puede agravarse por el bloqueo de los poros del suelo con la materia orgánica lo cual no permite la absorción de nutrientes.

De Alba (1987) añade que los suelos ácidos tienen por característica la presencia de una alta saturación de iones de hierro y aluminio, los cuales forman compuestos insolubles (sesquióxidos) con el fósforo reduciendo así la absorción de este elemento por las plantas.

#### **4.2.5 Potencial hidrógeno (pH)**

Los sustratos de los tratamientos dos y cuatro presentan un pH relativamente neutro con valores de 6.88 y 6.23 respectivamente, atribuible a la incorporación de humus, que ambos tratamientos contienen en sus mezclas, siendo mayor el pH del tratamiento dos

porque mayor es el contenido de humus en este sustrato. El aporte de neutralidad del humus se debe a que este elemento tiene un pH comprendido entre el rango de 6.7 a 7.3, de acuerdo con el CIDE (1999).

También Haynes (1996) menciona que el pH del humus es igual a 7, lo que le hace ser un producto confiable para ser usado con plantas delicadas.

Por el contrario los sustratos del tratamiento uno y tres muestran descenso en el pH con valores de 5,48 y 4.77 respectivamente, atribuible a la incorporación de turba, siendo menor el pH del tratamiento tres porque mayor es el contenido de turba en este sustrato, este producto de descomposición orgánica es bastante acidificante o de gran acidez y falta de minerales, según Sade (1980).

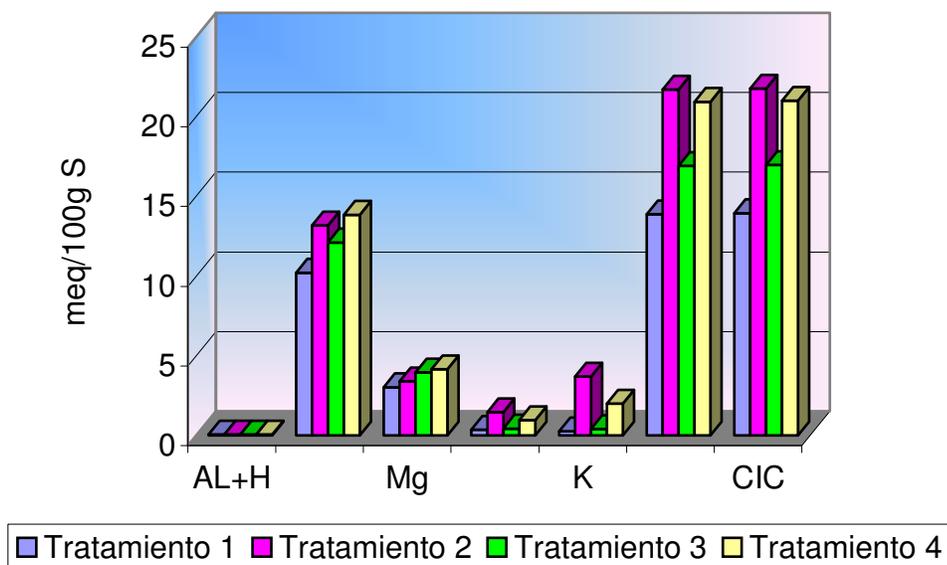
Además Chilón (1997) indica que uno de los orígenes de la acidez del suelo es la fracción orgánica, que durante la descomposición microbiana de la materia orgánica del suelo, produce una serie de ácidos orgánicos. Sin embargo el análisis químico de los sustratos no muestra problemas de acidez para ningún tratamiento.

Según Stevenson (1999) la turba posee una fuerte reacción ácida, que la transforma en un valioso acondicionador de suelos para cultivos de hongos, especialmente en la producción de champiñones aventajando a otros tipos de sustratos.

#### **4.2.6 Capacidad de intercambio catiónico (CIC)**

De acuerdo con Chilón (1997) la capacidad de intercambio catiónico (CIC) para los tratamientos uno, tres y cuatro se encontraron dentro el rango de mediana fertilidad con valores de 13,93; 16,95 y 20,97 cmol(+)/kg, respectivamente, lo cual indica que los cationes intercambiables del suelo están relativamente equilibrados. Sin embargo el sustrato del tratamiento dos presentó una CIC de 21,73 cmol(+)/kg, encontrándose dentro el rango de alta fertilidad, mostrando también un equilibrio de cationes intercambiables, lo que indica que en este tratamiento existió mayor absorción de nutrientes (**Figura 7**). Esto concuerda con Suárez (1997) quien menciona que al incorporar materia orgánica al suelo

la CIC aumenta, por que junto con la arcilla constituye parte fundamental del complejo de cambio, regulador de la nutrición de la planta.



**Figura 7: Capacidad de intercambio catiónico (CIC)**

El contenido de minerales en el sustrato del tratamiento dos es superior a los demás, excepto en el magnesio y calcio, exponiendo mayor absorción de nutrientes, atribuible al humus que tiene en mayor cantidad además del aserrín y arena que se encuentran en igual proporción, seguido muy de cerca por el tratamiento cuatro que tiene mayor absorción de magnesio y calcio, siendo este sustrato el mejor para la adaptabilidad de las vitroplantas, contiene en su mezcla mayor cantidad de arena fina y en igual proporción turba y humus.

Según Echeverría y Bergonzi (1995) el humus facilita la absorción de los minerales en el terreno, mejorando las características estructurales del suelo, desligando los arcillosos y agregando los arenosos.

Para el contenido de potasio (K), según la calificación que hace Chilón (1997) los valores de los sustratos cuatro y dos se encontraron dentro el rango de alto contenido, atribuible a la materia orgánica, esto es corroborado por Rodríguez (1992), quien indica que la materia

orgánica proporciona altos niveles de nutrientes, especialmente Nitrógeno, Fósforo y Potasio. También Haynes (1996) menciona que el contenido de potasio en el humus es de 1.38%, confirmando el mayor contenido de potasio en el tratamiento dos atribuible al humus.

En resumen de acuerdo al análisis físico – químico el tratamiento dos es mejor con relación a los otros tres debido a que tiene un pH neutro (6.68), cuenta con mejor CIC con un valor de 21,7 cmol(+)/kg, mayor porcentaje de nitrógeno total (0,57), mayor potasio (3,68 ppm) y (25,78 %) de materia orgánica. El segundo mejor es el tratamiento cuatro que tiene un pH de (6,23), CIC de (20,9 cmol(+)/kg), cuenta con un porcentaje de saturación de bases de (99,8), mayor cantidad de fósforo (48,17 ppm) y un (12,28%) de materia orgánica y mayor porcentaje de arena que le otorga a los sustratos mayor porosidad según Sade (1980).

El tratamiento tres contiene mayor porcentaje de materia orgánica (32,54) y un pH más ácido con relación a los demás sustratos (4,77), tiene menor cantidad de fósforo (9,56 ppm), menor cantidad de arena y grava, estas características no son favorables para la adaptación y crecimiento de las vitroplantas como menciona Sade (1980).

El tratamiento uno tiene un pH de (5,48), una CIC de (13,9 cmol(+)/kg); (11,7%) de materia orgánica, (0,57%) de nitrógeno total, (15,34ppm) de fósforo y (0,28 ppm) de potasio.

## 4.3 Evaluación de las variables de respuesta

### 4.3.1 Supervivencia de vitroplantas

Hermoso (1999) indica que las plantas *in vitro* difieren completamente de las que crecen en el campo, estos cambios provocan que las plantas micropropagadas no sobrevivan al trasplante y a las condiciones ambientales, es por ello que el porcentaje de supervivencia es muy importante proporcionando un dato aproximado sobre la calidad del sustrato.

A continuación el (**Cuadro 5**) muestra el porcentaje de supervivencia de las plantas en los diferentes sustratos.

**Cuadro 5: Supervivencia en los diferentes sustratos**

Sustratos	Total de plantas	Plantas repuestas	Plantas muertas	Plantas vivas	% de supervivencia
T1	36	11	16	20	55
T2	36	11	10	26	72
T3	36	17	22	14	39
T4	36	7	5	31	86
Total	144	46	53	91	

Fuente: Elaboración propia

### Análisis de varianza para supervivencia de vitroplantas

El análisis de varianza, (**Cuadro 6**) muestra que existe diferencias altamente significativas entre tratamientos, no así entre bloques.

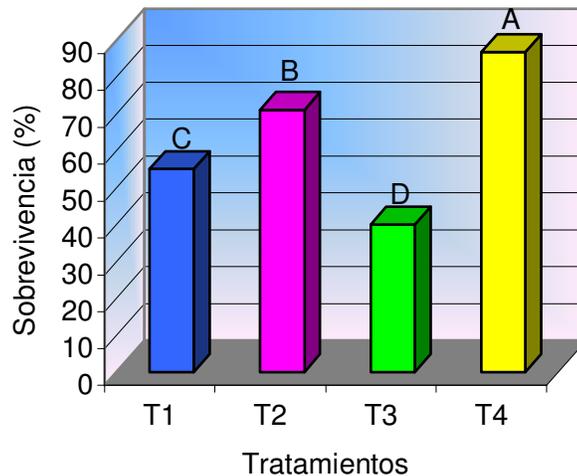
**Cuadro 6: Análisis de varianza para supervivencia de vitroplantas**

F.V.	G.L.	F.C.
Bloques	3	0.2286575 NS
Tratamientos	3	26.159692 **
Error exp.	9	

C.V.=12.48%

## Prueba estadística de Duncan

Mediante la prueba de Duncan expresada en la **Figura 8**, se observa que el tratamiento cuatro presentó mayor número de supervivencia de vitroplantas con respecto a los demás, por otra parte los tratamientos uno y tres presentaron menor cantidad de plantines vivos.



**Figura 8: Supervivencia de vitroplantas**

El mayor porcentaje de supervivencia de vitroplantas obtenida por el tratamiento cuatro con 86% se atribuye a la mayor cantidad de fósforo y arena que tiene como se puede observar en el análisis físico químico (**Cuadro 4**), seguidamente se encontró el tratamiento dos con 72% de supervivencia, luego el tratamiento uno con 55% y el tratamiento tres con 39% de supervivencia. Al respecto Hidalgo *et al.* (1997) mencionan que la arena es más usada en los sustratos porque favorece el enraizamiento. López (1993) añade que las plantas necesitan fósforo muy especialmente en la primera fase de su desarrollo, ya que activa el desarrollo de la raíz y favorece el crecimiento.

Los tratamientos cuatro y dos tuvieron en su mezcla humus que le permitió mayor porosidad, Haynes (1996) indica que el humus por no apelmazar el terreno, favorece el desarrollo radicular, la absorción radicular y la movilidad de las raíces, siendo otro factor que influye en la adaptabilidad.

Por otro lado en la **Figura 8** se puede observar que el tratamiento uno obtuvo un 55% de supervivencia y el tratamiento tres con 39% obtiene el menor porcentaje de supervivencia atribuible al alto contenido de materia orgánica (turba) que le otorga mayor acidez un pH de 4.77 para el T3 y 5.48 para el T1, además bajo porcentaje de P, K, con relación a los otros sustratos. Sin embargo en un estudio sobre aclimatación de café se logró un 90% de aclimatación en las vitroplantas sembradas en un sustrato que contenía un 100% de turba (Hermoso 1999), lo cual demuestra que la aclimatación es diferente para las distintas especies.

En otras investigaciones se han encontrado mayores y menores porcentajes de supervivencia con relación a las obtenidas en el presente ensayo, es así que Trindade y Pais (1997) lograron un 90 y 95% de supervivencia de vitroplantas de *E. globulus* en la fase de aclimatación. Por su parte Gill (1996), enraizó plántulas de *E. tereticornis*, obteniendo 82% de adaptación de las que provenían de un medio líquido, y un 38,5% de las que provenían de un medio sólido. De acuerdo con lo obtenido por los autores anteriormente citados, los porcentajes de supervivencia alcanzados en este trabajo para las tres especies de Eucaliptus son aceptables.

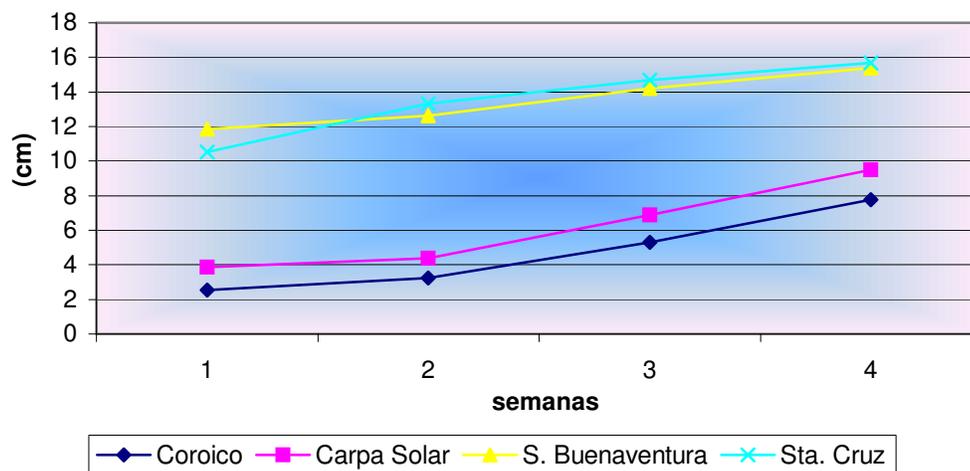
El CIP (1999) señala que los sustratos para vitroplantas deben ser bastante porosos para permitir una aireación adecuada evitando la proliferación de hongos. Añaden Hidalgo *et al.* (1997) que el sustrato debe ser lo suficientemente poroso, de modo que se escurra el exceso de agua y permita una buena aireación.

También Haynes (1996) indica que para mejorar y facilitar la aireación se debe incrementar el contenido de materia orgánica, sin embargo el tratamiento tres contenía mayor cantidad de materia orgánica (turba) y el análisis físico mostró que contenía mayor arcilla lo cual desfavoreció un buen drenaje del sustrato lo cual incidió en el bajo porcentaje de supervivencia de vitroplantas, al respecto Galloway y Borgo (1993) manifiestan que las mezclas de tierra pesada (arcillosa), sin aireación, ni drenaje adecuado, reducen la formación de raíces sanas y favorecen el ataque de hongos. Sumida (1997) indica que las características del sustrato que tiene una textura franco-arenoso son recomendadas para el normal desarrollo del cultivo de la stevia.

## 4.4 Fase de adaptación

### 4.4.1 Altura de la planta

A continuación la **Figura 9** muestra la tendencia que sigue la altura de las plantas en diferentes regiones de nuestro país, obtenidas de trabajos de tesis realizados con anterioridad y comparadas con datos obtenidos en el presente proyecto.



**Figura 9: Tendencia de altura de la planta**

Como se puede observar en la **Figura 9** la altura obtenida dentro la carpa solar en un primer mes es inferior a las alturas obtenidas en las regiones de Santa Cruz y San Buenaventura, debido principalmente al clima y al tipo de suelo; los mismos datos son mayores con relación a Coroico donde el clima es templado.

### Análisis de varianza para altura de planta

Los datos del **Cuadro 7**, expresan que para la variable altura de planta existieron diferencias altamente significativas entre los tratamientos, mostrando que los sustratos influyeron en este comportamiento; además existió diferencias significativas entre bloques.

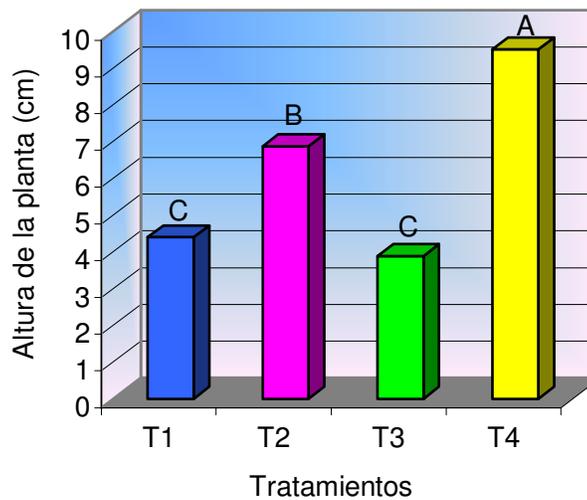
**Cuadro 7: Análisis de varianza para altura de planta**

F.V.	G.L.	F.C.
Bloques	3	10.824553 *
Tratamientos	3	71.991816 **
Error exp.	9	

C.V.= 9.88%

### Prueba estadística de Duncan

La prueba estadística de Duncan expresada en la **Figura 10**, utilizada para el cálculo de la variable altura de la planta, muestra que el tratamiento cuatro obtuvo la mayor altura (9.50cm) que el resto de los tratamientos, seguido del tratamiento dos con (6.87), tratamiento uno (4.39), siendo el tratamiento tres el que alcanzó la menor altura (3.88cm).



**Figura 10: Altura de la planta**

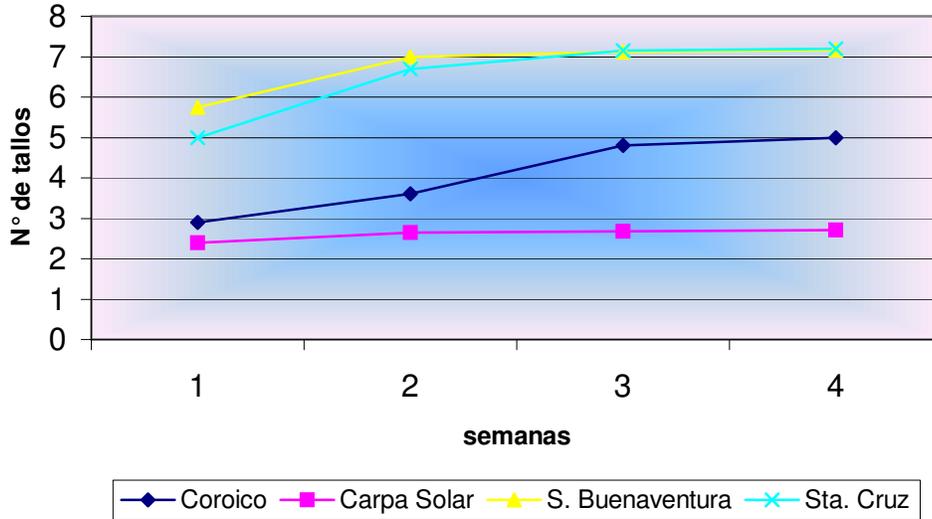
El mayor valor obtenido por el tratamiento cuatro se debería a que este tratamiento contenía arena fina, humus y turba, siendo que el humus aportó nutrientes y la arena le dio mayor porosidad y menor retención de humedad, Sumida (1997) indica que estas son características del sustrato que tiene una textura franco-arenoso recomendados para el normal desarrollo del cultivo de la stevia.

Por el contrario la menor altura se consiguió con el sustrato del tratamiento tres, que en su mezcla contenía mayor cantidad de materia orgánica (turba) lo que pudo impedir el normal desarrollo de las plantas, al respecto Sade (1980) menciona que la turba al contener buen porcentaje de materia orgánica retiene mayor cantidad de agua y por lo tanto menor aireación lo cual provoca mayor acidez del sustrato, características que se observan en el análisis físico químico del sustrato tres que tiene un pH igual a 4.77 que le dió mayor acidez.

Sin embargo los datos de altura de planta obtenidos en este estudio resultaron ser menores que otros datos de un reporte que realizó Sumida (1997) en la región de Caranavi a 725 msnm, donde se indica que a 30 días de un rebrote de cepas de stevia de 3 años, la altura de la planta alcanzada fue de 30.2 cm. De igual manera en la localidad de Sud Yungas a 1.140 msnm se registró una etapa muy próxima a la floración con una altura de planta de 31 cm. Esto demuestra que la altitud, las condiciones ambientales y el tiempo del establecimiento del cultivo afectan significativamente el crecimiento de las plantas. Sumida (1997).

#### **4.4.2 Número de tallos**

La **Figura 11** muestra el comportamiento morfológico que sigue el número de tallos, se puede observar que el incremento de tallos dentro la carpa solar no es significativo, debido a que estas plantas tiene procedencia *in vitro*; por el contrario para las diferentes regiones del país se observa que es mayor el incremento en número de tallos, probablemente debido a que su procedencia es de semillas.



**Figura 11: Tendencia de número de tallos**

### Análisis de varianza para número de tallos

Los datos del **Cuadro 8**, muestran que para la variable número de tallos no existen diferencias significativas entre tratamientos ni entre bloques.

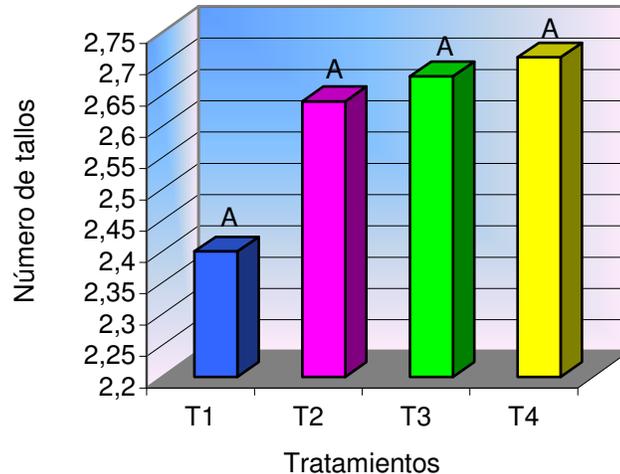
**Cuadro 8: Análisis de varianza para número de tallos**

F.V.	G.L.	F.C.
Bloques	3	1.7872589 NS
Tratamientos	3	1.8152819 NS
Error exp.	9	

C.V. = 8.10%

### Prueba estadística de Duncan

La prueba Duncan utilizada para el cálculo de la variable número de tallos, expresada en la **Figura 12**, muestra que los cuatro tratamientos tuvieron similar comportamiento por ello no existen diferencias significativas.



**Figura 12: Número de tallos**

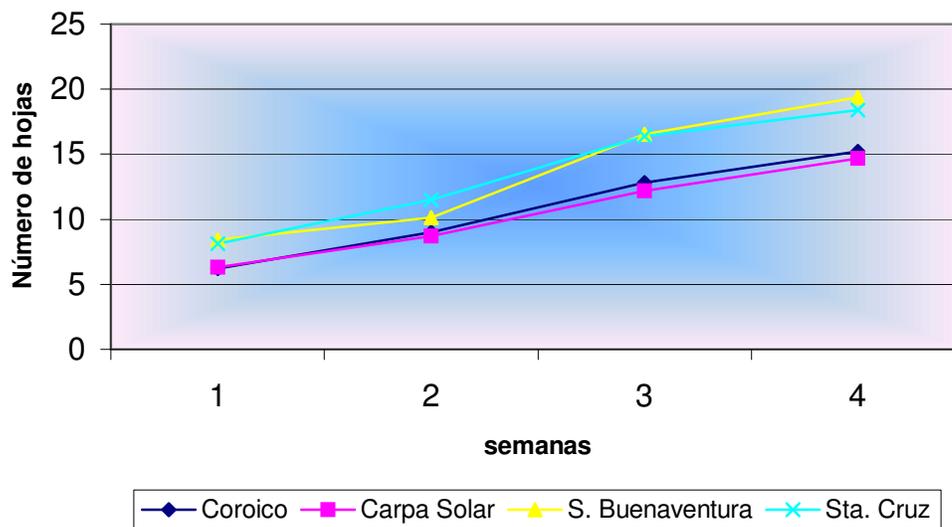
El hecho de que no existan diferencias en el número de tallos puede deberse a que solo se realizó un corte, al respecto Jordán (1994) menciona que el tallo en el cultivo de Stevia es principal durante su desarrollo inicial, tornándose multicaule después del primer ciclo vegetativo llegando a producir sobre veinte tallos en 3 a 4 años.

La **Figura 12** muestra diferencias en los tratamientos especialmente en el tratamiento cuatro y uno se ve un incremento en el número de tallos para el primero y todo lo contrario para el segundo, esto indica que probablemente la mezcla del sustrato cuatro influyó notablemente por el contenido de humus y arena que contiene, pero cabe recalcar que esta diferencia no es relevante para el análisis de varianza.

El reporte que se realizó en la región de Caranavi indica que al mes de un rebrote de cepas de stevia de 3 años se contabilizaron 15.2 tallos por planta. De igual manera en la región de Sud Yungas a 1.140 msnm se registró de 6 a 7 tallos por planta en un cultivo de 2 años de establecimiento (Sumida 1997). En ambos casos se puede apreciar que el número de tallos se incrementa a medida que aumenta el tiempo de establecimiento del cultivo, coincidiendo con Jordán (1994) quien indica que los tallos incrementan después del primer corte, y va en ascenso a medida que pasa el tiempo. Esto justificaría que en el presente proyecto no haya habido un incremento en el número de tallos.

#### 4.4.3 Número de hojas

La **Figura 13** muestra la tendencia que tiene el incremento de número de hojas en general. Se puede apreciar en la figura que la tendencia es la misma, siendo los datos de la carpa similares a los de Coroico y existe una pequeña diferencia con los datos de San Buenaventura y Santa Cruz.



**Figura 13: Tendencia de número de hojas**

#### Análisis de varianza para número de hojas

El **Cuadro 9**, muestra claramente que para la variable número de hojas, existen diferencias altamente significativas entre tratamientos y no significativas entre bloques. Esto significa que el número de hojas incrementó indistintamente en los diferentes tratamientos como se puede apreciar a continuación.

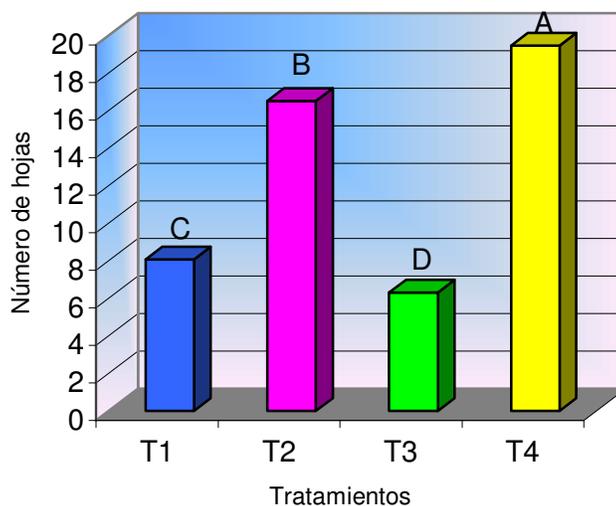
**Cuadro 9: Análisis de varianza para número de hojas**

F.V.	G.L.	F.C.
Bloques	3	0.71 NS
Tratamientos	3	314.66 **
Error exp.	9	

C.V. = 5.73%

### Prueba estadística de Duncan

Mediante la prueba de Duncan expresada en la **Figura 14**, se puede observar que el tratamiento cuatro presentó mayor número de hojas con respecto a los demás, por otra parte el tratamiento tres registró la menor cantidad de hojas.



**Figura 14: Número de hojas**

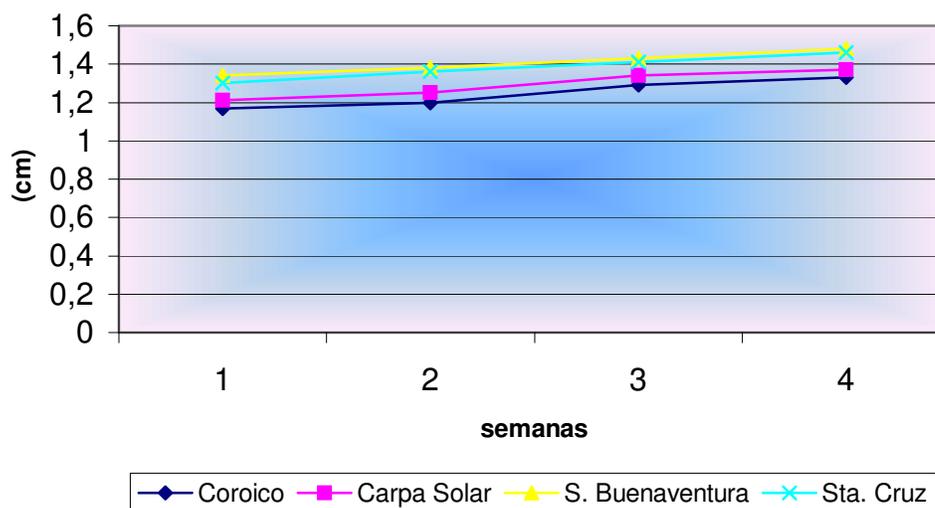
El T4 obtuvo el valor más alto 19.48, seguido del T2 con 16.52, atribuíble la mayor altura de las plantas y la mejor disponibilidad de nutrientes pues ambos sustratos contenían en sus mezclas mayor cantidad de arena que le pudo otorgar porosidad además de contener humus que le pudo dar mejor disponibilidad de nutrientes. Hidalgo *et al* (1997) indica que la arena otorga mayor porosidad y mejor capacidad de absorción de nutrientes.

También Fuentes (1987) menciona que el humus le otorga porosidad al suelo y tiene mayor velocidad de transformación en el suelo, lo que origina una rápida disponibilidad de elementos minerales y orgánicos para el cultivo, ejerciendo importantes efectos activadores sobre el metabolismo microbiano y vegetal, factor que probablemente favoreció en los tratamientos cuatro y dos que en sus mezclas contienen humus y este último en mayor cantidad.

Por otro lado el T1 con 8.07 y el T3 con 6.30 muestran que las mezclas para estos sustratos no tuvieron las características deseadas para un mejor desarrollo de las plantas, debido principalmente a que no existió buena porosidad, más bien resultaron ser ácidos y arcillosos, lo que desmejoró el crecimiento de las plantas haciendo menor número de hojas.

#### 4.4.4 Ancho de hojas

La **Figura 15** muestra que la tendencia de ancho de hojas es la misma para las diferentes regiones del país y la carpa solar estudio del presente proyecto, se puede ver que los rangos varían entre 1.2 y 1.5 en un mes de establecimiento del cultivo.



**Figura 15: Tendencia de ancho de hojas**

## Análisis de varianza para ancho de hojas

El **Cuadro 10** muestra claramente que para la variable ancho de hojas, no existen diferencias significativas entre tratamientos ni entre bloques.

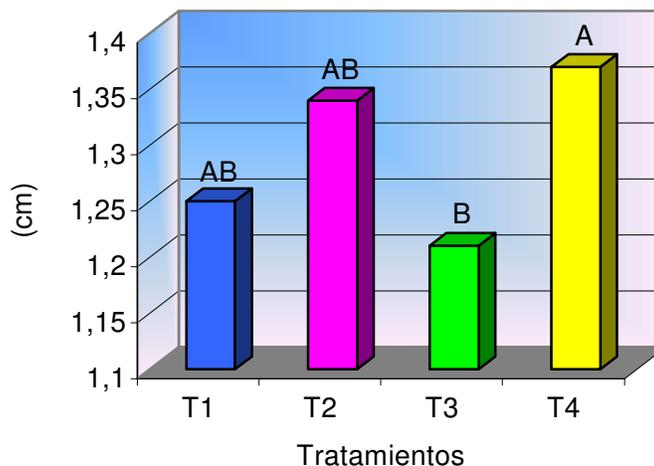
**Cuadro 10: Análisis de varianza para ancho de hojas**

F.V.	G.L.	F.C.
Bloques	3	2.3608203 NS
Tratamientos	3	3.417701 NS
Error exp.	9	

C.V. = 6.21%

## Prueba estadística de Duncan

En la prueba Duncan utilizada para el cálculo de la variable ancho de hojas se puede advertir que el T4 obtuvo el valor más alto con 1.37 cm, seguido del T2 con 1.34, el T1 con 1.25 cm y el T3 con 1.21 cm, mostrando que no existen diferencias notorias entre tratamientos. (**Figura 16**).



**Figura 16: Ancho de hojas**

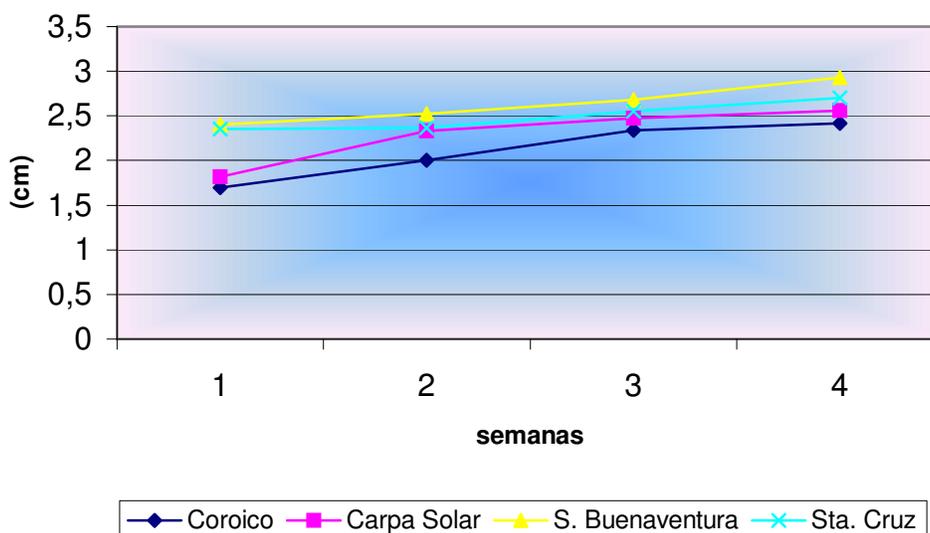
Las diferencias para esta variable se debería a que los sustratos influyeron en el crecimiento de las plantas y esto a su vez determinó el ancho de hojas, según López (1993) que indica que el ancho y largo de hojas no siempre está en función de la altura de

la planta, pero generalmente ese es el caso; así el T4 obtuvo mejor ancho de hojas con relación al T3 que es el sustrato con más bajos valores en el ensayo, pese a las diferencias que existen este no es relevante para el análisis de varianza.

La **Figura 16** muestra que en promedio del ancho de hojas tiene valores bajos, con relación a plantas de crecimiento normal, atribuible a que las vitroplantas al ser transferidas al invernadero pasan por un stress debido a las condiciones medioambientales ya no tan óptimas para la misma (Uría, 1994). Además sus estomas son poco funcionales debido a la alteración en la forma de las células oclusivas (Ziv, 1999). También muestran ineficiencia de los tejidos de sustento debido a la reducida presencia de colénquima y esclerénquima (Perece y Sutter, 1991).

#### 4.4.5 Largo de hojas

La **Figura 17** muestra el comportamiento que sigue el largo de hojas, se puede apreciar que el comportamiento para la zona de Coroico y el presente estudio siguen la misma tendencia, a un principio incrementan en tamaño y luego se mantienen. Para las otras dos zonas el incremento es constante, obteniendo mayor tamaño la región de San Buenaventura.



**Figura 17: Tendencia de largo de hojas**

## Análisis de varianza para largo de hojas

El análisis de varianza (ANVA) para el largo de hojas (**Cuadro 11**) muestra que no existe diferencias significativas entre bloques ni entre tratamientos.

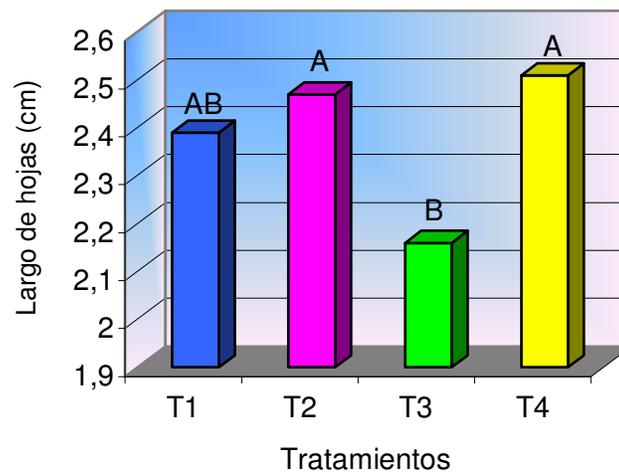
**Cuadro 11: Análisis de varianza para largo de hojas**

F.V.	G.L.	F.C.
Bloques	3	0.8693601 NS
Tratamientos	3	3.6933962 NS
Error exp.	9	

C.V. = 6.92%

## Prueba estadística de Duncan

La prueba estadística de Duncan para la variable largo de hojas, expresada en la **Figura 18** muestra que los tratamientos cuatro y dos son iguales entre sí, de igual manera los tratamientos uno y tres son semejantes entre sí.



**Figura 18: Largo de hojas**

La similaridad de los tratamientos dos y cuatro son atribuibles a que ambos tratamientos contienen en su mezcla humus que pudo facilitar el crecimiento de las plantas, Haynes

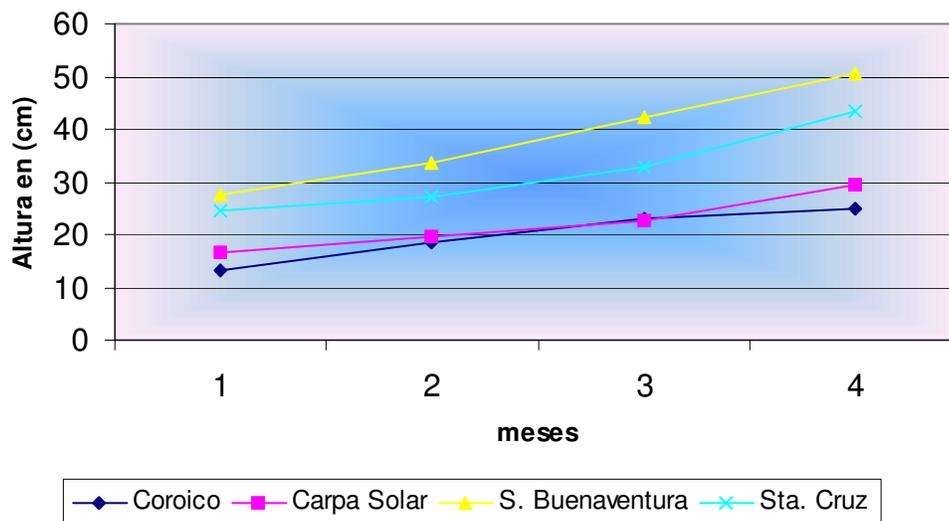
(1996) indica que el humus por no apelmazar el terreno, favorece el desarrollo foliar de las plantas.

Por otro lado el menor largo de hojas lo obtuvo el tratamiento tres atribuible al menor crecimiento de las plantas. Sade (1980) menciona que la turba retiene mayor cantidad de agua, tiene menor aireación, provoca mayor acidez del sustrato, perjudicando el normal crecimiento de las plantas.

## 4.5 Fase de crecimiento

### 4.5.1 Altura de la planta

A continuación la **Figura 19** muestra la altura de las plantas al cabo de 4 meses después de la siembra, estos valores son comparados con los datos obtenidos en la carpa solar en el presente estudio, para tener una referencia de la tendencia que sigue la altura de plantas en general. Se puede observar que los datos de Coroico y la carpa solar siguen la misma tendencia. Los mayores valores se alcanzan para las zonas de San Buenaventura y Santa Cruz, debido al clima y los suelos.



**Figura 19: Tendencia de altura de la planta**

### Análisis de varianza para altura de planta

El **Cuadro 12** muestra que para la variable altura de planta, existe diferencias altamente significativas entre tratamientos y significativas para bloques.

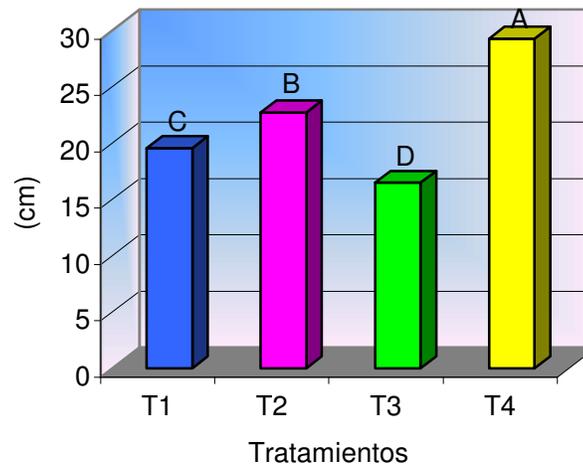
### Cuadro 12: Análisis de varianza para altura de planta

F.V.	G.L.	F.C.
Bloques	3	11.636004 *
Tratamientos	3	290.99904 **
Error exp.	9	

C.V. = 2.92%

### Prueba estadística de Duncan

La prueba estadística de Duncan para la variable altura de plantas expresada en la **Figura 20** muestra que el sustrato del tratamiento cuatro obtuvo el mayor crecimiento con un valor de 29.28 cm, seguido del tratamiento dos con 22.72 cm, el tratamiento uno con 19.54 cm y por último el tratamiento tres con 16.47



**Figura 20: Altura de planta**

La mayor altura obtenida por los tratamientos cuatro y dos, son atribuibles al mayor contenido de fósforo, nitrógeno y potasio, además de la conductividad eléctrica, la capacidad de intercambio catiónico y el porcentaje de saturación de bases, factores que según Kawatani (1980), mencionado por Pinaya (1996) son apropiados para el buen desarrollo de la Stevia.

También Sakaguchi (1982) menciona que el aumento de nitrógeno en el cultivo de stevia aumenta el crecimiento y desarrollo de las plantas, este es el caso el tratamiento dos que tiene 0.57% de nitrógeno total. Por otro el tratamiento tres no tuvo un buen crecimiento atribuible a la acidez del sustrato y su capacidad higroscópica según Sade (1980).

Según Gonzáles (1995) las mejores alturas de planta (1.20 cm) se obtienen en la brotación de primavera las demás brotaciones pueden alcanzar 0.50 cm de altura favorecido siempre por el fotoperíodo de días largos.

Sumida (1997) concuerda con Gonzáles diciendo que el fotoperíodo es determinante en el crecimiento, es así que en las distintas regiones de Bolivia se pueden encontrar alturas de planta que varían desde 30 hasta 80 cm.

En otras investigaciones se han encontrado alturas de planta superiores a los alcanzados en esta investigación; así en la Estación Experimental Agropecuaria "Minachi", Nor Yungas de La Paz, a 1.770 msnm, se obtuvo en cepas de 3 años y bajo condiciones de fertilización química una altura de 43.5 cm en promedio.

También en la región de Sud Yungas a 1.140 msnm, se registró 31 cm de altura de planta de Stevia próxima al período de floración (Sumida 1997). Estas diferencias de altura de planta se deben principalmente a las condiciones medioambientales, temperatura, altitud, fotoperíodo, características físico químicas del suelo entre otras.

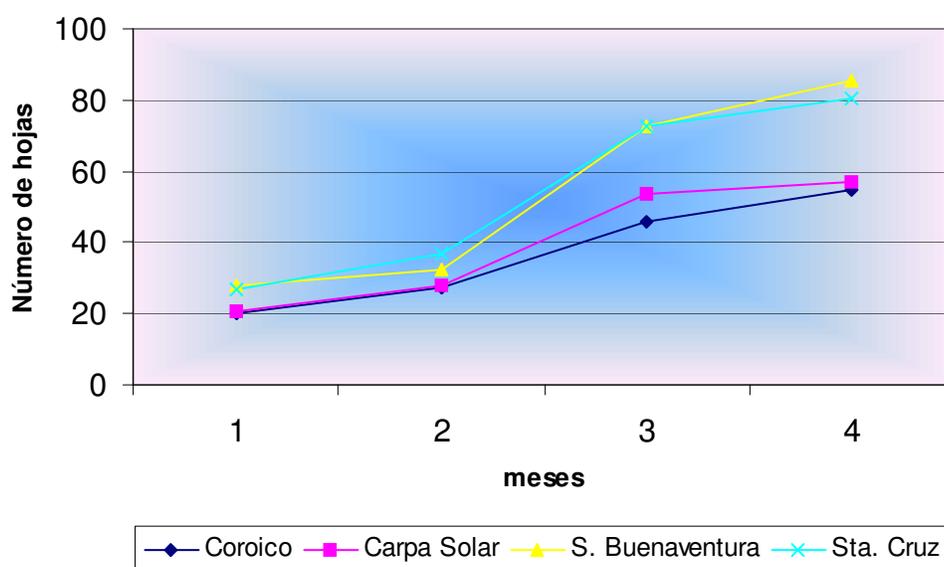
#### **4.5.2 Número de hojas**

El beneficio económico depende del número de hojas para el caso de la stevia a ello se debe su importancia. La producción de edulcorante en las hojas es superior cuando son favorecidas por un fotoperíodo largo Viana (1982) y Jordán (1994).

En la **Figura 21** se observa que existe mayor número de hojas de stevia en las regiones de San Buenaventura y Santa Cruz con relación a la región de Coroico y la carpa solar del

presente estudio, atribuible a que estas plantas provienen de semillas, y tienen mejor desarrollo.

Además dichas plantas se encuentran favorecidas por el factor (clima 25 °C de temperatura en promedio) y los suelos arenosos son ideales para el cultivo. Por otro lado los valores de la carpa solar son levemente superiores a los datos de Coroico, pese a que su procedencia es *in vitro* y por ende son más pequeñas que las normales. Esto se debería a que las vitroplantas han sido trasplantadas en sustratos abonados y poseen mayor cantidad de nutrientes disponibles.



**Figura 21: Tendencia de número de hojas**

### **Análisis de varianza para número de hojas**

El **Cuadro 13** muestra claramente que para la variable número de hojas, existen diferencias altamente significativas entre tratamientos y significativas entre bloques.

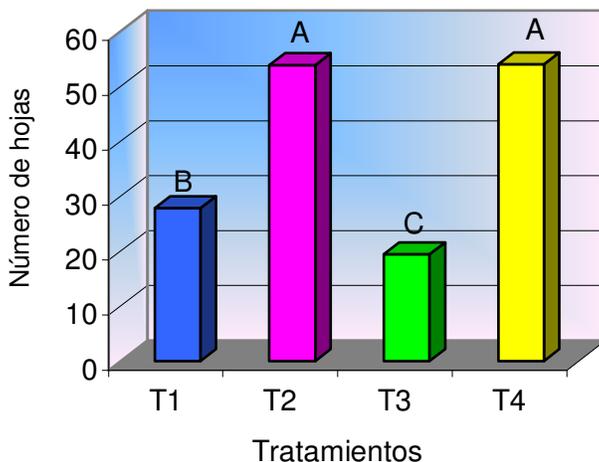
**Cuadro 13: Análisis de varianza para número de hojas**

F.V.	G.L.	F.C.
Bloques	3	12.165 *
Tratamientos	3	177.705 **
Error exp.	9	

C.V. = 6.52%

### Prueba estadística de Duncan

En la prueba estadística de Duncan para la variable número de hojas, como se puede apreciar en la **Figura 22**, los tratamientos cuatro y dos presentaron mayor cantidad de hojas con respecto a los demás, por otra parte el tratamiento tres registró la menor cantidad de hojas.



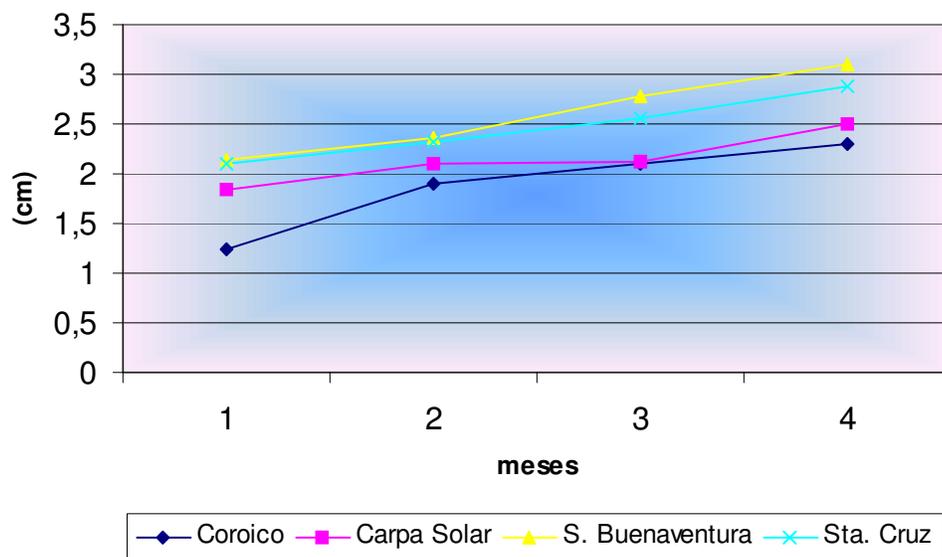
**Figura 22: Número de hojas**

La mayor producción de hojas es atribuible a la mayor cantidad de nitrógeno para el T2 y a la mejor textura (arenosa) para el T4, además de la mayor cantidad de calcio que ambos contienen como se puede apreciar en el anexo 2. El calcio aumenta la absorción de amonio, potasio y fósforo, estimula la fotosíntesis, promueve el uso eficiente del nitrógeno y aumenta el tamaño de las partes foliares de la planta según indica Fenn (1994.)

Los resultados obtenidos en el presente estudio no coinciden con el ensayo realizado por Fortuna Stevia del Paraguay (1989), donde mencionan que el número de hojas varía entre 125 y 178 hojas por planta para el primer corte incrementando hasta el doble para el segundo corte. Sin embargo García (1993) menciona que las vitroplantas adaptadas a condiciones naturales en un principio retardan mucho más su crecimiento y desarrollo con relación a las plantas normales dependiendo en gran cantidad de los sustratos que las contengan.

### 4.5.3 Ancho de hojas

La **Figura 23** muestra la tendencia de ancho de hojas en general, en diferentes regiones del país y comparadas con datos de la carpa solar. Se puede apreciar que los datos obtenidos en la carpa solar son superiores a los de la zona de Coroico y son inferiores a los datos de San Buenaventura y Santa Cruz, debido principalmente al clima y suelos arenosos de estas regiones.



**Figura 23:** Tendencia de ancho de hojas

## Análisis de varianza para ancho de hojas

El análisis de varianza (ANVA) para la variable ancho de hojas (**Cuadro 14**), muestra que existen diferencias altamente significativas en tratamientos y no muestra diferencias significativas entre bloques.

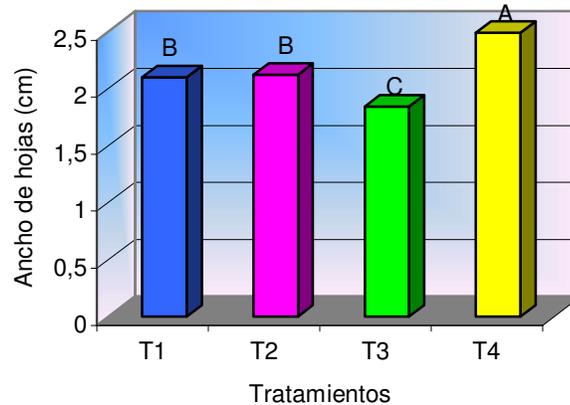
**Cuadro 14: Análisis de varianza para ancho de hojas**

F.V.	G.L.	F.C.
Bloques	3	0.2093606 NS
Tratamientos	3	21.567906 **
Error exp.	9	

C.V. = 5.40%

## Prueba estadística de Duncan

Mediante la prueba de Duncan se obtuvo la **Figura 24**, en ella se observa que el T4 alcanza el valor más alto, por otra parte el T3 registró el valor más bajo, los tratamientos T2 y T1 son semejantes entre sí.



**Figura 24: Ancho de hojas**

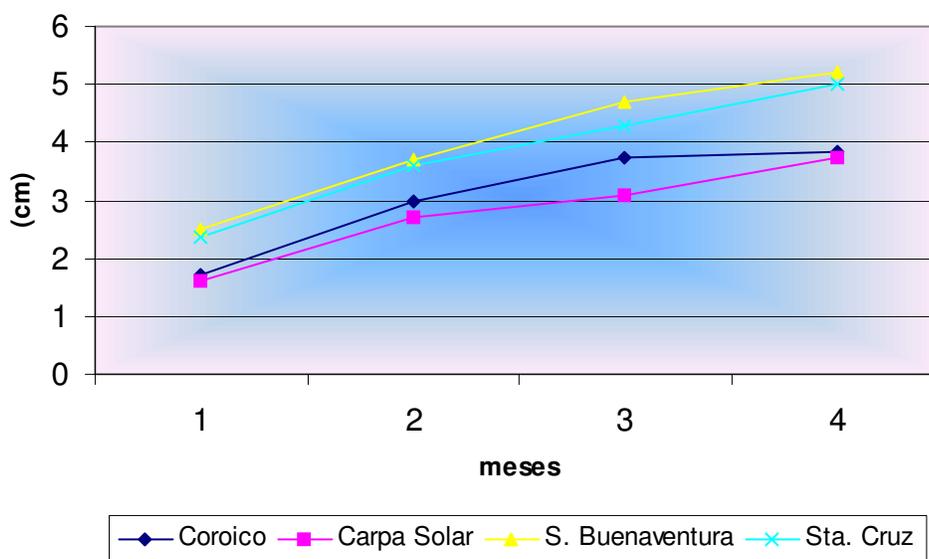
El tratamiento cuatro tiene una superioridad relevante con relación al tratamiento tres, atribuible a la porosidad suministrada por la arena, mejor disponibilidad de nutrientes y absorción de los mismos por parte del tratamiento cuatro, al contenido de humus para el

tratamiento dos y la materia orgánica para el tratamiento tres que pudo inhibir la absorción de nutrientes para este último Sade (1980), además se debe considerar que el tratamiento tres fue el más atacado por la mosca blanca, evitando el normal desarrollo de las plantas en este tratamiento.

Resultados similares a los obtenidos en el presente ensayo fueron obtenidos por Jordán (1994) quien señala que las hojas de stevia alcanzan un promedio de 1 a 3 cm de ancho para el primer corte.

#### 4.5.4 Largo de hojas

La **Figura 25** muestra la tendencia de largo de hojas en estudios realizados en diferentes zonas del país y comparados con los datos obtenidos en el presente estudio. La figura muestra el incremento en tamaño del largo de hojas, como se puede observar los datos de la carpa solar son menores que en las tres regiones, los valores oscilan entre 1.5 y 5.3 cm en promedio.



**Figura 25: Tendencia de largo de hojas**

## Análisis de varianza para largo de hojas

Al realizar el análisis de varianza se observa que para la variable largo de hojas (**Cuadro 15**), existen diferencias altamente significativas entre tratamientos y diferencias significativas entre bloques.

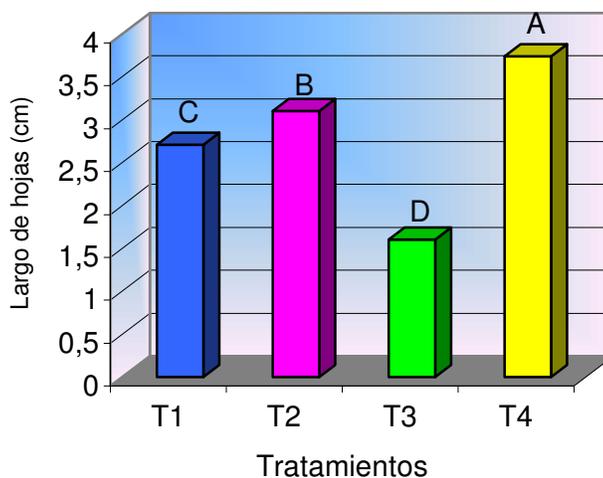
**Cuadro 15: Análisis de varianza para largo de hojas**

F.V.	G.L.	F.C.
Bloques	3	6.6865522 *
Tratamientos	3	76.324209 **
Error exp.	9	

C.V. = 7.38%

## Prueba estadística de Duncan

La comparación de medias para la variable largo de hojas muestra que el T4 obtuvo el mayor valor con 3.74 cm con relación a los otros tratamientos, siendo la mezcla del T3 la que alcanzó el valor más bajo con 1.60 cm. (**Figura 26**).



**Figura 26: Largo de hojas**

Las diferencias en los cuatro tratamientos son atribuibles a la porosidad suministrada por la arena para el tratamiento cuatro que posiblemente facilitó la absorción de nutrientes, y la materia orgánica para el tratamiento tres que debido a su acidez pudo actuar como un factor antagónico para la absorción de nutrientes.

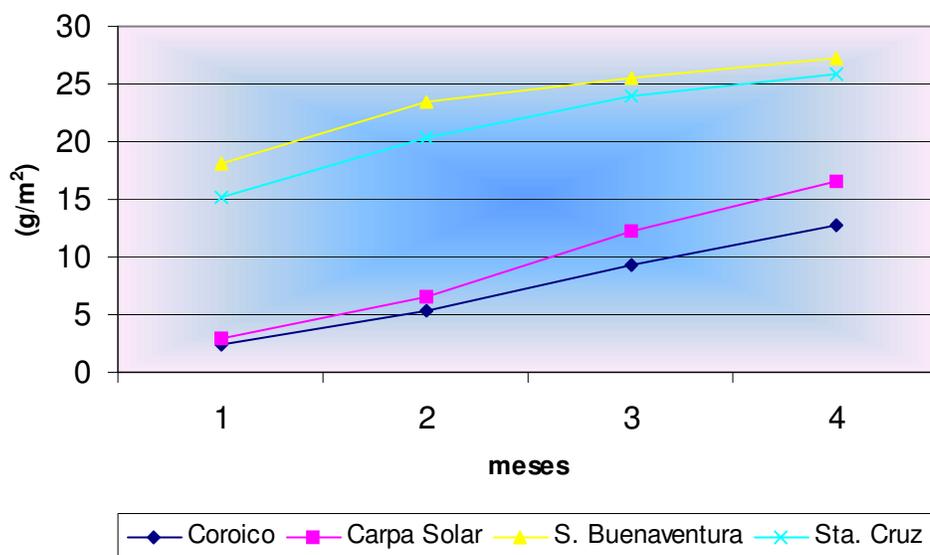
Los datos obtenidos en el presente ensayo coinciden con otra investigación donde se ha encontrado resultados que alcanzaron promedios de 2 a 8 cm de longitud mencionados por Jordán (1994), solamente el T3 estaría fuera de este rango con un valor de 1.60 cm atribuible al bajo desarrollo de las plantas debido posiblemente a la acidez del sustrato además del ataque de la mosca blanca que afectó bastante a este tratamiento.

#### **4.6 Rendimiento de materia verde**

El rendimiento de materia verde está en función de la biomasa obtenida por las plantas dentro de cada tratamiento, es una variable sumamente importante porque permite apreciar el beneficio económico que se obtendrá al finalizar el proyecto.

La **Figura 27** muestra la tendencia que sigue el rendimiento de materia verde, en cuatro diferentes regiones del país, en la figura se puede apreciar que las zonas de San Buenaventura y Santa Cruz obtienen mayores valores de rendimiento de materia verde en promedio de (15 a 28 gramos/m<sup>2</sup>) según Sumida (1997), a diferencia de la carpa solar y la región de Coroico que obtienen menos gramos de materia verde (3 a 16 gramos/m<sup>2</sup>) según Leigue (1995).

El mayor rendimiento de materia verde se atribuye al clima debido a que la stevia es sensible al fotoperíodo y desarrolla mejor bajo un promedio de temperatura de 25°C, además están los suelos que en esas regiones del país (San Buenaventura y Santa Cruz) son arenosos favoreciendo al mejor desarrollo del cultivo. Por otro lado su procedencia también es importante debido a que estas plantas provienen de semillas y tienen mejor desarrollo que las plantas *in vitro*.



**Figura 27: Tendencia del rendimiento de materia verde**

### Análisis de varianza para rendimiento de materia verde

El análisis de varianza para la variable rendimiento de materia verde (**Cuadro 16**), mostró diferencias altamente significativas entre tratamientos, no así entre bloques.

**Cuadro 16: Análisis de varianza para rendimiento de materia verde**

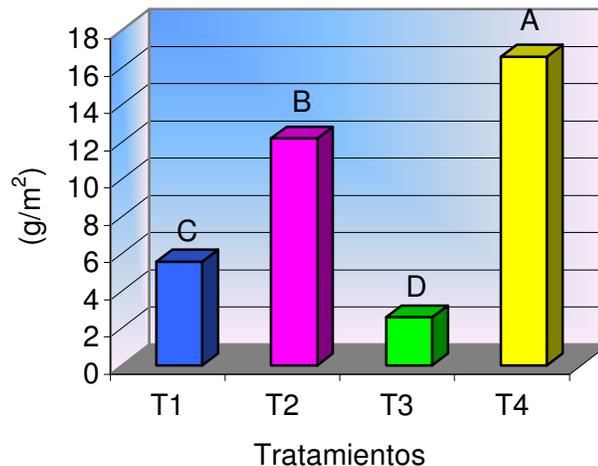
F.V.	G.L.	F.C.
Bloques	3	0.5386577 NS
Tratamientos	3	961.51154 **
Error exp.	9	

C.V. = 4.44%

### Prueba estadística de Duncan

La comparación de medias para la variable rendimiento de materia verde, expresada en la **Figura 28**, muestra que entre los cuatro tratamientos existen diferencias, habiendo alcanzado el tratamiento cuatro el valor más alto 16.58 gramos/m<sup>2</sup>, por otro lado el valor más bajo fue registrado para el tratamiento tres con 2.57 gramos/m<sup>2</sup>.

Las diferencias en el rendimiento de materia verde son atribuibles a la biomasa que se obtuvo para cada tratamiento, es así que las plantas de los tratamientos cuatro y dos obtuvieron mejor disponibilidad de nitrógeno, calcio, fósforo y potasio como lo expresa el análisis físico-químico (**Cuadro 4**) además el T4 fue mejor que el T2 debido posiblemente a la mayor cantidad de arena existente en su mezcla; se atribuye que el T2 fue mejor que el T1 debido a la mayor CIC (capacidad de intercambio catiónico) lo cual indicaría mejor absorción de los nutrientes. Encinas (1997) menciona, que la disponibilidad de calcio y nitrógeno aumenta el crecimiento de la planta, el número de nudos, diámetro de tallo, número de ramas y número de hojas. Finalmente el T3 obtuvo los menores valores con relación a los otros sustratos, posiblemente debido al bajo pH (4.7) atribuible a la turba que pudo otorgarle mayor acidez.



**Figura 28: Rendimiento de materia verde**

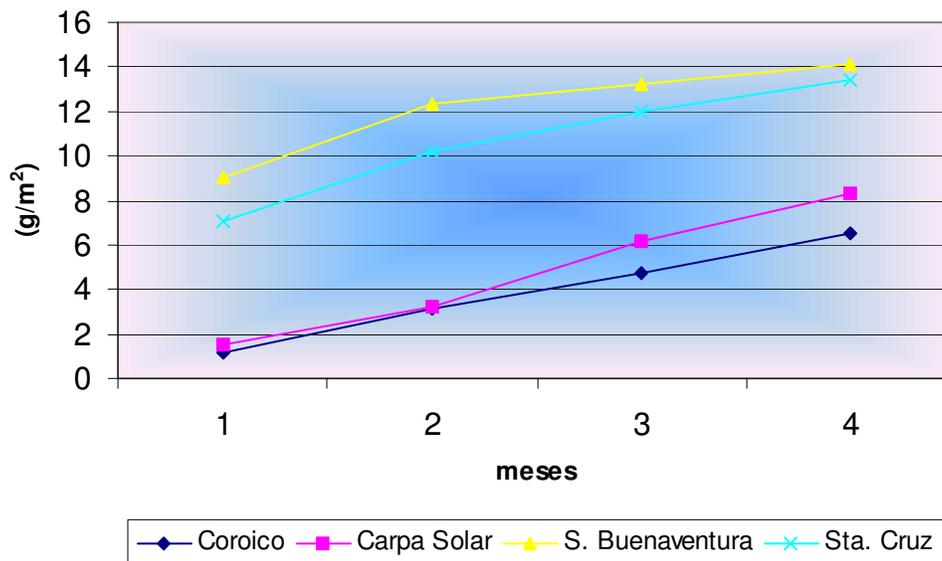
También Fenn (1994) indica que el calcio aumenta la absorción de amonio, potasio y fósforo, estimula la fotosíntesis, promueve el uso eficiente del nitrógeno y aumenta el tamaño de las partes foliares de la planta.

Los bajos rendimientos obtenidos en el presente ensayo podrían atribuirse a su procedencia *in vitro*, debido a que estas plantas retardan su crecimiento con relación a plantas *in vivo*; otro factor sería la falta de incremento de tallos, debido a que el tallo de la

stevia es principal durante su primer ciclo vegetativo y finalmente otro factor sería que el área de experimentación es reducida, siendo un metro cuadrado por tratamiento.

#### 4.7 Rendimiento de materia seca

La **Figura 29** muestra la tendencia del rendimiento de materia seca en cuatro diferentes regiones del país, se puede apreciar que las regiones de San Buenaventura y Santa Cruz tienen mejores datos de rendimiento con valores que oscilan entre (7 y 14 g/m<sup>2</sup>) por otro lado están los datos de la carpa solar y Coroico estos obtienen valores más bajos que oscilan entre (1.8 a 8.2 g/m<sup>2</sup>) de materia seca. Se debe considerar que en la carpa solar se trasplantaron vitropiantas y tanto el crecimiento como el rendimiento siempre fue menor que las plantas que provienen de semillas es el caso de las otras tres regiones.



**Figura 29: Tendencia del rendimiento de materia seca**

#### Análisis de varianza para rendimiento de materia seca

El **Cuadro 17**, muestra el análisis de varianza para el rendimiento de materia seca, el mismo expresa que no existen diferencias significativas entre bloques, pero sí diferencias altamente significativas entre tratamientos.

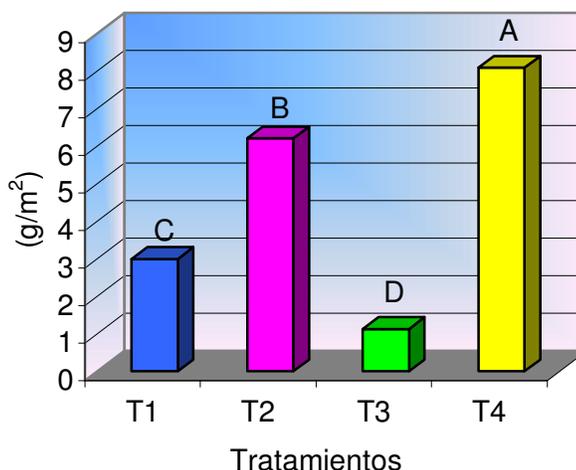
**Cuadro 17: Análisis de varianza para rendimiento de materia seca**

F.V.	G.L.	F.C.
Bloques	3	1.2838935 NS
Tratamientos	3	1316.8036 **
Error exp.	9	

C.V. = 3.64%

### Prueba estadística de Duncan

La prueba estadística de Duncan para la variable rendimiento de materia seca, la misma que es expresada en la **Figura 30** muestra que el tratamiento cuatro obtuvo un valor de 8.10 g/m<sup>2</sup>, seguido del T2 con 6.22 g/m<sup>2</sup>, el T1 con 3.00 y el T3 con 1.13 g/m<sup>2</sup>.



**Figura 30: Rendimiento de materia seca**

Las diferencias entre tratamientos en cuanto al rendimiento de materia seca, se podría deber a la mayor cantidad de nutrientes especialmente de fósforo para el T4 y potasio para el T2 esto se puede apreciar en el análisis físico químico (**Cuadro 4**). Encinas (1997) menciona que el primer elemento nutricional que exigen las plantas de Stevia es el potasio (K) en primer lugar, porque cumple una función muy importante, favoreciendo el rendimiento de hoja seca.

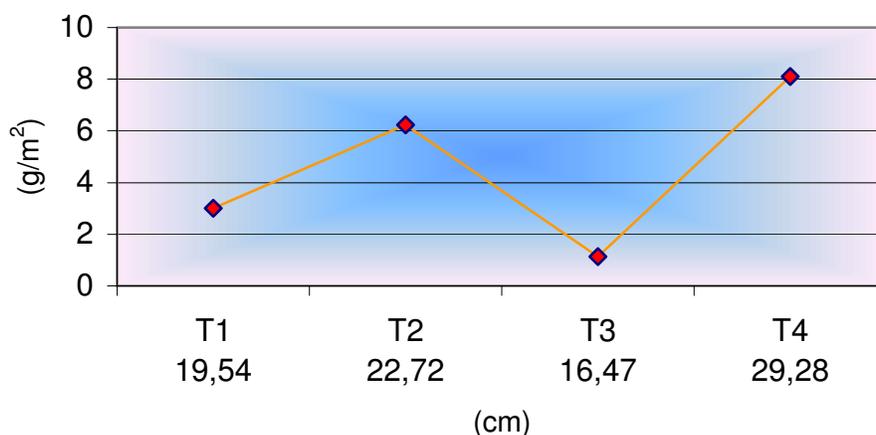
El tratamiento cuatro mostró el mejor rendimiento en materia verde y materia seca, fue el mejor sustrato tanto en la fase de adaptación como en la de crecimiento, atribuible a las condiciones físicas como químicas de este sustrato, sin embargo estudios realizados según Utsunomiya (1984) indican que en el Japón se hallaron rendimientos de materia seca que varían entre 720 k/ha en el primer corte, los rendimientos alcanzados en el presente ensayo mostraron valores bajos (80 k/ha), probablemente debido a la procedencia *in vitro*, al menor crecimiento de las plantas y escasa ramificación de tallos.

#### 4.7.1 Correlación lineal entre altura de la planta y peso de materia seca

Donde:

X = altura de la planta en (cm)

Y = peso de materia seca en (g/m<sup>2</sup>)



**Figura 31: Correlación lineal entre altura y materia seca**

$$r = \frac{\sum(X - \bar{x})(Y - \bar{y}) / (n - 1)}{\sqrt{\sum(X - \bar{x})^2 / (n - 1) \cdot \sum(Y - \bar{y})^2 / (n - 1)}}$$

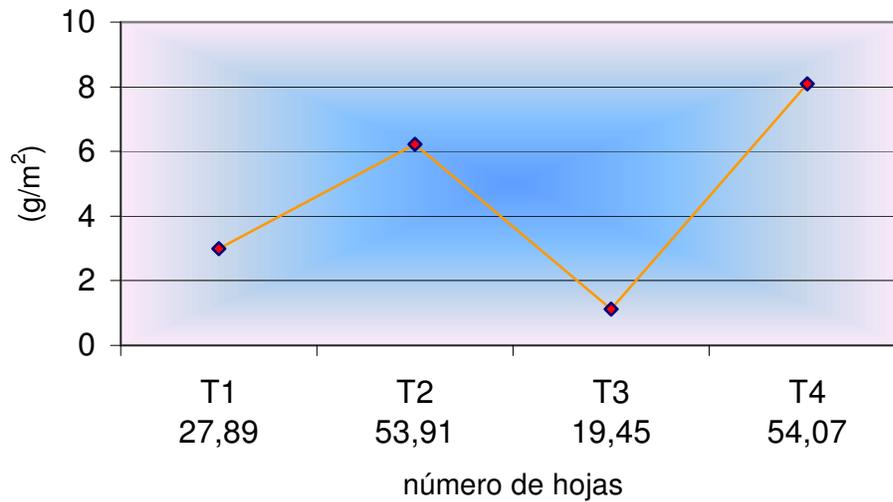
$$r = \frac{(88.01 - 22)(18.45 - 4.61) / (4 - 1)}{\sqrt{(66.01)^2 / 3 \cdot (13.84)^2 / 3}} \quad r = 0.99$$

#### 4.7.2 Correlación lineal entre número de hojas y peso de materia seca

Donde:

X = número de hojas

Y = peso de materia seca en (g/m<sup>2</sup>)



**Figura 32: Correlación lineal entre número de hojas y materia seca**

$$r = \frac{\sum(X - \bar{x})(Y - \bar{y}) / (n - 1)}{\sqrt{\sum(X - \bar{x})^2 / (n - 1) \cdot \sum(Y - \bar{y})^2 / (n - 1)}}$$

$$r = \frac{(155.32 - 38.83)(18.45 - 4.61) / (4 - 1)}{\sqrt{(116.49)^2 / 3 \cdot (13.84)^2 / 3}} \quad r = 0.99$$

Las correlaciones entre altura de las plantas y peso de materia seca **Figura 31**, y entre número de hojas y peso de materia seca **Figura 32**, mostraron que las características estudiadas tienden a variar en el mismo sentido, esto es, si se incrementa el valor de una se incrementa el valor de la otra, y si disminuye el valor de una, disminuye el valor de la otra.

El valor de ambas correlaciones se acercó a 1 y significa que la relación entre la altura de las plantas y el peso de materia seca es más estrecha, esto demostró que los valores de peso de materia seca se atribuyen directamente a las alturas de plantas alcanzadas en el ensayo. Para la segunda correlación significa que el peso de materia seca es inversamente proporcional al número de hojas, esto es, si existe mayor número de hojas, mayor será el peso de materia seca.

#### **4.8 Etapa de floración.**

Para esta etapa se contabilizaron los días desde el trasplante de las vitroplantas hasta tener un 50% de inflorescencias abiertas dentro del ensayo, esto ocurrió aproximadamente entre los 142 a 152 días.

Esta especie es de floración en fotoperíodos cortos, pero esta sensibilidad se acentúa en determinados estados de crecimiento. En los Yungas a veces la floración se produce a los 30 días (fotoperíodo corto de aproximadamente 12-13 horas/luz/día en los meses de enero y febrero), lo que limita la producción de biomasa y estimula la de semilla. (Leigue, 1995).

#### **4.9 Incidencia de plagas**

La mosca blanca *Bemisia tabaci* se ha convertido en una de las plagas de cultivos de invernadero más importantes, especialmente por producir grandes pérdidas, por la succión de savia. En este proceso se inyectan toxinas a través de la saliva lo que ocasiona el debilitamiento de la planta y a veces manchas cloróticas. (Carricondo, 1996).

El **Cuadro 18** está basado en la Incidencia y Grado de Severidad que menciona Ruiz (1998), muestra el nivel de daño, severidad, daño en por ciento y calificación con respecto al ataque de plagas para cada tratamiento. En el presente proyecto de investigación a los dos meses después del trasplante en la fase de crecimiento, se produjo el ataque de mosca blanca *Bemisia tabaci* y también existió la presencia de manchas ocasionadas por el ataque de esta plaga.

### Cuadro 18: Incidencia de plagas

Tratamientos	T1	T2	T3	T4
Mosca blanca <i>Bemisia tabaci</i>	38.75%	30.63%	47.21%	26.34%
Severidad	II	II	II	II
Calificación	Moderado	Moderado	Moderado	Moderado
Porcentaje de daño (%)	26 - 50	26 - 50	26 - 50	26 - 50

Fuente: Ruiz 1998

Como se puede observar en el **(Cuadro 18)** el tratamiento cuatro que contiene humus, turba y arena obtiene un valor de (26.34%) de ataque de la mosca blanca, es decir fue la menos atacada con respecto a las demás, atribuible principalmente a sus características físico químicas, como ser su pH que es 6.23, el nitrógeno total 0.42 que si bien es menor con relación a los otros tratamientos, ha sido mejor asimilado debido a que su capacidad de intercambio catiónico es mayor (20.96). Por otra parte el CIP (1999), menciona que los sustratos porosos permiten una mejor aireación evitando el ataque de plagas y enfermedades.

Por el contrario el tratamiento tres fue el más afectado con un valor de (47.21%) de ataque de plagas, probablemente debido a que estas plantas fueron más pequeñas y débiles resultado de un sustrato con bastante materia orgánica, que le otorgó unas características poco favorables para el normal desarrollo de las plantas como ser su pH que es muy ácido (4.77), si bien cuenta con buen suministro de nitrógeno (0.47), este no es aprovechado por su baja capacidad de intercambio catiónico (16.9).

#### 4.10 Comparación económica de los sustratos

El análisis económico se realiza a partir del método de presupuestos parciales y del análisis de costos y beneficios.

### a) Determinación del costo de producción

El costo de producción se lo detalla en los siguientes cuadros:

**Cuadro 19: Costos fijos**

	<b>Costo Unitario</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo Total</b>
<b>COSTO FIJO</b>	\$us	Unidad	\$us
Gastos en herramientas	20	1	20
Gastos en materiales	35	1	35
Mano de obra	5	3	15
Vitroplantas	1	144	144
<b>Total Costo Fijo</b>			<b>214</b>

**Cuadro 20: Costos variables**

	<b>Costo Unitario</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo Total</b>
<b>COSTO VARIABLE</b>	\$us	Unid.	\$us
Fungicida	5	1	5
Desinfectante	8	1	8
Insecticida	3	1	3
Sustratos:			
Arena	20	1	20
Turba	10	1	10
Humus	20	1	20
Aserrín	5	1	5
Análisis:			
Sustrato 1	20	1	20
Sustrato 2	20	1	20
Sustrato 3	20	1	20
Sustrato 4	20	1	20
<b>Total Costo Variable</b>			<b>148</b>

**Cuadro 21: Costo total por tratamiento**

Tratamiento	Proporción	Descripción	Costo Total \$us
T1	1 : 3	Arena fina – tierra del lugar	
Precio/sustrato		4 – 0	4.0
T2	1 : 1 : 2	Arena fina – aserrín – humus	
Precio/sustrato		4 – 1.5 – 2(5)	15.5
T3	1 : 2 : 1	Arena fina – turba – aserrín	
Precio/sustrato		4 – 2(2.5) – 1.5	10.5
T4	1 : 1 : 2	Turba – humus – arena fina	
Precio/sustrato		2.5 – 5 – 2(4)	15.5

El **Cuadro 21** muestra el costo por sustrato de cada tratamiento, se puede apreciar que el tratamiento 2 (1 arena: 1 aserrín: 2 humus) y tratamiento 4 (1 turba: 1 humus: 2 arena) tienen el mismo costo \$us 15.5; seguidos del tratamiento 3 (1 arena: 2 turba: 1 aserrín) este tratamiento tiene un costo de \$us 10.5; finalmente el tratamiento 1 (1 arena: 3 tierra del lugar) es el testigo, llega a ser el más barato con un costo de \$us. 4.

**Cuadro 22: Costo total**

Tratamiento	Costo Variable \$us	Costo Fijo \$us	Costo Total \$us
T1	30.25	53.5	83.75
T2	39.25	53.5	92.75
T3	34.25	53.5	87.75
T4	39.25	53.5	92.75

En el **Cuadro 22** se puede observar que los tratamientos dos y cuatro tienen mayor costo de producción y son semejantes entre sí con \$us. 92.75; le sigue el tratamiento tres con \$us. 87.75 y finalmente el tratamiento de menor costo es el T1 con \$us. 83.75; esto es debido a las combinaciones de cada uno de los sustratos, los tratamientos dos y cuatro contienen mayor cantidad de humus y arena lo que incrementó su costo.

### b) Plantas adaptadas por tratamiento

A continuación se describe el número total de plantas trasplantadas y el número total de plantas adaptadas por tratamiento.

**Cuadro 23: Número de plantas adaptadas por tratamiento**

Tratamiento	N° Plantas trasplantadas	N° Plantas adaptadas
T1	36	20
T2	36	26
T3	36	14
T4	36	31

El **Cuadro 23** muestra claramente que el tratamiento cuatro tiene mayor número de plantas adaptadas (31), seguido del tratamiento dos (26), el tratamiento uno (20) y finalmente el tratamiento tres es el que obtiene menor número de plantas adaptadas (14).

### c) Beneficios por tratamiento

Se debe contemplar el precio de \$us. 6,30 por plantín de stevia en el mercado. Con los datos anteriores se obtiene el siguiente cuadro de ingresos esperados por tratamiento Darnbusch (1997).

Como se puede apreciar en el **Cuadro 24** el mayor ingreso esperado corresponde al tratamiento cuatro (\$us 195.3) seguido del tratamiento dos (\$us 163.2), luego el tratamiento uno (\$us 126) y en último lugar se encuentra el tratamiento tres con (\$us 88.2); esto se debe fundamentalmente al rendimiento obtenido en cada uno de los diferentes tratamientos.

**Cuadro 24: Ingresos esperados por tratamiento**

Tratamiento	Precio \$us	Ingreso \$us
T1	6,3	126,0
T2	6,3	163,8
T3	6,3	88,2
T4	6,3	195,3

**Cuadro 25: Relación beneficio – costo**

Tratamiento	Ingreso \$us	Costo Total \$us	Beneficio Neto \$us	Relación Beneficio Costo
T1	126,00	83.75	42.25	1.50
T2	163,80	92.75	71.05	1.80
T3	88,20	87.75	0.45	1.00
T4	195,30	92.75	102.55	2.10

De acuerdo al **Cuadro 25**, el tratamiento T4 es el que proporciona mayor beneficio, debido a que este tratamiento tiene mayor número de plantas adaptadas por lo tanto ingresos más elevados; a continuación está el tratamiento T2 aunque el beneficio esperado en este tratamiento es menor que el tratamiento T4, posteriormente se encuentra el tratamiento T1, asimismo se observa que el tratamiento T3 no obtiene beneficios \$us. 0.45 y su relación Beneficio/Costo es 1.00, lo que indica que para este tratamiento no hay ganancia

ni pérdida. Sin embargo, se puede notar que los tratamientos T 1, T2 y T4 consiguen generar una ganancia notoria.

#### d) Análisis de dominancia

**Cuadro 26: Análisis de dominancia de los tratamientos**

Tratamiento	Beneficio Neto	Increment. Beneficio	Tratamiento	Costo Total	Increment. Costo	Dominancia
T4	102.55		T4	92.75		NO
T2	71.05	31.5	T2	92.75		NO
T1	42.25	28.8	T3	87.75	5	SI
T3	0.45	41.8	T1	83.75	4	SI

Como se advierte en el **Cuadro 26** se tienen dos tratamientos dominados, que son T1 y T3 (éstos tratamiento muestran pérdidas en su beneficio neto, por lo que se recomienda excluirlo del análisis), esto los convierte en los tratamientos menos beneficiosos. Siendo los tratamientos T4 y T2 los más beneficioso, ya que su incremento en el beneficio es mayor que el incremento de sus costos.

Este análisis también muestra que no es necesario realizar el cálculo de la Tasa de Retorno Marginal, por que se comprueba que los tratamientos T4 y T2 son los que brindan mayores ganancias, lo que económicamente se conoce como el *óptimo de la producción*.

## 5. CONCLUSIONES

Como resultado de la investigación en el presente ensayo, se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Se ha demostrado que existen diferencias: tanto morfológicas, económicas y de resistencia a plagas, en la adaptación de vitroplantas de stevia en los cuatro sustratos abonados bajo condiciones ambientales protegidas.
2. Se logra la aclimatación de las vitroplantas de stevia bajo condiciones ambientales protegidas, alcanzando porcentajes de supervivencia aceptables para los tratamientos 4 y 2, con valores de 86 y 72% respectivamente, siendo recomendado principalmente el tratamiento 4; no así para los tratamientos 1 y 3 que obtuvieron valores de 55 y 39% respectivamente, debiendo descartarse estos últimos sustratos para la aclimatación de vitroplantas de stevia.
3. Se ha demostrado que existen diferencias en el comportamiento morfológico en las plantas de stevia frente a los tratamientos utilizados en la investigación, siendo el tratamiento 4 (1 turba: 1 humus: 2 arena) el mejor en el comportamiento morfológico de las plantas de stevia, obteniéndose los valores más altos en las fases de adaptación (9.5 cm de altura; 2.71 número de tallos; 19.48 número de hojas; 1.37 ancho de hojas; 2.51 largo de hojas) y crecimiento (29.28 cm altura de la planta; 54.07 número de hojas; 2.49 ancho de hojas; 3.74 largo de hojas; 16.58 g/m<sup>2</sup> rendimiento de materia verde; 8.1 g/m<sup>2</sup> rendimiento de materia seca).

El tratamiento 2 (1 arena: 1 aserrín: 2 humus) es el segundo mejor sustrato, en la fase de adaptación obtiene los siguientes valores (6.9 cm de altura de planta; 2.4 número de tallos; 16.52 número de hojas; 1.34 ancho de hojas; 2.47 largo de hojas) en la fase de crecimiento obtiene (22.72 cm de altura de la planta; 53.91 número de hojas; 2.12 cm

de ancho de hojas; 3.10 largo de hojas; 12.18 g/m<sup>2</sup> rendimiento de materia verde; 6.22 g/m<sup>2</sup> rendimiento de materia seca).

El tratamiento 1 compuesto por (1 arena: 3 tierra del lugar) obtuvo los siguientes resultados para la fase de adaptación (4.4 cm de altura; 2.68 número de tallos; 8.07 número de hojas; 1.25 ancho de hojas; 2.39 largo de hojas) y para la fase de crecimiento (19.54 cm de altura; 27.89 número de hojas; 2.10 ancho de hojas; 2.71 largo de hojas; 5.6 g/m<sup>2</sup> rendimiento de materia verde; 3.0 g/m<sup>2</sup> rendimiento de materia seca).

El tratamiento 3 compuesto por (2 turba: 1 aserrín: 1 arena) resultó ser el menos recomendado por obtenerse los valores más bajos en el comportamiento morfológico; para la fase de adaptación (3.9 cm de altura; 2.64 número de tallos; 6.3 número de hojas; 1.21 ancho de hojas; 2.16 largo de hojas) y para la fase de crecimiento (16.47 cm de altura; 19.45 número de hojas; 1.84 ancho de hojas; 1.60 largo de hojas; 2.6 g/m<sup>2</sup> rendimiento de materia verde; 1.13 g/m<sup>2</sup> rendimiento de materia seca).

4. En cuanto al ataque de plagas y enfermedades, se pudo evidenciar que el tratamiento cuatro fue menos atacado por la mosca blanca, con un valor de 26.34% lo que permite mencionar que este tratamiento es el más recomendado con relación a los otros sustratos, le sigue el tratamiento dos con 30.63%, posteriormente el tratamiento uno con 38.75% y finalmente el tratamiento más atacado por la plaga fue el tratamiento tres con 47.21%.
5. Las plantas de stevia tuvieron una floración tardía de 142 a 152 días favoreciendo la mayor producción de hojas, y por lo tanto la mayor rentabilidad.
6. Se estableció que existen diferencias en las propiedades físico químicas de los sustratos, siendo el sustrato del tratamiento 2 (1 arena: 1 aserrín: 2 humus) el mejor en cuanto al análisis físico químico con respecto a los tres restantes debido a que tiene un pH neutro (6.68), cuenta con mejor CIC con un valor de 21,7 cmol(+)/kg, mayor porcentaje de nitrógeno total (0,57), mayor potasio (3,68 ppm) y (25,78 %) de materia orgánica.

El segundo mejor es el tratamiento 4 (1 turba: 1 humus: 2 arena) que tiene un pH de (6,23), CIC de (20,9 cmol(+)/kg), cuenta con un porcentaje de saturación de bases de (99,8), mayor cantidad de fósforo (48,17 ppm) y un (12,28%) de materia orgánica y mayor conductividad eléctrica (1.2) con relación a los otros tres sustratos.

El tratamiento uno tiene un pH de (5,48); (11,7%) de materia orgánica; tiene buen porcentaje de nitrógeno (0.53), y un valor de capacidad de intercambio catiónico muy bajo (13,9).

El tratamiento tres contiene mayor porcentaje de materia orgánica (32,54) y un pH más ácido con relación a los demás sustratos (4,77), tiene buena cantidad de nitrógeno (0,47), pero contiene muy baja capacidad de intercambio catiónico (16.9).

7. Se ha podido demostrar que existen diferencias económicas en los cuatro tratamientos aplicados. Siendo los tratamientos T4 y T2 los más beneficiosos económicamente, ya que su incremento en el beneficio es mayor que el incremento de sus costos; por otro lado los tratamientos T1 y T3 muestran pérdidas en su beneficio neto, esto los convierte en los tratamientos menos beneficiosos económicamente.

## 6. RECOMENDACIONES

- Considerar al tratamiento cuatro como el sustrato que expresó la mejor calidad y disponibilidad de nutrientes otorgando mayor adaptación a las vitroplantas.
- Se recomienda realizar un seguimiento de las plántulas adaptadas bajo condiciones semicontroladas a condiciones de campo.
- Utilizar un invernadero para la fase de adaptación de vitroplantas de stevia, debido a que el control de temperatura es mejor que en una carpa solar, no existiendo grandes fluctuaciones de temperaturas.
- Para evitar la pérdida de explantes y debido al gran cuidado que requiere la fase de adaptación, se recomienda que sea menor la cantidad de vitroplantas a adaptar, ó mayor la mano de obra capacitada.
- Debido al mayor requerimiento de humedad que se necesita, se sugiere mayor frecuencia de riego controlado.
- Promover trabajos de investigación sobre la comparación de la calidad del steviosido de las plantas *in vitro* y de plantas *in situ*, puesto que no se cuenta con una información precisa en el país.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Aguirre, V. G. 1997. Producción de Semilla Prebásica y Básica usando Métodos de Multiplicación Acelerada (4.3, La Paz, Bolivia). Aclimatación en Invernadero de Plántulas Obtenidas *In Vitro*. Seminario. La Paz, Bolivia. p. 1-5; 27-29
- Alpi, A; Tognoni, F. 1999. Cultivo en Invernaderos. Mundi – Prensa, 4ª edición, Madrid, España. p. 38-40
- Amar, S; Pérez, Y; Kerbauy, G. 1995. Análisis comparativo del contenido de ceras en hojas de *Catsetum fimbriatum* (Morres Lindi “in vitro” y “ex vitro”. (en Congreso Nacional de Botánica). 44, Riberao Preto. Anais Ribeirao Preto. p. 267-268
- Bautista, L. W. 1996. Micropropagación de la Stevia (*Stevia rebaudiana Bert.*) por cultivo de tejidos *in vitro* a partir de meristemas. (proyecto de tesis), Facultad de Agronomía - UMSA. La Paz, Bolivia. p. 1-28
- Bernat, J. C. 1987. Invernaderos: Construcción, Manejo, Rentabilidad, Editorial Aedos. Barcelona, España. p. 48
- Bertohna, A. 1986. Información Básica sobre la *Stevia rebaudiana Bertoni*, Universidad Estatal de Maringá Brasil, Maringá – Brasil. p. 1-70
- S/a. Biosynthesis (en línea) Consultado 20 jun. 2006. Disponible en [http://www.res.agr.ca/lond/pmrc/faq/stevia\\_rev.html](http://www.res.agr.ca/lond/pmrc/faq/stevia_rev.html)
- Brauer, O. 1973. Fitogenética aplicada. Ed. Limusa. S. A. México D. F. p. 80-90.

- Calzada, B. J. 1982. Métodos Estadísticos para la Investigación, Editorial Milagros SA. 5ª. Edición, Lima, Perú. p. 102-154
- Cardozo, V. 1992. Estudio de posibilidades de desarrollo de la *Stevia rebaudiana Bertoni* en el Paraguay. Centro Internacional de Comercio. Asunción, Paraguay. p.15
- Carricondo, I. 1996. Biología y control de la mosca blanca *Bemisia tabaci* en cultivos hortícolas en invernaderos. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía, Sevilla – España. p. 96
- Casme, S. R. L. 2000. Stevia, Retence, Ingeniería Internacional de la Stevia, Sao Paulo, Brasil. p. 6-11.
- S/a. 1999. Humus de lombriz (en línea). Ecuador. Centro de Investigación y Desarrollo del Ecuador (CIDE). Consultado 25 oct. 2004. Disponible en <http://www.lombricultura.net/1Menu.html>
- Chilon, E. 1997. Fertilidad de los Suelos y Nutrición de Plantas, Editorial CIDAT., 1ª impresión, La Paz, Bolivia. p. 31-44.
- Darias, R. R. 1993. Técnicas de Cultivo *In Vitro*, Recopilación de temas. 31 de mayo al 25 de junio, Oruro, Bolivia. p. 102-107.
- Darnbusch, R. 1997. Microeconomía, Editorial Mc Graw Hill, México. p. 159
- De Alba, J. 1987. Minerales en la nutrición mineral en la América Latina. Turrialba. 7: p. 16-33
- Echeverría, H; Bergonzi, R. 1995. Estimación de la mineralización de nitrógeno en suelos del sudeste bonaerense. (Boletín Técnico) 135. INTA, EEA Balcarce. p. 15

- Encinas, R. A. 1997. Cultivo del ka'a he'e. Facultad de Ciencias Agrarias – UNA. Asunción – Paraguay. p. 1-4
- Fenn, L. B. 1994. Calcium stimulation of ammonium absorption and growth by beets. Agron. Estación Experimental Agrícola de Texas. El Sistema Universitario Texas A & M. 86: 916-920.
- Fortuna Stevia del Paraguay. 1989. Promoción, cultivo, Industrialización y Comercialización de la *Stevia rebaudiana Bertoni*, Asunción Paraguay. p. 1-10
- Fundación Bolivia Exporta. 1992. Manual para el agricultor, La Paz, Bolivia. p. 1-10
- Gaitan, C. 1997. Riego en el cultivo de ka'a he'e dulce, American Trading 2000 SA., Asunción, Paraguay. p. 1-4
- Galloway, G; Borgo, G. 1993. Manual del Viverista Forestal en la Sierra Peruana. Proyecto FAO/Holanda INFOR. Lima, Perú. p. 35
- García De La Rosa, J. 1991. Los virus: ¿Agentes fitopatógenos o fitotóxicos? Ponencia: presentada el 13 de marzo. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. p. 1–7
- García, M. 1993. Biotecnología Alimentaria, Limusa, México, España, etc. p. 77-78
- García, J. 1982. Edafología y Fertilización Agrícola, Ed. Aedos, Barcelona – España p. 105-110
- Gill, R. I. 1996. Micropropagation of economically important tropical forest trees, Tree improvement for sustainable tropical forestry. QFRI-IUFRO Conference, Caloundra, Queensland, Australia. 1: p. 230-233.

- González, A. 1995. Historia del ka'a He'e. Cooperativa de producción Ka'a He'e Ltda. Asunción, Paraguay. p. 1-6
- Hartmann, F. 1990. Invernaderos y ambientes atemperados, FADES (Fundación para Alternativas de Desarrollo), primera edición, La Paz, Bolivia. p. 50-60
- Haynes, R. J. 1996. The decomposition process: mineralization, immobilization, humus formation and degradation. In T.T. Kozlowski (ed) Mineral nitrogen in the plant-soil system. Academic Press, Inc., Orlando, FL. p. 52-126
- Hein, W; Panigatti, J. 1991. Mineralización de fósforo y nitrógeno en Argiudoles. Informe Técnico. 45. INTA-EEA Rafaela. p. 1-18
- Hermoso, L. 1999. Aclimatación de Plantas de Café (*Coffea arabica* L.)cv. Catimor Regeneradas por Embriogénesis Somática, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. p. 1-4
- Hidalgo, O; Marca, J; Palomino, L. 1997. Producción de Semilla Prebásica y Básica usando Métodos de Multiplicación Acelerada. Manual de Capacitación, Centro Internacional de la Papa. 4.3 Lima, Perú. p. 21-25
- Hurtado, M. D; Merino, M. M. 1994. Cultivo de Tejidos Vegetales, 3ª reimpression. Ediciones Trillas, México. p. 154-161
- Inga Stevia Industrial S.A., 1987. Características químicas del steviosido y su uso, folleto informático. 7, primera impresión, Maringá, Brasil. p. 1-7
- Jordán, M. F. 1994. El Ka'a he'e (*Stevia rebaudiana*) Análisis Bibliográfico y Anotaciones Hortícolas, Ministerio de Agricultura y Ganadería, Asunción, Paraguay. p. 17-19; 60-65

- Kingham, A. D; Soejarto, D. D; 1989. Estado presente del steviosido como un agente endulzante de uso por humano. p. 50-52
- Kolberg, R; Westfall, D; Peterson, G. 1999. Influence of cropping intensity and nitrogen fertilizer rates on *in situ* nitrogen mineralization. Soil Sci. Am. J: 63 p. 129-134
- Leigue, A L. 1995. Estudio de Preinversión Agrícola en los Yungas de La Paz para la Producción de hoja de Stevia, Fundación Bolivia Exporta, La Paz, Bolivia. p. 1-31
- López, M. C. 1993. Los Fundamentos de la Agricultura, Editorial Océano, Barcelona, España. p. 136-143
- López, P. J. 1994. Edafología para la agricultura y el medio ambiente. Editorial Mundi-Prensa, Madrid, España. p. 44-60
- Molinas, A. 1986. Costo de Producción de hoja de Ka'a He'e (*Stevia rebaudiana*), Separata: Revista Paraguay Agrícola, Sep. – Oct. Paraguay. p 23-24
- Moreno, L. 1997. Explotación de sustratos de invernaderos, Cía. de Minas Magri y Gallardón S.A., Buenos Aires, Argentina. p 12-20
- Pérez, P. J. 1998. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas en Cuba, Villa Clara, Cuba. p. 193-206
- Pierick, L. 1990. Tecnología para la propagación *in vitro* de clones de Musa sp. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. p. 56-57
- Pinaya, R. A. 1996. Efecto de la Densidad de Siembra sobre el Rendimiento de Steviósido en Cultivo de Stevia, Tesis Lic. Ing. Agr. La Paz, Bolivia, UMSA. p. 40-85
- Poehlman, J. M. 1979. Mejoramiento genético de las cosechas. Limusa, México. p. 78 –92

- Programa de Investigación de la Papa (PROINPA), 1996. Serie Ficha Técnica 2/96 Nematología, Cochabamba, Bolivia.
- Quezada, L. 1992. Manejo de plantas de Invernadero. Curso Internacional sobre Cultivo de tejidos en especies agámicas, Cuba. p. 16 – 18
- Reicosky, D. C; Kemper, G. W; Langdale, C. L. 1995. Soil organic matter changes resulting from tillage and biomass production. *Journal of Soil and Water Conservation* 50(3): p. 229-236
- Richard, D. 1996. *Stevia rebaudiana*: Nature's Sweet Secret. (en línea). Consultado 13 mar. 1999. Disponible en <http://www.healthy.net/library/books/stevia/secret.htm>
- Rivadeneira, C; Morales, Y. 1995. Producción de plantas de *Stevia rebaudiana* como alternativa en la elaboración de edulcorantes en Santa Cruz, Universidad Autónoma Gabriel René Moreno I.I.A. "El Vallecito", Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. p. 1-12
- Robinson, B. L. 1982. The Stevias of North and Central America. *Contr. Gray Herb.* 90. p. 90-102
- Rodríguez, F. 1992. Fertilización – Nutrición Vegetal A. G. T. Editor S. A. México D. F. p. 37-39
- Rosell, C. 1990. Fundación teórico – práctico del cultivo de tejidos vegetales. 1ª Edición. FAO. Roma, Italia. p. 85-88
- Ruiz, D. T. 1998. Evaluación del Manejo integrado de plagas y enfermedades en sukakollos y papa, Prosuco, La Paz, Bolivia. p. 54-60
- Sakaguchi, M. 1982. As pesquisas japonesas con *Stevia rebaudiana* Bert. Bertoi e o steviosideo *Ciencia e Cultura* 34. p. 235-242

- Sade, A. 1980. Cultivos Bajo Condiciones Forzadas, Nociones Generales, Rejovot, Israel. p. 17-25
- Stevenson, F. J. 1999. Cycles of soil. Nitrogen as a plant nutrient. p. 112-115
- Sumida, T. 1997. Posibilidades del Desarrollo Agroindustrial de la *Stevia rebaudiana Bertoni* en Bolivia, Agencia Japonesa de Cooperación Internacional (JICA), Dirección Nacional de Agroindustrias, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, La Paz, Bolivia. p. 140-151
- Suárez, F. 1997. Conservación de Suelos, 3ª Ed. IICA. San José, Costa Rica. p. 155-157
- S/a. 1990. Stevioside "Naturally" of Maringá. (en línea). Paraná, Brasil. Consultado 20 dic. 2005. Disponible en <http://www.holisticmed.com/sweet/stv-ej.txt>
- Tisdale, L; Nelson, L. 1991. Fertilidad de los suelos y fertilizantes, Limusa, México. p. 761
- Trindade, H; Pais, S. 1997. "In vitro" studies on Eucalyptus globules rooting ability. "In vitro" Cellular and Developmental Biology Plant. 33:1 p. 1-5
- Ungarreto, G. 1999. Un negocio muy dulce. Revista Manchette Rural. 26 de oct. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. p. 8-9
- Uria, V. 1994. Cultivo de tejidos in vitro. Publicación Universidad Mayor de San Andrés, Instituto Boliviano Tecnología Energía Nuclear, La Paz, Bolivia. p. 48-49.
- Utsunomiya, T. 1984. Modo de cultivar la *Stevia rebaudiana Bert.* Condimento de dulzura materia a máquina. Japan Jour. p. 569-570.

- Viana, A. 1982. Análise de crescimento a do teos de steviosidesidea em *Stevia rebaudiana Bert*, em fotoperíodos de 16 a 8 horas, Instituto de Tecnologia de Alimentos Sao Paulo, Brasil. p. 25 –28
- Videla, C. 1996. Abonos orgánicos. XV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo, Sudeste bonaerense, Argentina. p. 67-72.
- Villalobos, G. 1997. Posibilidades del Desarrollo Agroindustrial de la *Stevia rebaudiana Bertoni* en Bolivia, Dirección Nacional de Agroindustrias, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, La Paz, Bolivia. p. 140-151
- Ziv, M. 1999. Vitrificación: morphological and physiological disorders of “in vitro” plant. Micropropagation: Technology and application. (Ed.) Dordrecht, Kluwer Academic. p. 49-69
- Watts, D; Hancks, R. 1988. A soil-water-nitrogen model for irrigated corn on sandy soils. Soil Sci. Am. J. 42: p. 492-499

**ANEXOS**

**ANEXO I ILUSTRACIONES**



**Ilustración 1 : Vitroplantas de Stevia**



**Ilustración 2: Vitroplantas de *Stevia rebaudiana***



**Ilustración 3: Desinfectante granulado**



**Ilustración 4: Malla de aislamiento**



**Ilustración 5: Extracción de material genético**



**Ilustración 6: Cubierta de vasos plásticos**

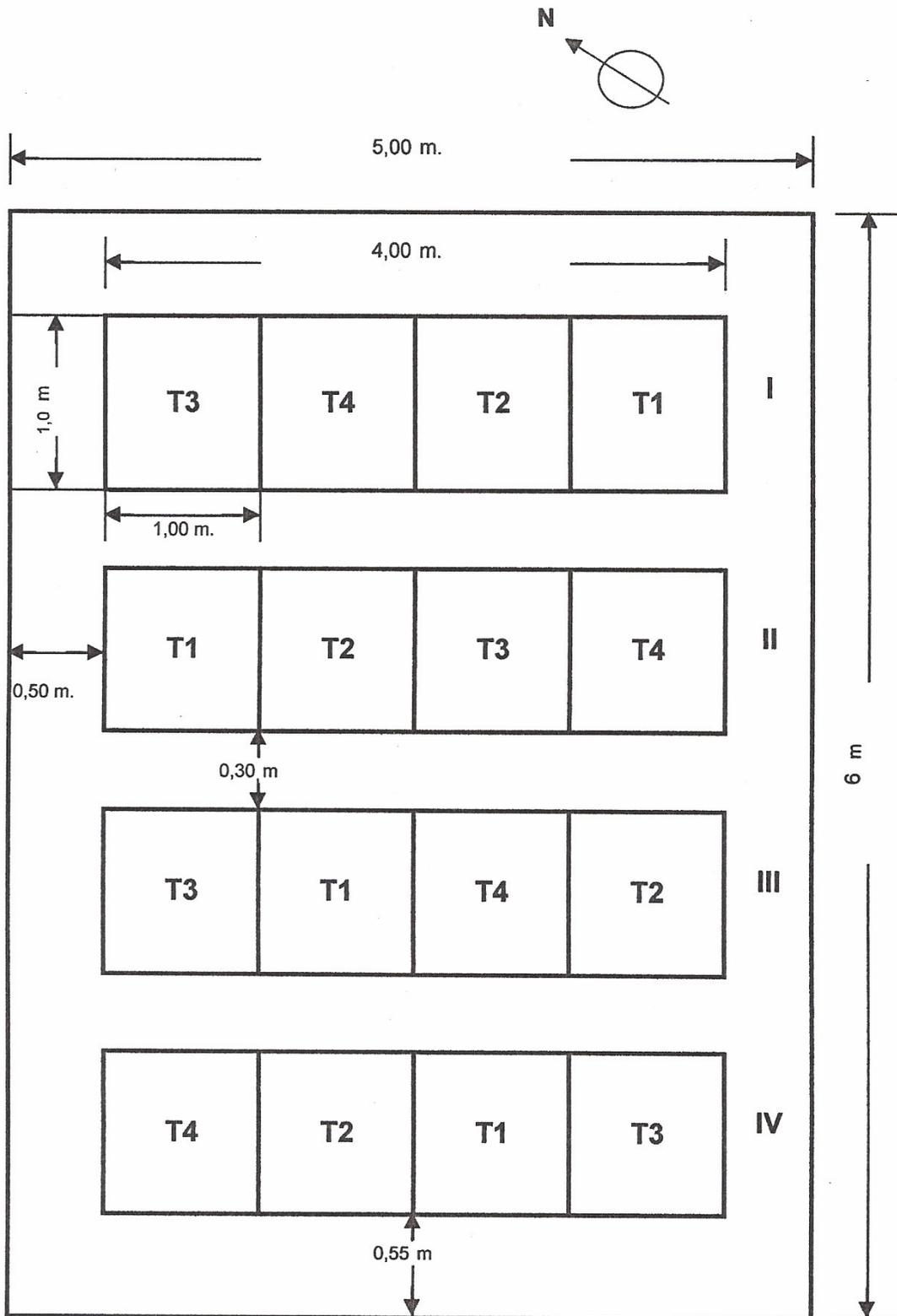


**Ilustración 7: Plantas de *Stevia rebaudiana***



**Ilustración 8: Larvas de mosca blanca**

# ANEXO II CROQUIS DEL INVERNADERO



## ANALISIS FISICO-QUIMICO DE SUELOS

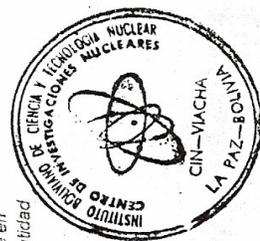
INTERESADO : **PATRICIA PERALTA F.**  
 PROCEDENCIA : **Dpto. LA PAZ, Campus Universitario COTA-COTA**

Nº Lab.	CODIGO	ARENA		ARCILLA		LIMO		CLASE TEXTURAL	CARBO NATOS LIBRES	pH en agua en KCl 1M		CE. mmhos/cm	CATIONES DE CAMBIO ( meq / 100 gr. )				SAT. BAS. %	M.O. %	N TOTAL %	P Asimilable PPM			
		%	%	%	%	1:5	1:5			Ca	Mg		Na	K	TBI	ClC							
341/99	T 1	47	22	25	FYA	11.83	F			5.62	5.34	0.421	0.065	10.19	3.03	0.37	0.28	13.86	13.926	99.5	11.71	0.53	15.34
342/99	T 2	60	24	16	FYA	2.53	F			6.90	6.87	0.832	0.065	13.15	3.39	1.45	3.68	21.67	21.734	99.7	25.78	0.57	39.17
343/99	T 3	56	26	18	FYA	0.74	A			4.95	4.60	0.922	0.065	12.09	3.95	0.44	0.40	16.88	16.948	99.6	32.54	0.47	9.56
344/99	T 4	65	21	14	FYA	5.11	P			6.37	6.10	1.182	0.051	13.82	4.16	0.95	2.00	20.92	20.969	99.8	12.28	0.42	48.17

**OBSERVACIONES.-** \* Cationes de Cambio extraídos con Acetato de Amonio 1 N, excepto (\*) Calcio, Magnesio y Potasio extraído con Acetato de Sodio 1 N. Fostoro Asimilable analizado con el método de Bray - Kurtz.

**CARBONATOS LIBRES .**  
 A Ausente  
 P Presente  
 PP Presente en gran cantidad

**CLASE TEXTURAL**  
 F : Franco Y : Arcilloso  
 L : Limoso YA : Arcilloso Arenoso FA : Franco Arenoso YL : Arcilloso Limoso  
 A : Arenoso FYA : Franco Arcilloso Arenoso AF : Arenoso Franco FY : Franco Arcilloso FL : Franco Limoso



*[Signature]*  
 RESPONSABLE DE LABORATORIO  
 JORGE CHUNGARA

**DATOS REGISTRADOS A LO LARGO DEL EXPERIMENTO**

	Altura	N° de Tallos	N° de hojas	Largo de H	Ancho de H	Altura2	NH2	LH2	AH2
T1B1	5,34	2,25	16,58	2,50	1,37	24,21	58,79	3,00	2,16
T2B1	8,40	2,62	8,16	2,56	1,40	20,15	34,93	3,76	2,06
T3B1	4,30	2,34	6,30	2,00	1,35	17,20	25,31	1,87	1,62
T4B1	11,60	2,55	20,75	2,60	1,39	31,31	60,80	3,92	2,59
T1B2	4,30	2,33	17,80	2,03	1,22	22,01	51,76	2,85	2,02
T2B2	7,20	2,30	8,40	2,55	1,40	19,83	27,12	3,04	2,16
T3B2	4,19	2,86	6,10	2,18	1,14	17,08	20,20	1,62	1,90
T4B2	10,02	2,47	18,65	2,30	1,42	29,73	56,72	3,65	2,57
T1B3	4,00	2,67	15,60	2,55	1,15	23,43	54,96	2,48	2,08
T2B3	6,50	2,47	7,90	2,31	1,25	19,63	30,17	3,13	2,08
T3B3	3,98	2,98	6,80	2,20	1,17	16,39	16,00	1,15	1,87
T4B3	8,36	2,74	19,00	2,63	1,45	28,84	49,82	3,79	2,44
T1B4	3,90	2,34	16,10	2,47	1,26	21,24	50,12	2,51	2,20
T2B4	5,37	2,98	7,80	2,46	1,31	18,55	19,34	2,46	2,11
T3B4	3,05	2,66	6,00	2,24	1,18	15,21	16,30	1,41	1,97
T4B4	8,00	2,95	19,50	2,50	1,21	27,22	48,93	3,60	2,36
CME	0,0446	0,5207	0,5207	0,027	0,0064		7,163	0,042	0,013
CV	8,10%	5,73%	5,73%	6,92%	6,21%		6,89%	7,38%	5,40%
Sx	0,105601	0,3608035	0,3608035	0,0822935	0,0401062		1,3381928	0,1027951	0,0576508

**HUMEDAD RELATIVA (%)**

	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb
HR carpa	63,10	54,70	56,10	54,60	56,30
HR exterior	50,00	45,00	48,00	57,00	65,00

**TEMPERATURA (°C)**

	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb
T° máx.ext.	24,50	24,00	26,00	23,20	20,70
T° máx.carpa	26,50	34,60	35,10	35,30	32,90
T° mín.ext.	2,50	4,00	5,50	5,20	6,50
T° mín.carpa	8,00	10,00	8,50	7,90	6,90