

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



TESIS DE GRADO

ESTABLECIMIENTO DE CELULAS EN SUSPENSIÓN DE
***Stevia rebaudiana* Bertoni**

Presentado por:

Evelyn Elizabeth Villanueva Gutierrez

La Paz – Bolivia
2004

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

**ESTABLECIMIENTO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE
Stevia rebaudiana Bertoni.**

*Tesis de Grado presentado como requisito
parcial para optar el Título de Licenciado en
Ingeniería Agronómica*

Evelyn Elizabeth Villanueva Gutierrez

Tutor

Dr. Ph. D. Alberto Giménez Turba

Asesores:

Ing. M. Sc. Jorge Pascuali C.

Ing. Rafael Murillo G.

Comité Revisor:

Ing. M. Sc. Wilfredo Rojas

Ing. Jorge Quezada Portugal

Ing. Álvaro Castro Núñez

APROBADA

Vicedecano:

Ing. M. Sc. Félix Rojas Ponce.

Dedicatoria:

A mis padres, Ruddy y Elizabeth, por su inmenso apoyo, cariño y sacrificio al ser un modelo de vida, que contribuyeron incondicionalmente a mi formación como persona y como profesional. A mi amado esposo Sergio, por creer en mí, por ser un ejemplo de vida, y darme su aliento y comprensión y a mi hermano Enrique, por ser un ejemplo a seguir como amigo y como profesional.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alberto Giménez Turba, Director del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), dependiente de la Facultad de Farmacia y Bioquímica - UMSA, por su incondicional guía, colaboración; facilitación de todos los materiales y equipos, para la realización de esta investigación

Al personal del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), por su colaboración en el manejo adecuado de los diferentes equipos empleados y transmisión de conocimientos pertinentes a esta investigación.

Al Ingeniero Jorge Pascualí C. y al Ingeniero Rafael Murillo, por su guía, transmisión de conocimientos y experiencias para la realización de este estudio.

A los Ingenieros Jorge Quezada, Wilfredo Rojas y Álvaro Castro, por su colaboración en la realización de esta investigación.

*A la Unidad de Bioquímica y Biotecnología Vegetal del Instituto de Genética, dependiente de la Facultad de Medicina - UMSA, por facilitar el material vegetal de *Stevia rebaudiana* B con el que se pudo iniciar la investigación.*

*A la Dra. María Eugenia Ascarrunz Gonzáles, Jefe de la Unidad de Bioquímica y Biotecnología Vegetal del Instituto de Genética dependiente de la Facultad de Medicina - UMSA, por su transmisión de conocimientos y experiencias sobre plantas *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B y la facilitación del material vegetal, producto de varios años de investigación en el área de Cultivo de Tejidos.*

Al plantel Docente de la Facultad de Agronomía UMSA, por contribuir a mi formación como profesional en el área de Ciencias Agrícolas y Agropecuarias

A mis amigas Sandra Rodríguez, Milenka Palenque, Claudia Carrasco, Grisel Balderrama, Laura Mendoza, Marcela Velarde y Carla Morales por su aliento, comprensión y su amistad incondicional en todo momento.

A Juan José Vicente, por todo el apoyo brindado y por su amistad incondicional.

A mis abuela Luisa, tíos, primos y sobrinos que me brindaron su apoyo incondicional siempre.

A las personas, docentes y amigos que me apoyaron a lo largo de mi formación profesional donde compartimos gratos momentos.

A la Sociedad boliviana, que gracias a sus aportes, permite la formación de profesionales para promover el desarrollo del país, a través de las universidades del Estado boliviano.

CONTENIDO GENERAL

	RESUMEN	
	ABSTRACT	
1	CAPITULO I INTRODUCCIÓN	1
1.1.	INTRODUCCIÓN	1
1.2.	OBJETIVOS	4
1.2.1.	Objetivo General	4
1.2.2.	Objetivos Específicos	4
1.3.	HIPÓTESIS	5
2	CAPITULOS II REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	6
2,1	ASPECTOS GENERALES DE LA ESPECIE <i>Stevia rebaudiana</i> B.	6
2.1.1.	Origen e Importancia económica	6
2.1.2.	Distribución en Bolivia	6
2.1.3.	Clasificación Taxonómica	7
2.1.4.	Propagación de <i>Stevia rebaudiana</i> B.	7
2.1.5.	El poder edulcorante natural de los componentes naturales de <i>Stevia rebaudiana</i> B.	8
2.1.6.	Usos	8
2.1.7	Estudios agronómicos realizados en el mundo	9
2.1.8.	Estudios agronómicos realizados en Bolivia	9
2.1.9	Estudios fotoquímicos del Género <i>Stevia</i>	10
2.2.	ASPECTOS GENERALES SOBRE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL	11
2.2.1.	Cultivo de Tejidos	11
2.2.2.	Medio de Cultivo	12
2.2.2.1.	Sales Inorgánicas	12
2.2.2.2.	Compuestos Orgánicos	13
2.2.2.2.1	Carbohidratos	13
2.2.2.2.2	Reguladores de Crecimiento	13
2.2.2.2.2.1	Auxinas	14
2.2.2.2.2.2	Citocininas	16
2.2.2.2.2.3	Combinación de Auxinas y Citocininas	17
2.2.2.2.3	Vitaminas	18
2.2.2.2.4	Aminoácidos y Amidas	19
2.2.3.	Establecimiento y multiplicación de plantas <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> B	19
2.2.4	Estudios Biotecnológicos realizados en Bolivia	20
2.2.5	Inicio y establecimiento de callos	21
2.2.5.1	Formación de Callo	21

2.2.5.2	Subcultivo de Callos	22
2.2.5.3	Porcentaje de Formación de Callo	23
2.2.5.4.	Tipo de callos y su importancia	23
2.2.5.5.	Supervivencia del Callo	24
2.2.5.6.	Peso	24
2.2.5.7.	Trabajos de Investigación en callos de <i>Stevia rebaudiana</i> B.	25
2.2.6.	Cultivo de Células en suspensión	25
2.2.6.1.	Inicio Establecimiento y Crecimiento de la Suspensión Celular	26
2.2.6.2.	Condiciones de Cultivo	27
2.2.6.2.1.	Medio de Cultivo	27
2.2.6.2.2.	Densidad óptima de inóculo inicial	27
2.2.6.2.3.	Plataformas rotatorias	28
2.2.6.2.4.	Fotoperiodo	28
2.2.6.2.5.	Temperatura	28
2.2.6.3.	Subcultivo de la suspensión celular	29
2.2.7.	Crecimiento Celular	29
2.2.7.1.	Evaluación del Crecimiento Celular	30
2.2.7.1.1.	Número de Células por ml	30
2.2.7.1.2.	Vitalidad Celular	31
2.2.7.1.3.	Determinación del Peso Fresco y Peso Seco	31
2.2.7.1.4.	pH del medio de cultivo	32
2.2.7.2.	Densidad Celular	32
3	CAPITULO III MATERIALES Y METODOS	33
3.1.	LOCALIZACIÓN	33
3.2.	MATERIALES	33
3.2.1.	Material Vegetal	33
3.2.2.	Reactivos	34
3.2.2.1.	Medio de cultivo	34
3.2.2.1.1.	Medio de cultivo para multiplicación de la planta, inducción, mantenimiento de callo y suspensión celular.	34
3.2.2.1.2.	Medio de cultivo para la verificación de contaminación por microorganismos	34
3.2.2.2.	Reguladores de Crecimiento	34
3.2.2.3.	Colorantes para la tinción de células vegetales y detección de bacterias	35
3.2.3.	Material de Vidrio	35
3.2.4.	Equipos	35
3.2.5	Material Fungible	36
3.2.6.	Otros	36
3.3.	MÉTODOS	37

3.3.1.	Multiplicación masiva de plantas <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i>	37
3.3.2.	Primera Fase : Inducción y mantenimiento de callo a partir de hojas <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> B.	38
3.3.2.1.	Preparación del medio de cultivo	38
3.3.2.2.	Inducción a Callos	39
3.3.2.3.	Mantenimiento de los callos	40
3.3.2.4.	Variables de respuesta	43
3.3.2.4.1.	Porcentaje de Formación de Callo	43
3.3.2.4.2.	Peso Total de Callo por caja Petri	44
3.3.2.4.3.	Porcentaje de Supervivencia del Callo	45
3.3.2.5.	Diseño Experimental de la Primera Fase	45
3.3.2.5.1.	Modelo Lineal Aditivo de la Primera Fase Experimental con un arreglo Factorial 3x3x3 en Diseño Completamente al azar	47
3.3.2.5.2	Modelo Lineal Aditivo de la Primera Fase Experimental para evaluar 30 tratamientos en un Diseño Completamente al Azar	48
3.3.2.5.3.	Pruebas de Significancia de la Primera Fase	48
3.3.2.5.4.	Transformación de Datos de la Primera Fase	48
3.3.3.	Segunda Fase: Iniciación, Establecimiento y Crecimiento en Suspensión Celular de <i>Stevia rebaudiana</i> B.	49
3.3.3.1.	Preparación del Medio de Cultivo	50
3.3.3.2.	Inicio y Establecimiento de la suspensión celular	50
3.3.3.3.	Variables de Respuesta	54
3.3.3.3.1.	Recuento Total del Número de células por mililitro	54
3.3.3.3.2.	Porcentaje de Vitalidad Celular	55
3.3.3.3.3.	Peso Fresco y Peso Seco	56
3.3.3.3.4.	pH del medio de cultivo	56
3.3.3.3.5.	Diluciones para el conteo celular	57
3.3.3.4.	Diseño Experimental de la Segunda Fase	57
3.3.3.4.1.	Modelo Lineal Aditivo de la Segunda Fase	57
3.3.3.4.2.	Pruebas de Significancia de la Segunda Fase	58
3.3.3.4.3.	Transformación de Datos de la Segunda Fase	58
4	CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIONES	59
4,1	MULTIPLICACION MASIVA DE PLANTAS <i>in vitro</i> DE <i>Stevia rebaudiana</i> B.	59
4.2.	PRIMERA FASE: INDUCCIÓN Y MANTENIMIENTO DE CALLO	59
4.2.1.	Porcentaje de Formación de callos	59
4.2.1.1.	Porcentaje de Formación de callos a los 28 días	63
4.2.1.1.1.	Análisis del Comportamiento general de los tratamientos	67

4.2.1.2.	Porcentaje de Formación de callos a los 56 días	69
4.2.1.2.1.	Análisis del Comportamiento general de los tratamientos	74
4.2.2.	Peso de Callo	76
4.2.2.1	Peso de callo a los 28 días	76
4.2.2.1.1.	Análisis del comportamiento general de los tratamientos	78
4.2.2.2.	Peso de callo a los 56 días	81
4.2.2.2.1.	Análisis del comportamiento general de los tratamientos	88
4.2.2.3.	Peso de callo a los 84 días	90
4.2.2.3.1.	Análisis del comportamiento general de los tratamientos	92
4.2.3.	Porcentaje de supervivencia de callo	94
4.2.3.1.	Porcentaje de supervivencia a los 56 días (4 semanas después del Primer Subcultivo)	97
4.2.3.1.1.	Análisis del comportamiento general de los tratamientos	98
4.2.3.2.	Porcentaje de supervivencia a los 84 días (4 semanas después del Segundo Subcultivo)	100
4.2.3.2.1.	Análisis del comportamiento general de los tratamientos	101
4.2.3.3.	Porcentaje de supervivencia a los 112 días (4 semanas después del Tercer Subcultivo)	104
4.2.3.3.1.	Análisis del comportamiento general de los tratamientos	108
4.3.	SEGUNDA FASE: INICIO, ESTABLECIMIENTO Y CRECIMIENTO CELULAR	
	EN SUSPENSIÓN DE <i>Stevia rebaudiana</i> B.	110
4.3.1.	Número Total de Células por mililitro	111
4.3.1.1.	Número Total de Células por ml al primer día de conteo	111
4.3.1.2.	Número Total de Células por ml a los 13 días del recuento celular	113
4.3.1.3.	Número Total de Células por ml a los 23 días del recuento celular	114
4.3.2.	Porcentaje de Vitalidad Celular	117
4.3.2.1.	Porcentaje de Vitalidad Celular al primer día de evaluación de la suspensión celular	121
4.3.2.2.	Porcentaje de Vitalidad Celular a los 13 días de evaluación de la suspensión celular	122
4.3.2.3.	Porcentaje de Vitalidad Celular a los 23 días de evaluación de la suspensión celular	123
4.3.3.	Peso Fresco y Peso Seco de la suspensión celular por tratamiento	126
4.3.4.	Fluctuación del pH en el medio de cultivo en 23 días de evaluación	128
5	CAPITULO V CONCLUSIONES	130
5.1.	Inducción y Mantenimiento de callos de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	130

5.2.	Inicio, establecimiento y crecimiento de células en suspensión de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.	131
5.3.	Obtención de Callos con diferentes características morfológicas según la combinación de los reguladores de crecimiento	133
5.3.1.	Efecto de 2,4-D combinada con BAP	133
5.3.2.	Efecto de ANA combinada con BAP	133
5.3.3.	Efecto de AIA combinada con BAP	134
5.3.4	Efecto de BAP	135
6	CAPITULO VI RECOMENDACIONES	136
7	CAPITULO VII BIBLIOGRAFÍA	138
8	ANEXOS	146

INDICE DE CUADROS

Cuadro Nº 1.	Clasificación Taxonómica	7
Cuadro Nº 2.	Factores y Niveles para la inducción y mantenimiento de callos que corresponde a un arreglo factorial 3x3x3 de la Primera Fase.	45
Cuadro Nº 3.	Formulación de los 30 tratamientos con diferentes tipos y concentraciones de auxinas y BAP.	46
Cuadro Nº 4.	Fórmula para determinar el Número de Células por ml	55
Cuadro Nº 5.	Fórmula para evaluar el porcentaje de vitalidad celular	55
Cuadro Nº 6.	Tratamiento con diferentes concentraciones [C] de 2,4-D correspondientes a la Segunda Fase	57
Cuadro Nº 7.	Análisis de Varianza Factorial para el porcentaje de formación de callo a los 28 días de inducción	63
Cuadro Nº 8.	Prueba Duncan (5%) para los efectos de la Concentración de BAP en el porcentaje de formación de callo a 28 días de inducción	65
Cuadro Nº 9.	Análisis de los efectos simples de la interacción del tipo de auxina por [C] del porcentaje de formación de callo a los 28 días de inducción	65
Cuadro Nº 10.	Análisis de varianza para los 30 tratamientos del porcentaje de formación de callo a los 28 días de inducción.	67
Cuadro Nº 11.	Análisis de Varianza Factorial para el porcentaje de formación de callo a los 56 días de inducción	70
Cuadro Nº 12.	Prueba Duncan (5%) para los efectos de la Concentración de BAP en el porcentaje de formación de callo a 56 días de inducción	70
Cuadro Nº 13.	Análisis de los efectos simples de la interacción del tipo de auxina por [C] de Auxina del porcentaje de formación de callo a los 56 días de inducción	71
Cuadro Nº 14.	Análisis de los efectos simples de la interacción del tipo de auxina por [] de BAP del porcentaje de formación de callo a los 56 días de inducción	73
Cuadro Nº 15.	Análisis de varianza para los 30 tratamientos del porcentaje de formación de callo a los 56 días de inducción	74
Cuadro Nº 16.	Análisis de varianza factorial para el peso de callo a los 28 días de inducción	77
Cuadro Nº 17.	Análisis de varianza para los 30 tratamientos del peso total de callo a los 28 días de inducción a callo.	79
Cuadro Nº 18.	Análisis de varianza factorial para el peso de callo a los 56 días de inducción	82
Cuadro Nº 19.	Prueba Duncan (5%) para los efectos del tipo de Auxina en el Peso Total a los 56 días de inducción a Callo.	82
Cuadro Nº 20.	Prueba Duncan (5%) para los efectos de [C] de Auxina en el Peso Total	

	a los 56 días de inducción a Callo.	83
Cuadro Nº 21.	Prueba Duncan (5%) para los efectos de [C] de BAP en el Peso Total a los 56 días de inducción a Callo.	83
Cuadro Nº 22.	Análisis de los efectos simples de la interacción de [C] de Auxina por la [C] de BAP del peso total de callo a los 56 días de inducción.	85
Cuadro Nº 23.	Análisis de varianza para los 30 tratamientos del peso total de callo a los 56 días de inducción	88
Cuadro Nº 24.	Análisis de varianza factorial para el peso total de callo a los 84 días de inducción	90
Cuadro Nº 25.	Prueba Duncan (5%), para los efectos del tipo de auxina en el peso total a los 84 días de inducción a callo	91
Cuadro Nº 26.	Prueba Duncan (5%), para los efectos de [C] de BAP del peso total a los 56 días de inducción a callo	91
Cuadro Nº 27.	Análisis de varianza para los 30 tratamientos del peso total de callo a los 84 días de inducción	92
Cuadro Nº 28.	Análisis de varianza factorial para el porcentaje de supervivencia de callo a los 56 días de inducción.	97
Cuadro Nº 29.	Prueba Duncan (5%), para los efectos del tipo de auxina en el porcentaje de supervivencia de callo a los 56 días de inducción a callo.	98
Cuadro Nº 30.	Análisis de varianza para los 30 tratamientos del porcentaje de supervivencia de callo a los 56 días de inducción.	98
Cuadro Nº 31.	Análisis de varianza factorial para el porcentaje de supervivencia de callo a los 84 días de inducción.	100
Cuadro Nº 32.	Prueba Duncan (5%), para los efectos del tipo de auxina en el porcentaje de supervivencia de callo a los 84 días de inducción a callo.	101
Cuadro Nº 33.	Análisis de varianza para los 30 tratamientos del porcentaje de supervivencia de callo a los 84 días de inducción.	102
Cuadro Nº 34.	Análisis de varianza factorial para el porcentaje de supervivencia de callo a los 112 días de inducción.	104
Cuadro Nº 35.	Prueba Duncan (5%), para los efectos del tipo de auxina en el porcentaje de supervivencia de callo a los 112 días de inducción a callo.	105
Cuadro Nº 36.	Análisis de los efectos simples de la interacción del tipo de auxina por la [C] de BAP del porcentaje de supervivencia de callo a los 112 días de inducción.	106
Cuadro Nº 37.	Análisis de varianza para los 30 tratamientos del porcentaje de supervivencia de callo a los 112 días de inducción.	108
Cuadro Nº 38.	Análisis de varianza para el número total de células por ml al primer día	111
Cuadro Nº 39.	Prueba Duncan (5%) para las diferencias entre medias del número total de células por ml	

	al primer día del recuento celular	112
Cuadro Nº 40.	Análisis de varianza para el número total de células por ml a los 13 días	113
Cuadro Nº 41.	Prueba Duncan (5%) para las diferencias entre medias del número total de células por ml	
	a los 13 días del recuento celular	114
Cuadro Nº 42.	Análisis de varianza para el número total de células por ml a los 23 días	115
Cuadro Nº 43.	Prueba Duncan (5%) para las diferencias entre medias del número total de células por ml	
	a los 23 días del recuento celular	115
Cuadro Nº 44.	Análisis de Varianza para el Porcentaje Vitalidad celular por ml al primer día de evaluación de la suspensión celular.	121
Cuadro Nº 45.	Prueba Duncan (5%) para las diferencias entre medias del Porcentaje de la Vitalidad Celular por ml al primer día de evaluación.	121
Cuadro Nº 46.	Análisis de Varianza para el Porcentaje Vitalidad celular por ml a los 13 días de evaluación de la suspensión celular.	122
Cuadro Nº 47.	Prueba Duncan (5%) para las diferencias entre medias del Porcentaje de la Vitalidad Celular por ml a los 13 días de evaluación.	122
Cuadro Nº 48.	Análisis de Varianza para el Porcentaje Vitalidad celular por ml a los 23 días de evaluación de la suspensión celular.	123
Cuadro Nº 49.	Prueba Duncan (5%) para las diferencias entre medias del Porcentaje de la Vitalidad Celular por ml a los 23 días de evaluación.	124

INDICE DE GRAFICOS

Gráfica Nº 1	Esquema guía de la Metodología desarrollada en la investigación	37
Gráfica Nº 2	Multiplicación de plantas <i>in vitro</i> de <i>Stevia rebaudiana</i> B. e inducción y mantenimiento de callos.	42
Gráfica Nº 3	Inicio, Establecimiento y Crecimiento de cultivos en suspensión celular de <i>Stevia rebaudiana</i> B.	53
Gráfica Nº 4	Efectos Simples del Tipo de Auxina dentro de cada concentración de Auxina sobre el Porcentaje de Formación de Callo a los 28 días.	66
Gráfica Nº 5	Diferencias entre medias del Porcentaje de Formación de Callos friables y los tratamientos: 1, 11 y 21 a los 28 días de inducción.	68
Gráfica Nº 6	Efectos Simples del Tipo de Auxina dentro de cada concentración de Auxinas sobre el Porcentaje de Formación de Callo a los 56 días.	72
Gráfica Nº 7	Efectos Simples del Tipo de Auxina dentro de cada concentración de BAP sobre el Porcentaje de Formación de Callo a los 56 días.	73
Gráfica Nº 8	Diferencias entre medias del Porcentaje de Formación de Callos friables y los tratamientos: 1, 11 y 21 a los 56 días de inducción.	75
Gráfica Nº 9	Diferencias entre medias del Peso Total de Callos friables y los tratamientos: 1, 11 y 21 a los 28 días de inducción.	80
Gráfica Nº 10	Efectos Simples de las Concentraciones de Auxina dentro de cada Concentración de BAP sobre el Peso Total de Callo a los 56 días de Inducción.	85
Gráfica Nº 11	Efectos Simples de las Concentraciones de BAP dentro de cada Concentración de Auxina sobre el Peso Total de Callo a los 56 días de inducción.	87
Gráfica Nº 12	Diferencias entre medias del Peso Total de Callos friables y los tratamientos: 1, 11 y 21 a los 56 días de inducción.	89
Gráfica Nº 13	Diferencias entre medias del Peso Total de Callos friables . y los tratamientos: 1, 11 y 21 a los 84 días de inducción	93
Gráfica Nº 14	Diferencias entre medias del Porcentaje de Supervivencia de Callos friables y los tratamientos: 1, 11 y 21 a los 56 días de inducción.	99
Gráfica Nº 15	Diferencias entre medias del Porcentaje de Supervivencia de Callos friables y los tratamientos: 1, 11 y 21 a los 84 días de inducción.	103
Gráfica Nº 16	Efectos simples del tipo de Auxina dentro de cada concentración de BAP sobre el Porcentaje de Supervivencia de Callo a los 112 días de inducción.	107
Gráfica Nº 17	Diferencias entre medias del Porcentaje de Supervivencia de Callos friables y los tratamientos: 1, 11 y 21 a los 112 días de inducción.	109
Gráfica Nº 18	Número de células /ml en escala logarítmica en el 1º. 13º y 23º día de evaluación del crecimiento celular.	116
Gráfica Nº 19	Porcentaje de vitalidad celular en el 1º. 13º y 23º día de evaluación del crecimiento celular.	125
Gráfica Nº 20	Peso Fresco de las suspensiones celulares, en gramos de masa por litro (gml) de los tres tratamientos, en 23 días de evaluación.	126
Gráfica Nº 21	Peso Seco de las suspensiones celulares en gramos de masa seca por litro (gms/l) de los tres tratamientos, en 23 días de evaluación.	127
Gráfica Nº 22	Efecto de las diferentes concentraciones de auxina-citocinina en la variación del pH durante 23 días de cultivo celular continuo.	128

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Inducción a callo de Stevia rebaudiana B a partir de hojas	40
Figura 2	Tratamiento 2 de la Segunda Fase	52
Figura 3	Tratamiento 4 (20uM 2,4-D/ 0uM BAP) de la Primera Fase Experimental	60
Figura 4	Tratamiento 14 (20uM 2,4-D/ 25uM BAP) de la Primera Fase Experimental	60
Figura 5	Tratamiento 24 (20uM 2,4-D/ 50uM BAP) de la Primera Fase Experimental	60
Figura 6	Tratamiento 5 (5uM ANA/ 0uM BAP) de la Primera Fase Experimental	61
Figura 7	Tratamiento 15 (5uM ANA/ 25uM BAP) de la Primera Fase Experimental	61
Figura 8	Tratamiento 25 (5uM ANA/ 50uM BAP) de la Primera Fase Experimental	61
Figura 9	Tratamiento 9 (10uM AIA/ 0uM BAP) de la Primera Fase Experimental	61
Figura 10	Tratamiento 19 (10uM AIA/ 25uM BAP) de la Primera Fase Experimental	61
Figura 11	Tratamiento 29 (10uM AIA/ 50uM BAP) de la Primera Fase Experimental	61
Figura 12	Tratamiento 11 (25uM BAP) de la Primera Fase Experimental	62
Figura 13	Tratamiento 21 (50uM BAP) de la Primera Fase Experimental	62
Figura 14	Tratamiento 1 (0uM Auxinas / 0uM BAP) de la Primera Fase Experimental	62
Figura 15	Tratamiento 1 (0uM Auxinas / 0uM BAP) de la Primera Fase Experimental	62
Figura 16	Tratamiento 7 (20uM ANA/ 0uM BAP) de la Primera Fase Experimental	95
Figura 17	Tratamiento 17 (5uM ANA/ 25uM BAP) de la Primera Fase Experimental	95
Figura 18	Tratamiento 18 (5uM AIA/ 25uM BAP) de la Primera Fase Experimental	95
Figura 19	Tratamiento 21 (50uM BAP) de la Primera Fase Experimental	95
Figura 20	Tratamiento 8 (5uM AIA/ 0uM BAP) de la Primera Fase Experimental	96
Figura 21	Tratamiento 28 (5uM AIA/ 50uM BAP) de la Primera Fase Experimental	96
Figura 22	Tratamiento 15 (5uM ANA/ 25uM BAP) de la Primera Fase Experimental	96
Figura 23	Tratamiento 19 (10uM AIA/ 25uM BAP) de la Primera Fase Experimental	96
Figura 24	Célula Muerta sin colorante Azul de Evans	118
Figura 25	Célula Muerta donde penetra el colorante Azul de Evans	118
Figura 26	Célula Muerta con el colorante Azul de Evans	118
Figura 27	Células Vivas de Stevia rebaudiana B	118
Figura 28	Células de Stevia Rebaudiana donde se aprecian inclusiones dentro de la célula	119
Figura 29	Células de Stevia Rebaudiana donde se aprecian inclusiones dentro de la célula	119
Figura 30	Células de Stevia Rebaudiana donde se aprecian inclusiones dentro de la célula	119
Figura 31	Células esféricas muertas teñidas con el colorante Azul de Evans	120



RESUMEN

Con el objetivo de establecer suspensiones celulares de *Stevia rebaudiana* B, se inició la investigación a partir de hojas de plantas *in vitro*, posteriormente se indujo a la formación de callos en medio de cultivo MS. Los tratamientos fueron suplementados con 2,4-D, ANA y AIA combinados con BAP a diferentes concentraciones, realizando evaluaciones del porcentaje de formación de callo, la consistencia del mismo, el porcentaje de supervivencia y el peso. La combinación de 2,4-D (20 μ M) y BAP (50 μ M), alcanzó un 100% de formación de callo, altamente friables siendo útiles para el establecimiento de la suspensión celular; con peso promedio de 1.53g transcurridos los 84 días y una supervivencia de 73.33% a los 112 días. A partir de estos callos de 150 días de edad, se inicio la segunda fase experimental, donde se planteó tres tratamientos balaceándose principalmente en la mejor concentración hallada para la inducción a callo, con el fin de determinar la influencia en el crecimiento celular de los reguladores de crecimiento. Se combinó las metodologías propuestas por Choi *et al*, 1997, Gómez 1999 y Cioffi 2002, que permitieron el inicio y establecimiento de las suspensiones celulares. Para evaluar la suspensión celular se realizó la cuantificación de células por mililitro, porcentaje de vitalidad celular empleando el colorante azul de Evans, peso fresco, peso seco y pH. El conteo celular reveló que el tratamiento con 2,4-D (20 μ M) y BAP (50 μ M) comenzó a los 21 días con la mayor densidad de células por ml (5.8×10^5) y alcanzó el mayor número de células por ml (3.7×10^{11}) a los 44 días. Este tratamiento mostró un porcentaje de vitalidad de: 83.73%, 71.61% y 63.77% en las tres evaluaciones (días 1, 13 y 23 de la evaluación), respectivamente. El pH dio un comportamiento semejante con un promedio de 4.37 ± 0.36 . Esta evaluación se realizó día por medio durante 23 días continuos.



ABSTRACT

The goal of this job was to obtain cell suspensions of *Stevia rebaudiana* Bertoni, the research was initiated using plantlets leaves in vitro an callus formation was induced on MS (1962) medium. The treatments were supplemented with 2,4-D, NAA and IAA combined with BA at different concentrations. Percentage of callus formatted, callus consistency, percentage of callus survey and fresh weight were evaluated. About 100% of callus formation was reached with combination of 2,4-D (20uM) and BA (50uM). This combination was highly friable and useful for cell suspension establishment, with an average weight of 1.23 g after 84 days and survival of 73.33% after to 112 days. Beginning with these 150 – day old calli, the second stage was initiated. Based on the best concentration for callus induction, three treatments were proposed in order to treatments proposed by Choi et al. (1997), Gomez (1999) and Cioffi (2002) were useful here combining each other. It allowed the initiation and establishment of cell suspensions. In order to evaluate the cell suspension, cells number per milliliter, percentage of cell viability (using Evans Blue dye), fresh weight, dry weight and pH were evaluated. Cell counting revealed that the treatment with 2,4-D (20uM) and BA (50uM), started with the highest initial cell concentration per ml (5.8×10^5) and reached the highest number of cells per ml (3.7×10^{11}), with percentage survey of 83.73%, 71.61% and 63.77% on the third, thirteenth and twenty-third day, respectively, during the evaluation of the suspension cell. The pH values showed an average of 4.37 ± 0.36 during 23 continuous days.



CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. INTRODUCCIÓN.-

El empleo de productos naturales como alternativa a productos elaborados sintéticamente día a día va en aumento, tal es el caso de la especie *Stevia rebaudiana* B, arbusto de origen paraguayo que posee principalmente en sus hojas, glucosidos diterpenos conocidos comúnmente como steviosidos totales.

Sivaram y Mukundam (2003), indican que desde hace tiempo atrás es empleada como edulcorante natural de alta potencia, puesto que es aproximadamente 300 veces más dulce que el azúcar, es además, termoestable (factor muy importante para su extracción e industrialización), y es un compuesto inocuo para la salud porque no es asimilado por el organismo humano por lo que su uso no produce efectos colaterales.

Geunis (2003) indica que también posee otras características importantes para la salud ya que es hipoglisemiante porque reduce el azúcar en la sangre, no produce caries, es hipotensiva, no calórico y con actividad antimicrobiana para algunos microorganismos. Además recientes estudios indican que no afecta la biodisponibilidad de los nutrientes ni produce reacciones alérgicas.

Una planta tan útil para la salud humana como *Stevia rebaudiana* es objeto de innumerables estudios tanto a nivel agronómico, fitoquímico y biotecnológico con el fin de conocer sus cualidades y características esenciales.



A nivel agronómico se analizó su adaptabilidad a diferentes condiciones climáticas, densidades y épocas de siembra, requerimientos nutricionales, resistencia a plagas y enfermedades además de la optimización en la producción agrícola.

En el área de la fitoquímica se realizaron estudios para la detección, extracción, purificación y cuantificación del steviosido a partir de hojas como materia prima. Se estudiaron las propiedades químicas y físicas, biosíntesis y la producción del metabolito secundario en diferentes épocas y edades del cultivo, se verificó de la presencia de estos glucosidos en otras especies del mismo género, concluyendo que es la única planta del género que produce este edulcorante de alta potencia.

A nivel biotecnológico se logró la introducción *in vitro* de la planta para obtener plantas de la misma calidad genética productoras del edulcorante como alternativa a su difícil reproducción natural (via semilla) y multiplicación por esquejes debido a las limitaciones de estas prácticas agrícolas. También se realizaron estudios en la inducción a callo con el fin de regenerar plantas a partir de diferentes órganos de la planta, verificando, en la mayoría de los casos, la producción del edulcorante natural y estudios a nivel celular. Estos estudios, no se encuentran disponibles por las innumerables patentes que existen de los estudios realizados en el mundo.

En Bolivia, a nivel biotecnológico, se realizaron muy pocas investigaciones de la planta, se logró introducir la planta *in vitro*, multiplicación y enraizamiento de los explantes para su posterior introducción a campo. Por esta razón, se planteó la necesidad de ampliar estos conocimientos a partir de la tecnología e información disponible para lograr avances en esta área de investigación y así ampliar el horizonte en la investigación de *Stevia rebaudiana* Bertoni.



Bajo este concepto, en este trabajo de investigación se emplearon las técnicas del cultivo de callos y cultivo de células en suspensión de *Stevia rebaudiana* B. porque son más eficientes que la micropropagación *in vitro*, hasta ahora lograda en nuestro país. En la presente investigación se encontró el balance óptimo de reguladores de crecimiento para el inicio, establecimiento y mantenimiento de callos altamente friables que fueron adecuados para el inicio, establecimiento y crecimiento de la suspensión celular donde se logró un desarrollo celular óptimo.

El empleo de éstas técnicas permitirán realizar nuevos estudios aprovechando la totipotencia celular que abre las puertas para posteriores investigaciones en nuestro medio, como estudios sobre la detección y producción masiva del metabolito secundario en las células para aplicar estos conocimientos a la industria farmacéutica y alimenticia sin necesidad de requerir de la materia prima de campo habitualmente empleada.

Paralelamente se pueden iniciar estudios sobre embriogénesis somática, organogénesis y producción de semilla sintética de alta calidad, mejoramiento genético a través de técnicas moleculares lo que produjo plantas libres y resistentes a enfermedades y plagas que pueden ser introducidas a campo para constituirse en una alternativa rentable, mejorando los ingresos económicos de los productores agrícolas del país, por tratarse de una planta muy bien remunerada por Kilogramo de hoja seca, por sus altos rendimientos en suelos idóneos para el desarrollo normal.

Al mismo tiempo, se puede emplear esta planta como una alternativa a la producción de coca, por su manejo accesible y posibilidad de cosecha tres a cuatro veces por año, además contar con mercados abiertos para su exportación a países como Japón, Alemania, Estados Unidos, Corea, Argentina y Brasil entre otros.



Para la realización de este estudio se consideraron los siguientes objetivos e hipótesis:

1.2. OBJETIVOS.-

1.2.1. Objetivo General.-

Establecer el cultivo de células en suspensión de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

1.2.2. Objetivos Específicos.-

1. Determinar la (s) concentración (es) óptima (s) de regulador (es) de crecimiento para la inducción a callo a partir de hojas de plantas *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B.
2. Encontrar la combinación adecuada de los reguladores de crecimiento para la obtención de callos friables aptos para la formación de suspensiones celulares.
3. Determinar el Tipo de Auxina, Concentración de Auxina y/ó Concentración de BAP en la que presentan una mayor supervivencia de callos de *Stevia rebaudiana* B.
4. Determinar la concentración óptima de reguladores de crecimiento para el establecimiento de células en suspensión a partir de la mejor respuesta a la inducción y mantenimiento de callo de *Stevia rebaudiana* B.



1.3. HIPÓTESIS.-

Las hipótesis que se consideraron en la presente investigación fueron:

Ho: El efecto de las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento es igual para la inducción a callos a partir de hojas de *Stevia rebaudiana* B.

Ho: Todas las combinaciones de reguladores de crecimiento forman callos aptos para una suspensión celular.

Ho: La supervivencia de los callos obtenidos de *Stevia rebaudiana* B. no es afectada por la variación del Tipo de Auxina, Concentración de Auxina ni Concentración de BAP

Ho Las concentraciones de reguladores de crecimiento planteados a partir del mejor tratamiento de inducción a callo no presenta diferencias para establecer células en suspensión de *Stevia rebaudiana* B.



CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1. ASPECTOS GENERALES DE LA ESPECIE *Stevia rebaudiana* B.-

2.1.1. Origen e Importancia económica.-

La planta *Stevia rebaudiana* B, pertenece a la familia asteracea, es un arbusto perenne que crece hasta un metro de alto. Las hojas de Stevia son la fuente de glicosidos diterpenos, (steviosido y rebaudiosido), que, se estima, son de 100 a 300 veces más dulces que la sacarosa (Ishima y Katayama 1976; Tanaka 1982 citados por Sivaram y Mukundan 2003). La planta es originaria de la región norte de Sudamérica y crece silvestre en las alturas de Amambay y cerca del inicio del Rio Monday (área limite entre el Brasil y Paraguay). Actualmente, esta siendo cultivada en toda Sud América, Canadá, Hawai, California (Norte América), Taiwán Tailandia Corea y Malasia. Además de los países mencionados la Stevia también se cultiva en Israel, Ucrania, Reino Unido y Filipinas (Sivaram y Mukundan 2003).

2.1.2. Distribución en Bolivia.-

La capacidad de adaptación de la planta, le ha permitido desarrollarse en las regiones tropicales y subtropicales del país. La mayor distribución de *Stevia rebaudiana* B. se encuentra en los departamentos de La Paz y Santa Cruz y en menor proporción en Cochabamba, Tarija y Beni. En el departamento de La Paz existen plantaciones de Stevia en Irupana, Chulumani, Las Lomas, La Plazuela, Coripata, Coroico, Caranavi, Sapecho y Palos Blancos. En el departamento de Santa Cruz, se puede encontrar plantaciones de Stevia en Yapacaní y la Colonia Okinawa 2.



En Cochabamba se realizaron trabajos experimentales para observar su comportamiento en las localidades de Mayor Jordán e Ishinuta, Urkupiña, Avaroa, Santa Ana y Santa Rosa, donde se obtuvieron resultados favorables, sin embargo estos resultados no se pueden generalizar especialmente para la región del Chapare por sus peculiares características climáticas (Sumida 1997 y Montaña 1999).

2.1.3. Clasificación Taxonómica.-

La clasificación taxonómica se resume en el siguiente cuadro:

Cuadro Nº 1: Clasificación Taxonómica de *Stevia rebaudiana* Bertoni

Reino:	Vegetal
Subreino:	Embryobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Asterales
Familia:	Asteraceae
Tribu:	Eupatorieae
Genero:	Stevia
Especie:	<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni
Nombre Vulgar:	Steva, Ka'a He'e y otros

*Fuente: Cronquis 1981

2.1.4. Propagación de *Stevia rebaudiana* B.-

Para la propagación de *Stevia*, se emplean semillas y propagación vegetativa en forma tradicional. Las semillas, muestran un muy bajo porcentaje de germinación, además que no permiten la producción de poblaciones homogéneas resultando en una gran variabilidad de importantes factores como niveles de edulcorante y composición. Por otro lado, la propagación vegetativa también es limitada por el bajo número de individuos que pueden ser obtenidos simultáneamente de una sola planta. Por estas dificultades, el cultivo de tejidos es la única alternativa para



la rápida propagación en masa de plantas, de la misma calidad genética y productiva (Sivaram y Mukundan 2003).

2.1.5. El poder edulcorante natural de los componentes naturales de la *Stevia rebaudiana* B.-

El principio activo encontrado en *Stevia rebaudiana* B. se denomina Steviosido, el cual, es 300 veces más dulce que el azúcar y se encuentra presente en un 10% de la hoja, además las hojas contienen otros componentes edulcorantes como el Rebaudiosido A, C, D y E en un 3 a 4%, Dulcoside A y B, Isoesteviol y Steviolblycosides en proporciones menores al 1%. A este conjunto de edulcorantes con fines prácticos se los agrupó con el nombre de Steviosidos totales (Molinas 1989).

2.1.6. Usos.-

El uso de *Stevia rebaudiana* B. se remonta hace muchos siglos atrás, ya que fue empleada por los indígenas Guaraníes en Sud América, éstos, la emplearon para preparar medicinas tradicionales y endulzar sus alimentos. A partir del redescubrimiento a principios del siglo XX, se hicieron innumerables investigaciones sobre las cualidades y aplicaciones de esta planta y probar principalmente su inocuidad para la salud humana (Molinas 1989).

Dentro de la industria se la emplea el extracto de *Stevia* conocido como steviosido total para la elaboración de productos bajos en calorías como gaseosas, alimentos, bebidas, medicamentos entre otros; destinados principalmente a personas diabéticas debido a su efecto hipoglycemiante al reducir el nivel de azúcar en la sangre. Además, se emplea para la elaboración de goma de mascar y pastas dentales debido a que sus compuestos no inducen a la formación de caries dental. (Melillo s.f., Molinas 1989, Montañó 1999, Sivaram y Mukundam 2003). Por otra parte, Gupta 1995 citado por Melillo s.f. indica que aparte de sus



propiedades edulcorantes son hipotensivas, antimicrobianas contra *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* y anticonceptivas.

2.1.7. Estudios agronómicos realizados en el mundo.-

Brandle *et al.* (2001), con su equipo de investigadores realizó la selección de plantas *in vitro* que se adaptan mejor a las condiciones climáticas de Canadá y estudios sobre resistencia a la enfermedad provocada por *Septoria*. Los estudios también mencionan que el agente que promovió el desarrollo del dulzor en la planta fue un como mecanismo de defensa contra ciertos insectos para poder repelerlos. Además, se realizaron estudios sobre fertilidad de suelo y la densidad de siembra para que la planta pueda desarrollarse mejor en Canadá.

2.1.8. Estudios agronómicos realizados en Bolivia.-

Pinaya (1996), estudió el efecto de la densidad de siembra en el rendimiento del steviosido durante un año de evaluación concluyendo que la mejor densidad de siembra es de 100000 plantas por hectárea con un rendimiento de 4.9g/ m² y 7.8g/m² en peso seco del steviosido en la segunda y tercera cosecha, respectivamente.

Paja (2000), evaluó diferentes niveles de fertilizante orgánico concluyendo que un nivel de 45000kg/ha de estiércol bovino influye en el crecimiento de la planta, con mayor número de hojas y tallos debido al incremento de nitrógeno y potasio en el suelo, lo que favoreció al crecimiento de las plantas. Además que el abono, influyó en el incremento del peso seco del Steviosido (7.4 g/m²).



Apaza (2003), realizó la fertilización química nitrogenada del suelo a un nivel de 60 kg/ha. Esta fertilización permitió el incremento del peso seco de las hojas de *Stevia* a (2329 kg/ha/ Año).

2.1.9. Estudios fitoquímicos del Género *Stevia*.

Kinghorn *et al.* (1984), trabajó con 110 especies del género *Stevia* para detectar la presencia de los glucósidos del esteviol en *Stevia rebaudiana* B. empleando técnicas de HPLC y TLC contrastadas con pruebas organolépticas donde solamente se encontraron esteviol en *Stevia Phlebophylla* en cantidades traza. De esta forma se demostró, que dentro de la gran variedad de especies existentes en el del género *Stevia*, sólo *Stevia rebaudiana* B. es la única capaz de producir un edulcorante natural, de alta calidad y de fácil extracción para su industrialización.

Yamazaki *et al.* (1991), investigó la presencia de los glucósidos del esteviol en plantas *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B., así como en callos formados a partir de raíces. El estudio permitió detectar la presencia de los glucósidos en las plantas y no así en los callos por lo que se concluyó que la citocinina BAP, que produjo los callos, no intervino en la síntesis del esteviol.

Caballero (2000), realizó la extracción, purificación y caracterización del esteviosido a partir de plantas en plena producción agrícola.

Brandle *et al.* (2001), realizó una investigación donde encontró que la biosíntesis de los glucosidos diterpenos ocurre generalmente en los plastos de las células vegetales y estableció la estructura química de los glucósidos edulcorantes diterpenos.

Venek *et al.* (2001), realizó la extracción del esteviosido de té de frutas, empleando dos diferentes solventes (metanol y agua destilada) obteniendo



resultados semejantes demostrando la eficiencia del agua en la extracción del esteviosido.

Starratt *et al.* (2002), aisló el glucosido diterpenoide dulce (regaudiosido F) de las hojas productoras del rebaudiosido C de *Stevia rebaudiana* B. y estableció su estructura química para estudios químicos y espectrales.

Silva *et al.* (1997) y Geuns (2003) indican que los compuestos derivados de la planta (esteviosidos) no tienen ningún efecto anticonceptivo ni mutagénico por lo que refutan los resultados obtenidos en anteriores trabajos de investigación y la creencia de los indigenes paraguayos sobre este tema.

2.2. ASPECTOS GENERALES SOBRE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL.-

2.2.1. Cultivo de Tejidos.-

El cultivo de tejidos es un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal desarrollado en condiciones naturales) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. Después de colocar el explante en un medio rico en nutrientes y reguladores de crecimiento se puede obtener cuatro respuestas: a) Sin respuesta, b) Cultivo Infectado, c) Callo más regeneración indirecta y d) Regeneración directa (Roca y Mrongnski 1989). La necesidad de reguladores de crecimiento para el establecimiento de algún explante depende del tipo de explante y la especie en estudio (Bu'Lock 1990).



2.2.2. Medio de Cultivo.-

Los logros obtenidos hasta el día de hoy en el cultivo de tejidos vegetales se debe a un amplio conocimiento de los requerimientos nutricionales en el cultivo de células y tejidos. El medio de cultivo permite que, de forma artificial y bajo condiciones estériles, puedan vivir y multiplicarse células, tejidos y órganos separados del tejido que les dio origen. Por esta razón, el empleo de un medio de cultivo adecuado en cada especie es fundamental para el éxito en las investigaciones referentes a la planta (Roca y Mrognski 1989 y Gómez 1999).

Los componentes del medio de cultivo pueden clasificarse en: Sales inorgánicas (Mezclas de sales), Compuestos orgánicos, Complejos nutricionales y Material de soporte (Roca y Mrognski 1989, Hurtado y Merino 1991, Gómez 1999 y Cioffi 2002).

2.2.2.1. Sales Inorgánicas.-

Los nutrientes inorgánicos utilizados en el cultivo *in vitro* son los mismos requeridos normalmente por las plantas. Estos nutrientes, se encuentran divididos en dos grupos, los macronutrientes y los micronutrientes. Los macronutrientes, son aquellos que son requeridos en mayores concentraciones como: Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Calcio, Azufre y Magnesio. Los micronutrientes, se requieren en menores cantidades, estos son: Hierro, Manganeso, Zinc, Boro, Cobre, Molibdeno, Cobalto y Yodo. La carencia o la disminución excesiva de cualquiera de estas sustancias inorgánicas puede provocar efectos contrarios en el desarrollo y crecimiento de los explantes por lo que se hace necesario un balance óptimo de estos nutrientes para el desarrollo adecuado de la planta en estudio.



La formulación de varias mezclas salinas fue realizada por innumerables investigadores a partir de las cuales, las sales Murashigue- Skoog (MS 1962), son las más empleadas (Roca y Mrognski 1989, Hurtado y Merino 1991, Gómez 1999 y Cioffi 2002).

2.2.2.2. Compuestos Orgánicos.-

Los componentes orgánicos están clasificados en cuatro grupos: carbohidratos o fuente de energía, sustancias hormonales, vitaminas y aminoácidos.

2.2.2.2.1. Carbohidratos.-

Se utiliza como fuente de carbono normalmente a la sacarosa o sucrosa la cual es ampliamente utilizada en la mayoría de los medios de cultivo. También se puede emplear azúcar refinada en reemplazo de la sacarosa ó sucrosa en concentraciones de 20 a 80 g/l (Roca y Mrognski 1989, Hurtado y Merino 1991, Gómez 1999 y Cioffi 2002).

2.2.2.2.2. Reguladores de Crecimiento.-

Se define a los reguladores de crecimiento, como un conjunto de sustancias químicas diferentes a los nutrientes, que promueven, modifican o inhiben la totalidad ó la mayoría de las actividades fisiológicas de las plantas jugando un papel preponderante en el control del crecimiento a nivel de órgano, tejido y célula (Mejía y Vittorelli 1988, Ramírez 1989, Hurtado y Merino 1991 y Agusti *et al.* 1991).

Los reguladores de Crecimiento pueden ser producidos naturalmente ó sintéticamente son ampliamente usados para la formación y proliferación de callos, dentro de éstos, existen los promotores de crecimiento siendo los más



destacados y ampliamente usados, las auxinas y citocininas citadas a continuación (Pollard 1990, Bu'Lock 1990 y Hurtado y Merino 1991).

2.2.2.2.1. Auxinas.-

Las auxinas participan en la formación de brotes y raíces, en la respiración que está correlacionada con el crecimiento, abscisión, partenocarpia, dominancia apical, embriogénesis etc. También estimulan el crecimiento y formación de tejidos callosos y suspensiones celulares a bajas concentraciones; teniendo un efecto contrario a elevadas concentraciones (Mejia y Vittorelli 1988 y Ramírez 1989).

A nivel celular las auxinas provocan la acidificación de la membrana celular, el reblandecimiento de la pared celular: incrementan la concentración osmótica derivando en un agrandamiento, alargamiento hasta la división celular (Ramírez 1989 y Agusti *et al.* 1991). Es necesaria su aplicación para la mayoría de las especies en el cultivo de células y callos y en menor concentración para mantener su crecimiento, pues en ausencia de citocininas la auxina provoca el alargamiento celular en los tejidos cultivados. Sin embargo, la presencia de citocininas permite obtener una división mediada citocinínicamente (Roca & Mrongnski 1989 y Hurtado y Merino 1991).

Las auxinas se encuentran presentes en las yemas, ápices de crecimiento, hojas y raíces teniendo un movimiento basipétalo (Ramírez 1989). Existen diferentes tipos de auxinas como el 2,4-D, ANA y AIA con diferentes acciones las cuales se mencionan a continuación.



a) 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid):

La auxina 2,4-D, es ampliamente utilizada para la inducción y proliferación de tejidos tipo callo reportado por innumerables trabajos de investigación y a elevadas concentraciones suprime la morfogénesis. Si actúa independientemente promueve la formación de callos friables que en algunos casos son embriogénicos (Frischknecht y Baumann 1985, Mejia y Vittorelli 1988, Ushiyama *et al.* 1989, Ushiyama y Furuya 1989, Bu'Lock 1990, Hurtado y Merino 1991, Choi *et al.* 1997 y Etienne y Bertrand 2001).

A nivel celular, el 2,4-D se sintetiza y se acumula más tiempo en las células por lo que tiene un periodo activo relativamente más largo al aplicarlas exógenamente, además se pueden acumular hasta el punto de ser toxinas. (Hurtado y Merino 1991). También tiene influencia sobre la formación de los grupos de células embriogénicas o embriones somáticos en estado globular impidiendo que estos maduren, además, influyen en la morfología de las células embriogénicas (Gómez 1999). La concentración de 2,4-D va 0.001 a 10 mg/l siendo el punto óptimo al rededor de 1 a 5 mg/l (Roca y Mrongnski 1989 y Bu'Lock 1990).

Los investigadores Sivaram y Mukundan (2003), reportaron que los principios activos, no se pudieron detectar en callos regenerados sobre medio con la auxina 2,4-D debido a que es la menos adecuada para activar el metabolismo secundario en cultivo de células vegetales.

b) ANA (1-Naphthaleneacetic acid):

La auxina ANA, es una de las mas empleadas para el cultivo de tejidos (Mejia y Vittorelli 1988), siendo ésta de potencia media. Normalmente se utiliza ANA en concentraciones que van de 0.001 a 10mg/l siendo el punto óptimo de 2mg/l (Roca y Mrongnski 1989 y Bu'Lock 1990).



c) AIA (Indole-3-acetic Acid):

La auxina AIA, aumenta significativamente la elongación de segmentos aislados de raíces tanto *in vitro* como *in vivo*, además de incrementar su crecimiento. Es producida endogenamente y se acumula en pequeñas cantidades debido a que existen procesos fisiológicos de inactivación y destrucción de éstas (Bu'Lock 1990 y Hurtado y Merino 1991).

La auxina AIA, esta considerada como una de las auxinas más débiles y se inactiva con la luz (Mejia y Vittorelli 1988). Normalmente se usa en concentraciones de 0.001 a 10 mg/l y como punto óptimo de 0.1 a 1 mg/l (Roca y Mrongnski 1989 y Bu'Lock 1990).

2.2.2.2.2. Citocininas.-

Las citocininas, inducen a la terminación del reposo y actúan en el retraso de la senescencia, en bajas concentraciones (5×10^{-8} M), motivan el crecimiento y son promotoras de la formación de raíces, debido a su control en el desarrollo del sistema vascular. Sin embargo, a elevadas concentraciones inhiben el crecimiento de raíces.

También tienen un papel fundamental en la organogénesis porque a partir de callos, hojas y raíces se pueden obtener yemas, cotiledones o piezas de tallos. Se localizan endogenamente, principalmente donde hay meristemos o tejidos con crecimiento activo (Mejia y Vittorelli 1988, Ramírez 1989 Bu'Lock 1990 y Hurtado y Merino 1991). A nivel celular estimulan el agrandamiento y división celular en concentraciones tan bajas como 5×10^{-11} M (Ramírez 1989 y Hurtado y Merino 1991).



Las citocininas ampliamente usadas son: BAP, ZEA y KIN. La citocinina **BAP** (6-Benzylaminopurine), es muy activa y ampliamente usada siendo de origen sintético. Las investigaciones realizadas por Roca y Mrongnski (1989), develaron que BAP es activa independiente ó actúa sinérgicamente con las auxinas en cambio ZEA y KIN no presentan actividad solas sino con la presencia de AIA. Según Mateo (1988), citado por Cuellar (1996), BAP normalmente inhibe la formación de raíces a concentraciones altas, mientras que promueve la formación de brotes. Estudios realizados por Cuellar (1996), demostraron que un incremento de BAP de 20 μ M a 50 μ M provocó un aumento en el número de brotes en bananos *in vitro* de 2 años de edad, mientras que una concertación de 100 μ M no produjo ningún resultado significativo.

Por otro lado, en la investigación realizada por Siverman y Mukundan (2003), se probó una mayor efectividad de BAP en relación a KIN para la regeneración de brotes a partir de diferentes explantes de *Stevia rebaudiana* B. Asimismo reportes previos citados en esta investigación indican que BAP ayuda en la biosíntesis de metabolitos tales como Ribotidos, Ribisidos y Ribosido glucosido. Los callos cultivados en medio MS solidificado con agar y suplementado con BAP 8.87 μ M y AIB 9.8 μ M, mostraron el más alto contenido de edulcorante frente a las demás combinaciones de reguladores de crecimiento.

2.2.2.2.3. Combinación de Auxinas y Citocininas.-

La combinación de las auxinas y las citocininas provocan diferentes efectos en el cultivo de tejidos, siendo este balance muy importante en la regulación del crecimiento por su participación en el alargamiento y división celular respectivamente.

Las citocininas incrementan la división celular cuando están presentes las auxinas, por ejemplo, las citocininas combinadas con la auxina AIA estimulan el crecimiento



de yemas. Una concentración mayor de citocininas que auxinas provoca la formación de brotes, mientras que, una concentración mayor de auxinas que citocininas induce a una formación de primordios radiculares. Sin embargo, un exceso de auxinas puede suprimir la división celular y aún el crecimiento celular (Mejia y Vittorelli 1988 y Hurtado y Merino 1991).

Skoog y Miller (1957), citado por Hurtado y Merino (1991), realizaron una investigación en callos de tabaco donde adicionaron por separado diferentes concentraciones de auxinas y citocininas, al combinarlas, obtuvieron un incremento notorio de la masa celular, mientras que por separado no crecieron, por lo que se demostró la existencia de una acción sinérgica entre estos dos reguladores de crecimiento.

Esta acción conjunta de ambos reguladores de crecimiento se debe a que la auxina duplica el ADN y actúa en la mitosis (anafase y metafase) en cambio la citocinina promueve la división del citoplasma para formar células hijas (citocinesis). Por lo tanto el equilibrio entre ambos reguladores de crecimiento es fundamental para el éxito en los trabajos de investigación. (Gómez 1999).

2.2.2.2.3. Vitaminas.

La tiamina, es una de las vitaminas esenciales para el crecimiento y multiplicación de plantas. Por otro lado, el ácido nicotínico y la pirodoxina mejoran el crecimiento celular. En los diferentes estudios, también se emplean otras vitaminas que dependen del requerimiento estricto de la especie o de los fines de cada investigación (Roca y Mrognski 1989, Hurtado y Merino 1991, Gómez 1999 y Cioffi 2002).



2.2.2.2.4. Aminoácidos y Amidas.-

Son empleados comúnmente como fuentes de nitrógeno orgánico en los medios de cultivo. Sin embargo a veces pueden no ser necesarios, pero si beneficiosos al incluirlos en el medio de cultivo. Existen otros componentes que se emplean para preparar medios de cultivo siendo específicos para cada tipo de investigación que se realice.

En el caso de *Stevia rebaudiana* B. se recomienda el uso de sales inorgánicas, la fuente de carbono y vitaminas del medio de cultivo MS (1962), en un 100% (Marcovillica 1989, Flachslund y Lambart 1989, Akita *et al.* 1994, Rivadeneria y Morales 1999 y Botidarev *et al.* 2003 Sivaram y Mukundam 2003).

2.2.3. Establecimiento y multiplicación de plantas *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B.-

Marcovillica (1989), realizó la micropropagación *in vitro* a partir de segmentos nodales de *Stevia rebaudiana* B, en el medio de cultivo MS al 50% y suplementado con 0.1, 1, 2 y 5 mg/l de BAP y 0.1 1 2 5 mg/l de ANA.

Flachslund (1989), evaluó la regeneración de plantas de *Stevia rebaudiana* B. a partir del cultivo in-vitro de laminas foliares. Como resultado de esta investigación a los 60 días sobre las porciones de las hojas se formaron yemas en medio MS y la combinación de ANA y BAP (0.05mg/l y 1 mg/l, respectivamente). Estas yemas fueron subcultivadas en idénticas condiciones.

Akita *et al.* (1994), realizó la propagación en masa de brotes de *Stevia rebaudiana* B. empleando biorreactores a gran escala obteniendo brotes múltiples que fueron fácilmente aclimatados a campo.



Brandle *et al.* (2001), junto a sus colaboradores, realizaron estudios para determinar si existía la variabilidad genética de las plantas que podían presentar características ideales en diferentes campos de aplicación como en el área de la agricultura y la química logrando una mayor concentración de glucósidos diterpenos en las hojas.

Botidarev *et al.* (2003), determinó que la variación de reguladores de crecimiento, composición de los nutrientes y fuente de carbono del medio de cultivo influyen en la presencia de los Glicósidos Esteviol Diterpenoides, demostrando que un incremento de sucrosa en el medio promueve un aumento del contenido de estos glucósidos. También demostraron que la presencia de los reguladores de crecimiento promueven cambios morfológicos de los explantes.

Sivaram y Mukundan (2003), realizaron diferentes estudios con explantes de *Stevia rebaudiana*, trabajaron a partir de segmentos nodales, hojas y ápices, y a partir de éstos explantes regeneraron brotes en medio de cultivo MS suplementado con 8.87 μM de BAP y 5.71 μM de AIA. También demostraron que a partir de un explante nodal se puede obtener 36000 plantas con un 75 % de supervivencia en el invernadero. Por otro lado, estudiaron la presencia de los glicosidos diterpenos dulces, (steviosido y rebaudiosido), que fue confirmada en los tejidos derivados *in vitro* utilizando técnicas HPTLC.

2.2.4. Estudios biotecnológicos realizados en Bolivia.-

Ribadeneira y Morales (1999), establecieron y propagaron plantas *in vitro* de *Stevia* a partir de segmentos nodales, libres de patógenos en medio MS (1962) al 100% semisólido y con posterior introducción a campo.



2.2.5. Inicio y establecimiento de callos.-

El callo es un crecimiento desorganizado de células obtenido a partir de un determinado tejido organizado. El proceso comienza con el aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, expuestos a una auxina y/o citocinina donde se observan cambios en la morfología y en la actividad metabólica. En las células se observa una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, dando origen a una masa amorfa de tejidos.

Es importante destacar que la característica fundamental de los callos es su totipotencia, ya que si se hace un manejo adecuado de los callos, éstos pueden derivar en embriones, brotes o raíces lo que depende principalmente del balance de auxinas y citocininas (Mgkiones 1992, Ponce *et al.* 1998).

2.2.5.1. Formación de Callo.-

El callo se forma a partir de cualquier tejido (hojas, raíces, polen y otros), y se obtiene por medio del aislamiento de órganos y tejidos diferenciados, en pequeñas cantidades (0.5 a 1 cm por lado), con lesiones para facilitar el ingreso de los reguladores de crecimiento (normalmente son auxinas como 2,4-D, AIA , ANA y AIB y/o citocininas KIN, BAP y ZEA en concentraciones que oscilan entre 0.1 y 10 mg/l), que provocan una división celular en la zona de corte y posteriormente una desdiferenciación celular con una proliferación continua y acelerada dando origen después de 3 a 8 semanas a una masa amorfa de tejido denominada callo. (Roca y Mrongnski 1989 y Hurtado y Merino 1991).



Sin embargo, la formación del callo se debe a las respuestas cualitativas y cuantitativas con sinergismo estrecho, que tiene que ver con el origen del tejido usado para la primera inducción, la composición del medio y las condiciones físicas que prevalecen durante esta etapa (Dodds y Roberts 1982 citado por Hurtado y Merino 1991, Mgekiones 1992 y Ponce *et al.* 1998).

Marcovillica 1989, obtuvo una gran proliferación de callo en medio de cultivo MS suplementado con de 5 mg/l de BAP y 1mg/l de 2,4-D, derivando estos callos en brotes a los 60 días de inducción a callo.

Por otro lado, Sivaram y Mukundan (2003), obtuvieron una gran formación de callos con diferentes reguladores de crecimiento. Entre ellos, obtuvieron callos que dieron un contenido de glucósido 5.8%, siendo este valor mayor que el contenido de glucósido en hojas *in vitro*, en medio MS suplementado con BA 8.87 μ M y AIB 9.8 μ M por lo que concluyeron que los tejidos de callos desorganizados son una fuente potencial de los compuestos edulcorantes de *Stevia rebaudiana* B.

2.2.5.2. Subcultivo de Callos.-

El proceso de formación de callo y crecimiento, ocurre gracias a un crecimiento y multiplicación celular intenso, este proceso, provoca el gasto de los nutrientes del medio. El medio sólido se deshidrata por el efecto de la transpiración, porque los metabolitos de desechos celular pueden ser tan elevados que se vuelven tóxicos para el cultivo. Es por esto, que se hace necesario el mantenimiento de los callos, a través de la transferencia con cierta frecuencia (cada 2 a 6 semanas); a un medio fresco que generalmente es de la misma composición con el fin de que éstos se encuentren en condiciones adecuadas para su continuo crecimiento. La falta de transferencia lleva inevitablemente al debilitamiento, intoxicación y muerte del tejido (Hurtado y Merino 1991 y Ponce *et al.* 1998).



2.2.5.3. Porcentaje de Formación de Callo.-

Según Mgekiones (1992), se puede reconocer un aspecto cristalino de la superficie de corte después de unas 2 a 3 semanas después de 4 a 8 semanas es posible que se haya desarrollado el suficiente callo como para poder transferirlo a un medio fresco y establecer el cultivo.

También se observa la apariencia del callo que varía en la textura, consistencia (callos friables con gran cantidad de espacios intracelulares o compactos con células íntimamente unidas) y color que está relacionado íntimamente con las condiciones ambientales y nutricionales dando origen a callos, que en algunos casos carecen de pigmentación y otros son de color amarillo, marrón, verde, rojo ó café (Mgekiones 1992 y Ponce *et al.* 1998).

Una vez formado el callo, éstos pueden derivar en morfogénesis desarrollando raíces o brotes, dependiendo del balance hormonal del medio de cultivo o continuar proliferando una masa amorfa de células (Hurtado y Merino 1991).

2.2.5.4. Tipo de Callos y su Importancia.-

La consistencia del callo varía según el efecto de los reguladores de crecimiento y el medio de cultivo en el explante. Normalmente se desarrollan callos de consistencia compacta y callos de consistencia friable. Los callos compactos son masas celulares compactas y duras, con células íntimamente unidas con una proporción mayor de pectina y hemicelulosa en su pared celular, mientras que los callos friables forman tejidos esponjosos con una gran cantidad de espacios intercelulares donde las células están asociadas unas a otras de manera relativamente laxa (Hurtado y Merino 1991, Mgekiones 1992 y Gómez 1999).



La importancia de obtener callos friables consiste en facilitar el establecimiento de las suspensiones celulares debido a que estos callos se dispersan pronto y forman rápidamente un cultivo en suspensión (Roca y Mrongnski 1989, Hurtado y Merino 1991, Mgekiones 1992, Ponce *et al.* 1998 y Gómez 1999).

2.2.5.5. Supervivencia del callo.-

La supervivencia del callo se basa en determinar el estado fisiológico de los callos, por lo que es importante detallar las tres etapas del cultivo de callos que están claramente definidas. La primera etapa, la inducción del callo, donde se forma y se da origen a un tejido desorganizado y desdiferenciado comenzando su crecimiento. La segunda etapa consiste en la proliferación del tejido calloso que alcanza su máximo crecimiento. Finalmente, la tercera etapa es el envejecimiento y pérdida de capacidad de crecimiento acelerado con claros indicios de necrosamiento y oxidación del explante debido a una degradación vía enzimática formando AIA – oxidasa que se activa con la edad del cultivo (Hurtado y Merino 1991).

Roca y Mrongnski (1989), utilizaron la supervivencia de los callos como una variable de respuesta para evaluar el crecimiento de callos de *Stylosanthes guianensis* sometidos a diferentes agentes gelificantes. Los resultados de esta investigación son útiles para la evaluación de los callos durante su desarrollo.

2.2.5.6. Peso

La variable de respuesta “peso” refleja el crecimiento del callo a través del tiempo y éste a su vez expresa el incremento de la masa celular que depende del balance auxinas - citocininas puesto que estos compuestos controlan las funciones básicas de crecimiento y desarrollo de los tejidos (Mejia y Vittorelli 1988, Roca y Mrongnski



1989, Ramírez 1989, Bu'lock 1990, Hurtado y Merino 1991 y Ponce *et al.* 1998). Esta variable de respuesta fue también empleada por Roca y Mrongnski (1989), quienes midieron el crecimiento de callos de *Stylosanthes guianensis* a través de peso tomado cada 30 días y Cuba *et al.* (1996) que midió el peso del callo de *Coffea canephora*.

2.2.5.7. Trabajos de Investigación en callos de *Stevia rebaudiana* B.

Marcovillica (1989), Realizó trabajos de investigación en *Stevia rebaudiana* B. donde empleó el medio de cultivo MS al 100% suplementado con 5mg/l de BAP y 2,4.-D de 0.5 a 5 mg/l. La combinación de BAP con 5mg y 1mg/l de 2,4-D, permitió la formación abundante de callo, además a los 60 días se vieron los primeros primordios de yemas.

En un trabajo anterior, realizado por Yamazaki *et al.* (1991), se obtuvo callos a partir de raíces en un medio MS al 100% suplementado con diferentes concentraciones de BAP, el mejor resultado se obtuvo con concentraciones de 25 μ M y 50 μ M; las concentraciones menores no formaron callos pero si incrementaron el número de raíces, mientras que concentraciones mayores no dieron buenos resultados en la formación de callo.

2.2.6. Cultivo de Células en Suspensión.-

El cultivo de células en suspensión consiste en un conjunto de células asiladas así como de agregados celulares distribuidos en un medio de cultivo líquido en constante movimiento que facilita el intercambio de nutrientes, siendo esta una de las formas para mantener y propagar las células vegetales.

Esta técnica de cultivo tiene grandes ventajas frente a otras técnicas del cultivo de tejidos, porque es un poderoso implemento para llevar a cabo estudios sobre la



inducción de la embriogénesis somática, crecimiento y diferenciación, organogénesis, ciclo celular, procesos fisiológicos, citológicos, genética, transformación genética, nutrición, bioquímica, y metabolismo así como la obtención de diversos productos secundarios sin requerir de la planta.

Esta técnica, también es empleada para el mejoramiento genético, otorgando mayores posibilidades a las células mutadas para expresarse y formar, por consiguiente, plantas mejoradas. Además, posibilita seleccionar líneas celulares de alta calidad y su posterior conservación (Mgkjones 1992, Gómez 1999, López 2000, Aguado *et al.* 2001 y Cioffi 2002).

2.2.6.1. Inicio Establecimiento y Crecimiento de la Suspensión Celular.-

El inicio y establecimiento de una suspensión celular, se realiza a partir de callos friables debido a que éstos son capaces de desprender fácilmente las células al medio líquido en constante movimiento. El callo al pasar por un periodo de adaptación al medio de cultivo, se desagrega producto de la acción del movimiento del medio líquido que va liberando células constantemente.

Este periodo de desagregación, que abarca de 15 a 35 días, depende de la especie, del medio de cultivo y la cantidad del callo. Una vez pasado este periodo se establece una suspensión celular compuesta por células aisladas, agregados celulares de diferentes tamaños, fragmentos residuales del inóculo y reminiscencias de células muertas (Pollard 1990, Hurtado y Merino 1991, Montes *et al.* 1995, Cuba *et al.* 1996, Gómez 1999 y Cioffi 2002).



2.2.6.2. Condiciones de Cultivo.-

2.2.6.2.1. Medio de Cultivo.-

Según Cioffi (2002), se recomienda emplear el mismo medio de cultivo que se empleó para el establecimiento y el cultivo de callos. Sin embargo Roca y Mrongnski (1989), indican que el medio de cultivo para la inducción y crecimiento de callo puede ser diferente que el que se emplea para el establecimiento celular. puesto que pueden variar el nivel óptimo de auxinas y citocininas, suplementos orgánicos, aminoácidos y otros.

En numerosos trabajos de investigación se recomienda el uso de reguladores de crecimiento, principalmente 2,4-D, para el establecimiento y crecimiento celular, a diferentes concentraciones respecto al inicio y establecimiento de callos que dependen del enfoque que tenga la investigación y los objetivos que se persigan. (Frischknecht y Baumann 1985, Ushiyama y Furuya 1989, Ushiyama *et al.* 1989, Montes *et al.* 1995, Cuba *et al.* 1996, Choi *et al.* 1997 y Etienne y Bertrand 2001).

Los estudios, también recomiendan el uso del medio de cultivo MS (1962) por su efectividad en el establecimiento de suspensiones celulares (Cuba *et al.* 1996 y Choi *et al.* 1997). Según Seal (2001), los cultivos celulares de *Arachis hypogea*, necesitan auxina exógena para el crecimiento celular, porque permite una mayor resistencia a la pérdida de agua que es un factor de estrés para la célula.

2.2.6.2.2. Densidad óptima de inóculo inicial.-

El tamaño de inóculo varía de acuerdo al tipo de especie en estudio, Hurtado y Merino (1991), Montes *et al.* 1995 y Gómez (1999), recomiendan una cantidad de 100 a 750 mg de callo en 25 a 30 ml de líquido en un frasco Erlenmeyer de capacidad de 100ml, mientras que Cioffi (2002) recomienda una cantidad



constante de 3 g de callo en 50 ml de medio de cultivo en un frasco Erlenmeyer de 250 ml de capacidad.

Por otro lado, la densidad de inóculo inicial influye directamente en el establecimiento de la suspensión celular, cantidades muy pequeñas pueden derivar en una baja densidad celular que pueden detener el crecimiento de las células. Por el contrario, una excesiva densidad inicial de inóculo puede disminuir el crecimiento celular por la acumulación en el medio de sustancias inhibitoras excretadas por los tejidos (Montes *et al.* 1995 y Gómez, 1999).

2.2.6.2.3. Plataformas Rotatorias.

Se emplean plataformas rotatorias para facilitar la dispersión de las células, el intercambio de gases y el mantenimiento de las células vivas. Se recomienda emplear velocidades de agitación que oscilan entre 60 y 150 rpm, puesto que a velocidades mayores a éstas perjudican el crecimiento celular hasta el punto de inhibirlo (Hurtado y Merino 1991 y Gómez 1999).

2.2.6.2.4. Fotoperiodo.

El cultivo celular puede mantenerse a un fotoperiodo de 16/8 hrs. Luz/ Oscuridad ó en completa oscuridad, este factor dependerá de la especie y fines de la investigación (Choi *et al.* 1997, Gómez 1999, López 2000 y Cioffi 2002).

2.2.6.2.5. Temperatura.

López (2000) y Cioffi (2002), recomiendan mantener las suspensiones celulares a una temperatura de $27 \pm 2^{\circ}$ C.



2.2.6.3. Subcultivo de la Suspensión Celular.-

Es necesario realizar un cambio de medio de cultivo para desechar los residuos de callos y agregados grandes de células que empiezan a colmar la suspensión de células no embriogénicas las cuales son indeseables y entorpecen el desarrollo de la suspensión celular.

Posteriormente, se determina el momento del cambio de cultivo a través de la evaluación del crecimiento celular a través del tiempo (Gómez 1999). En trabajos realizados por Hurtado y Merino (1991), Feria *et al.* (2000), López *et al.* (2000) y Cioffi (2002) recomiendan que el cambio de cultivo se efectúe cada 7 días porque la mayoría de las especies tienen un crecimiento celular de 21 días que abarcan todas las fases de crecimiento celular. Así, el día 7 se constituye en el momento adecuado para la transferencia de las células a un medio fresco.

2.2.7. Crecimiento Celular.-

El crecimiento celular tiene un comportamiento normalmente sigmoidal pasando por las siguientes fases:

- a) Fase de Reposo o Latente: En esta fase, no existe división celular, las células se adaptan a sus nuevas condiciones nutricionales.
- b) Fase Exponencial: Se inicia e incrementa la velocidad de división celular hasta alcanzar un crecimiento lineal.
- c) Fase Lineal: Alcanza su máxima tasa de división donde las células son jóvenes y biológicamente activas.



- d) Disminución Progresiva de Crecimiento o Desaceleración: El alto número de células hacen que se vaya agotando los nutrientes del medio donde las materias residuales se acumulan, el pH se modifica y la velocidad de división disminuye.

- e) Fase Estacionaria: Durante esta fase las células han agotado los nutrientes del medio y han alcanzado su máxima división celular. Las células permanecen vivas por un periodo para posteriormente morir muchas de ellas decayendo la curva de crecimiento (Roca y Mrognski 1989, Hurtado y Merino 1991, Mjkjones 1992, Gómez 1999 y Cioffi 2002).

2.2.7.1. Evaluación del Crecimiento Celular.-

Existen varios métodos para evaluar el crecimiento de las células a través del tiempo. Entre los principales métodos se tiene a los métodos directos e indirectos. Dentro del primer grupo están considerados: el número de células en un determinado volumen, la vitalidad celular, el peso fresco y peso seco de un determinado volumen de la suspensión celular. Entre los métodos indirectos se mide el pH entre otros (Gómez 1999 y Cioffi 2002).

2.2.7.1.1. Número de Células por ml.-

El número de células por unidad de volumen, es la forma más precisa de medir el crecimiento celular pero requiere mucho tiempo. Para realizar el conteo celular se debe romper los agregados celulares por métodos mecánicos o químicos. El conteo celular se puede realizar con un cámara de Neubauer, realizando los cálculos necesarios para obtener en una unidad de volumen conocida (Roca y Mrognski 1989, Mjkjones 1992, Cuba *et al.* 1996 y Gómez 1999).



2.2.7.1.2. Vitalidad Celular.-

Es necesario medir la vitalidad celular para tener un parámetro claro de evaluación de la viabilidad de las células en suspensión y así determinar el momento de cambio de medio de cultivo fresco. Esto se debe a que la muerte celular ocurre principalmente por el agotamiento de los nutrientes y la acumulación de desechos de las células en el medio de cultivo. La vitalidad celular es ampliamente utilizada para innumerables investigaciones de diferentes especies vegetales como es el caso de *Coffea arabica* (Montes *et al.* 1995 y Feria *et al.* 2000).

Entre los distintos métodos que existen para determinar la vitalidad celular uno de los más usados por su accesibilidad y fácil empleo es el colorante azul de Evans el cual, se usa a una dilución de 0.1% y se adiciona a la suspensión celular en una relación 1:1. Así, el colorante es excluido por las células viables y las muertas toman una coloración azul intenso (Gómez 1999 y Steward *et al.* 1999).

2.2.7.1.3. Determinación del Peso Fresco y Peso Seco.-

Ambos parámetros son ampliamente usados para indicar el crecimiento celular. La medida del peso fresco se expresa en gm/l y la de peso seco se expresa en gms/l. Una de sus principales fallencias en este método, es el agua asociada a las células y fallas en la filtración las cuales provocan resultados falsos. Es por esto que se recomienda realizar varias repeticiones para disminuir el error (Pollard 1990, Hurtado y Merino 1991, Mgkjones 1992, Gómez 1999 Feria 2000 y Cioffi 2002).



2.2.7.1.4. pH del medio de cultivo.

Una forma indirecta de evaluar el crecimiento celular consiste en medir la fluctuación del pH del medio de cultivo de la suspensión celular. El mantenimiento del pH influye en la función plasmática evitando la ruptura de la membrana celular; influye en el consumo de los nutrientes y reguladores de crecimiento que se encuentran en el medio de cultivo. También permite que las sales se encuentren solubles y disponibles para el consumo de las células. Consecuentemente, un pH que se mantiene constante influye positivamente en el crecimiento celular (George y Sherrington 1984).

Por otro lado, Gómez 1999, en los experimentos que realizó, reportó los siguientes cambios del pH: En los dos primeros días, se observó una disminución del pH hasta en una unidad, éste retorno gradualmente al pH original. Posteriormente se advirtió otra caída del pH coincidió con el máximo número de células, después de 8 días el pH se incrementó hasta 7.5.

2.2.7.2. Densidad Celular.-

Un factor importante para alcanzar el óptimo crecimiento celular es la densidad inicial celular con la que se trabaja. Se considera como un valor mínimo (Densidad Crítica) de 10000 a 15000 células por ml (Gómez 1999 y Cioffi 2002), por debajo de esta densidad se puede prolongar demasiado la fase de reposo y la fase exponencial ó no incrementar el número de células por ml. Por el contrario, con una densidad muy alta, la fase de reposo se reduce y el porcentaje de crecimiento cesa tempranamente. Es por esta razón que la relación exacta entre la densidad de inóculo y el patrón de crecimiento varía entre especies (Feria *et al.* 2000). Las células normalmente tienen de 4 a 8 divisiones celulares en 18 a 25 días y dependen principalmente de tres factores: El genotipo que se cultiva, la duración e incubación del inóculo que se utiliza y de la composición del medio (Gómez 1999).



CAPÍTULO III: MATERIALES Y METODOS

3.1. LOCALIZACIÓN.-

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas dependiente de la Facultad de Ciencias Farmaceuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés (U.M.S.A), ubicado en la Av. Saavedra N° 2224. Zona de Miraflores, La Paz - Bolivia.

3.2. MATERIALES.-

3.2.1. Material Vegetal.-

El material vegetal empleado para esta investigación procedió de la Unidad de Bioquímica y Biotecnología Vegetal del Instituto de Genética dependiente de la Facultad de Medicina de la UMSA ubicado en la Avenida Saavedra N° 2246 Zona Miraflores, La Paz- Bolivia.

Este material se encontraba en condiciones de asepsia (libre de bacterias y hongos) con una población inicial de 40 vitroplantas aproximadamente. Estas plantas fueron introducidas *in vitro* en 1996 y se realizaron repiques habituales cada 2 meses.



3.2.2. Reactivos.-

3.2.2.1. Medio de cultivo.-

3.2.2.1.1. Medio de cultivo para multiplicación de la planta, inducción, mantenimiento de callo y suspensión celular.-

- Medio Basal Murashige & Skoog (1962), descrito en el Anexo N° 1.
- Agar Agar (6.5g/l).
- Hidroxido de Sodio (Na OH) 0.1N
- Cloruro de Sodio (HCl) 0.1N
- Sacarosa (30g/l).

3.2.2.1.2. Medio de cultivo para la verificación de contaminación por microorganismos.-

- Agar Nutritivo (28g/l)
- Caldo Nutritivo (8g/l)

3.2.2.2. Reguladores de Crecimiento.-

- BAP (6-Benzylaminopurine); Formula Química (FQ): $C_{12}H_{11}N_5$; Peso Molecular (PM) 225.3. (SIGMA)
- 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid); FQ: $C_8H_6Cl_2O_3$; PM: 221. (SIGMA)
- AIA (Indole-3-acetic Acid); FQ: $C_{10}H_9NO_2$; PM: 175.2. (SIGMA)
- ANA (1-Naphthaleneacetic acid); FQ: $C_{12}H_{10}O_2$; PM 186.2. (SIGMA)



3.2.2.3. Colorantes para la tinción de células vegetales y detección de bacterias.-

- Azul de Evans preparado al 0.1%.
- Cristal Violeta.
- Lugol.
- Fucsina Básica.

3.2.3. Material de Vidrio.-

- Cajas petri con capacidad de 100 x 20 mm.
- Cajas petri con capacidad de 60 x 15 mm.
- Matraces Erlenmeyer de 50, 100, 250, 500 y 1000 ml.
- Frascos de Vidrio con tapas autoclavables de 300 y 500 ml de capacidad.
- Pipetas de 5,10 y 25 ml.
- Porta y Cubre Objetos

3.2.4. Equipos.-

- Autoclave vertical.
- Campana de Flujo Laminar Vertical.
- Balanza analítica de precisión.
- Estereoscopio.
- Microscopio.
- Cámara de Crecimiento con fotoperiodo de 16 hrs. luz y 25º C. aprox.
- Cámara de Crecimiento a oscuridad total.
- Agitador magnético.
- Extractor al Vacío.
- Bomba de Vacío.
- Baño María.



- pH metro.
- Cámara de NEUBAUER.
- Contadores de células.
- Micro pipetas de 10, 100, 1000 y 5000 μ l.
- Vortex
- Plataforma Rotatoria (Shaker).

3.2.5. Material Fungible.-

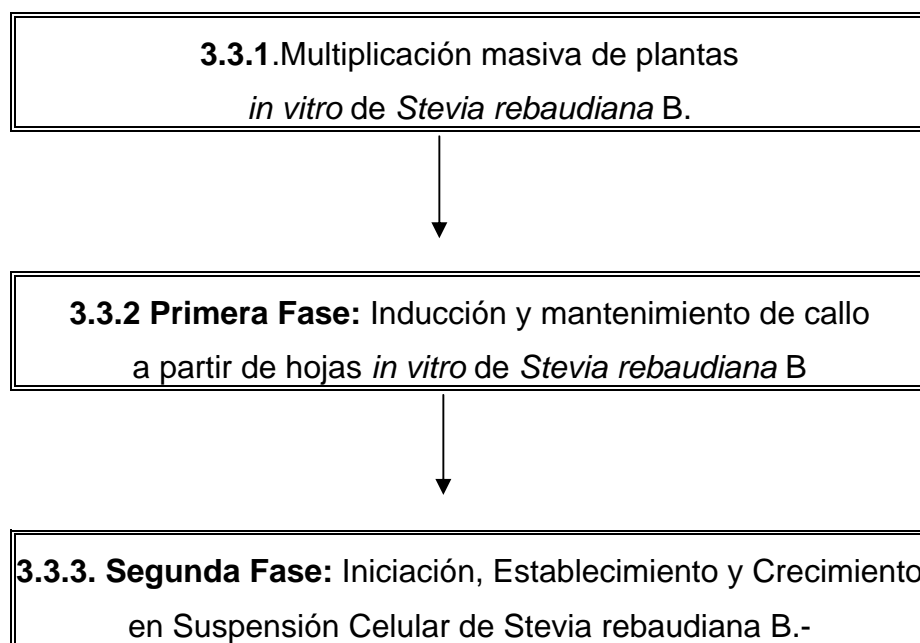
- Membranas de Filtración 0.45 μ m x 47mm de diámetro.
- Hipoclorito de Sodio Comercial (8%).
- Alcohol al 70% y 99%.
- Agua Destilada.
- Hojas de Bisturí N° 10.
- Parafilm.
- Papel estañado.
- Papel madera y cordel.
- Guantes y barbijo.
- Algodón y Gasa.
- Jeringas de insulina (1ml).

3.2.6. Otros Materiales.-

- Pinzas.
- Espátulas.
- Mechero.
- Tubos Eppendorf.
- Tips de 100,1000 y 5000 μ l.
- Pizetas.
- Mango de Bisturí N° 3.

3.3. MÉTODOS.-

Para alcanzar los objetivos propuestos en la presente investigación se desarrollo la metodología descrita en el siguiente gráfico.



Gráfica N° 1. Esquema Guía de la metodología desarrollada en la investigación.

3.3.1. Multiplicación masiva de plantas *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B.-

El material biológico utilizado fue conservado en el medio de cultivo Murashige & Skoog (MS 1962), con plantas de 10 cm de altura promedio y con un crecimiento activo y vigoroso.

Para poder iniciar este trabajo, fue necesario obtener previamente una gran cantidad de vitroplantas y emplear las hojas como punto de partida para la inducción a callo como es recomendado por Roca y Mrongnski (1989) y Mgekiones *et al.* (1992), por lo que se procedió a la multiplicación masiva del material biológico hasta obtener 200 plantas con gran cantidad de hojas.



- Se preparó el medio de cultivo MS (1962), suplementado con 3% de sacarosa y 0.65% de agar como agente solidificante. El pH fue ajustado a 5.8 con NaOH (0.1M) y HCl (0.1M) antes de ser trasladados al autoclave.
- Se esterilizó el medio de cultivo a 121°C a 124kPa de presión el cual fue distribuido en frascos de vidrio previamente esterilizados.
- Dentro de la Campana de Flujo Laminar se extrajeron plantas ya desarrolladas y se procedió a cortar con ayuda de pinzas y bisturí, explantes caulinares compuestos por 2 hojas y su yema lateral (nudos) o en algunos casos yema terminal.
- Se introdujeron de 8 a 10 pequeños explantes por frasco, realizando el sellado de cada uno de los recipientes para ser trasladados a la cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 hrs. Luz a una temperatura aproximada de 25 °C. durante un periodo de cuatro semanas.
- Pasadas las cuatro semanas los explantes alcanzaron un tamaño aproximado de 10 cm de alto. Posteriormente, cada cuatro semanas se procedió al repique de las plantas para obtener una población suficiente de plantas e iniciar la primera fase experimental.

3.3.2. Primera Fase: Inducción y mantenimiento de callo a partir de hojas *in vitro* de *Stevia rebaudiana B.*

3.3.2.1. Preparación del Medio de Cultivo.-

- Para cada uno de los tratamientos se preparó 150 ml de medio de cultivo MS (1962) suplementado con 3% de sacarosa, este medio fue empleado por Marcovillica (1989) y Yamazaki *et al.* (1991) para la inducción a callo,



además, se agregó 0.65% de agar como agente solidificante además de ser suplementado con los reguladores de crecimiento detallado en el cuadro 3. El pH fue ajustado a 5.8 con NaOH (0.1N) y HCl (0.1N) antes de llevarlos al autoclave.

- Se esterilizó el medio de cultivo a 121°C y 124kPa de presión. Una vez esterilizado se distribuyó 25 ml en cajas petri previamente esterilizadas bajo la campana de flujo laminar.
- Cada una de las cajas Petri fue identificada con un código para diferenciar los tratamientos.

3.3.2.2. Inducción a Callos.-

- Una vez dispuesto el material estéril se introdujeron las vitroplantas, el material de vidrio, pinzas y bisturí, alcohol al 96 % y 70%, cajas Petri con medio de cultivo, dentro de la campana de flujo laminar, donde se extrajeron las hojas del tercio medio de las plantas *in vitro* sobre una caja Petri vacía. Se separó cada hoja de 0.5 a 1 cm. aproximadamente de tamaño de acuerdo a lo recomendado por Roca y Mrongnski (1989), para luego excisarlas con la finalidad de permitir el ingreso a los reguladores de crecimiento a través de las incisiones que es recomendado por Mngkiones *et al.* (1992) y así facilitar la formación de callo. (Fotografía N° 1).
- En cada caja petri con medio de cultivo se colocaron 10 explantes excisados como indica Aguado *et al.* (2001) y se selló con Parafilm para evitar el ingreso de aire y posible contaminación. Este procedimiento se repitió para los 30 tratamientos con 6 repeticiones haciendo un total de 180 cajas Petri.



- Se llevó las 180 cajas petri a completa oscuridad como recomienda Hurtado y Merino (1991) en cajas de plastoform recubiertas interiormente con plástico negro durante 28 días a una temperatura aproximada de 25 °C.



* Fuente Propia

Fotografía N° 1: Inducción a callo de *Stevia rebaudiana* B a partir de hojas.

3.3.2.3. Mantenimiento de los callos.-

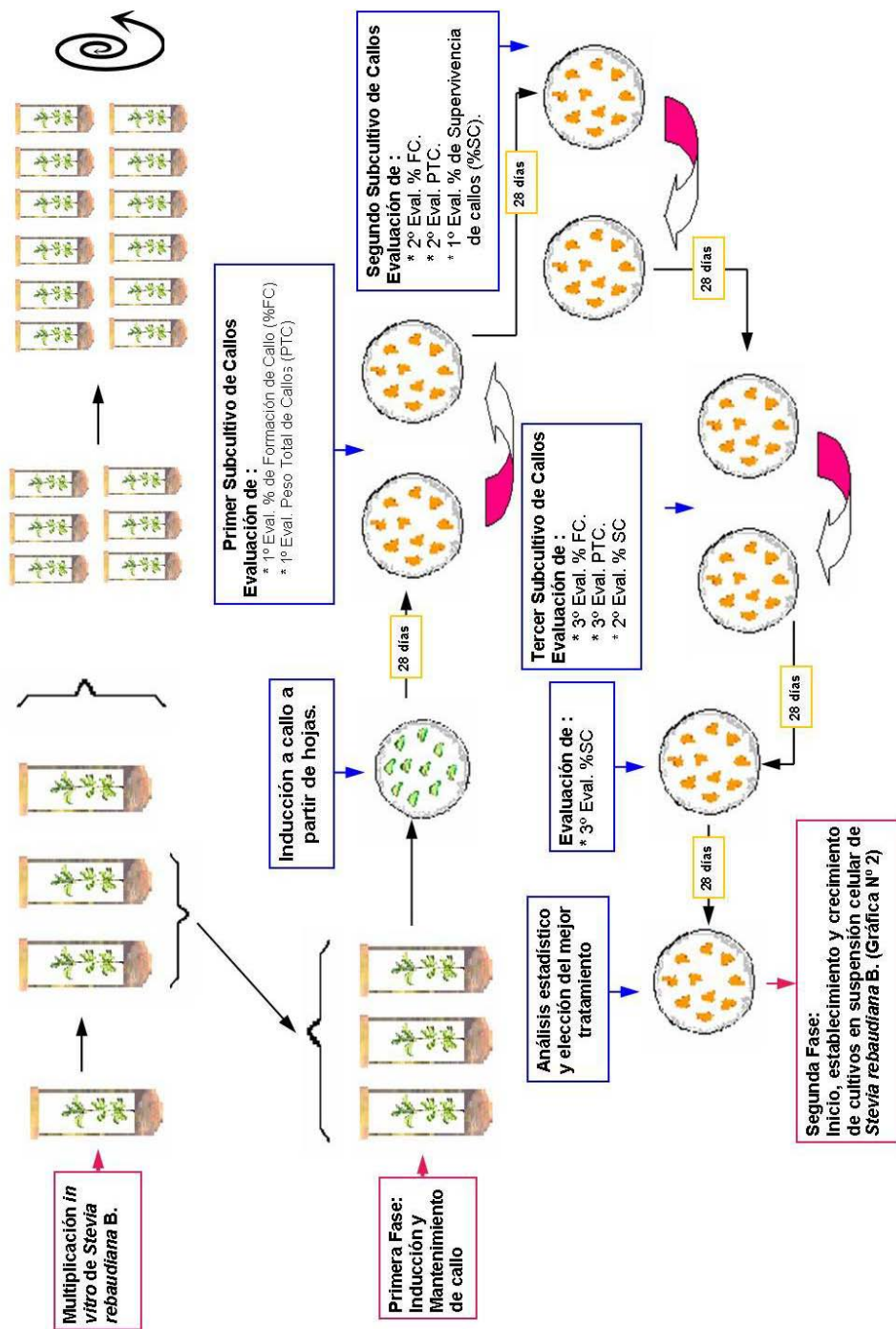
Fue necesario realizar un cambio de medio de cultivo cada 4 semanas ya que como afirma Hurtado y Merino 1991, el agotamiento de nutrientes del medio, la intoxicación a causa de los metabolitos de desecho de las células y la deshidratación por la transpiración de los explantes son condiciones que hacen que el explante se debilite y muera. Además, los callos fueron subcultivados en el mismo medio cultivo como recomiendan Ponce *et al.* (1998) y Aguado *et al.* (2001).



- Se preparó un nuevo medio de cultivo para cada uno de los tratamientos siguiendo la metodología anteriormente descrita en el punto 3.3.2.1.
- Dentro del flujo laminar se colocó el medio de cultivo fresco. Con ayuda de las pinzas histológicas se removió el callo del medio de cultivo antiguo y se lo llevó a la nueva placa Petri donde se lo introdujo suavemente dentro del medio. Este procedimiento se repitió con los 10 callos presentes en cada caja Petri.
- Una vez trasladados los callos se selló la caja Petri y se la llevó a la cámara de crecimiento en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Este procedimiento se repitió a los 56 y 84 días de la inducción a callo para todos los tratamientos.

Todo el procedimiento descrito ha sido resumido en la gráfica presentada a continuación:

Gráfica N° 2: Multiplicación de plantas *in vitro* de *Stevia rebaudiana* e inducción y mantenimiento de callos.





3.3.2.4. Variables de Respuesta.-

Después de la inducción a callo se procedió a obtener las variables de respuesta:

- Porcentaje de formación de callo.
- Peso total de callos por caja petri.
- Porcentaje de supervivencia de los callos.

El Porcentaje de Formación de Callo y el Peso Total de los Callos por caja Petri fueron evaluados a los 28, 56 y 84 días después de la inducción a callo mientras que el Porcentaje de Supervivencia de Callo fue evaluado transcurridos 28 días después de cada subcultivo, por lo que se valoró esta variable de respuesta a los 56, 84 y 112 días después de la inducción a callo, con el objetivo de analizar el comportamiento de éstos, posterior al estrés del subcultivo.

3.3.2.4.1. Porcentaje de Formación de callo.-

Se puede determinar el grado de formación de callo a partir de los cambios morfológicos observados del explante. Al respecto Hurtado y Merino (1991) afirman que estos cambios morfológicos varían de acuerdo a factores nutricionales, (medio de cultivo y de reguladores de crecimiento), ambientales, y tipo de explante.

A los 28, 56 y 84 días de haberse inducido a la formación de callo se procedió a evaluar el Porcentaje de Formación de Callos descrito a continuación y que se repitió en todos los tratamientos.

- El porcentaje de formación de callo se evaluó tomando en cuenta las siguientes características cualitativas: Número de explantes deformados, Número de explantes despigmentados y Número de explantes en proceso de formación de callo.



- El porcentaje de formación de callo se obtuvo a partir de la deducción de que cada explante de hoja con las características arriba mencionadas, ésta representaba el 10% de formación de callos en la caja Petri, considerando que cada caja Petri tuvo 10 explantes haciendo un total de 100%.
- Además de evaluar el porcentaje de formación de callo también se evaluó la consistencia de éste y se consideró si eran o no friables al presionar los callos con una pinza. Se consideró callos friables, si al tocarlos se desagregaban y compactos a aquellos que tenían una consistencia dura.

3.3.2.4.2. Peso Total de Callo por caja Petri.-

Se evaluó el peso promedio de los callos a los 28, 56 y 84 días para todos los tratamientos.

- Con ayuda de una balanza analítica se pesó la placa petri con los 10 callos.
- Para obtener el peso neto de los callos, estos fueron transferidos a otra caja Petri con medio fresco con la misma dosificación de auxinas y citocininas, bajo el flujo laminar y se peso la caja Petri vacia.
- La diferencia entre el peso de la caja petri más los callos y la caja petri sin callos permitió obtener el peso total de los 10 callos alcanzado en 28 días.



3.3.2.4.3. Porcentaje de Supervivencia del Callo.-

- Se evaluó esta variable de respuesta a los 56, 84 y 112 días de realizarse la inducción a callo de los 30 tratamientos y sus repeticiones.
- Para evaluar esta variable de respuesta se contó el número de explantes vivos sobre el total en cada caja petri. Se consideró como vivos a aquellos que presentaban colores que variaron de amarillo y beige.
- Se consideró como muertos a aquellos que estaban completamente necrosados, de color marrón y negro. (Hurtado y Merino 1991).

3.3.2.5. Diseño Experimental de la Primera Fase.-

Para llevar a cabo esta primera fase experimental se realizó un Diseño Completamente al Azar con arreglo factorial 3x3x3 con 3 factores y 3 niveles (27 combinaciones) con 6 repeticiones. Los factores y niveles son descritos en el Cuadro N° 2:

Cuadro N° 2. Factores y Niveles para la inducción y mantenimiento de callos que corresponden a un arreglo factorial 3x3x3 de la Fase 1.

FACTORES		
A: Tipo de Auxina	B: [C]de Auxina	C: [C] de BAP
$a_1 = 2,4\text{-D}$	$b_1 = 5$	$c_1 = 0$
$a_2 = \text{ANA}$	$b_2 = 10$	$c_2 = 25$
$a_3 = \text{AIA}$	$b_3 = 20$	$c_3 = 50$

* Las [C] están dadas en μM



A continuación se presentan los 30 tratamientos formulados para la primera fase experimental descritos en el Cuadro N° 3.

Cuadro N° 3. Formulación de los 30 tratamientos con diferentes tipos y concentraciones ([C]) de auxinas y concentraciones ([C]) de BAP.

Tipo de Auxina	[C]	BAP		
		0	25	50
S.A.	0	T ₁ = 0/0	T ₁₁ = 25/0	T ₂₁ = 50/0
2,4-D	5	T ₂ = 0/5	T ₁₂ = 25/5	T ₂₂ = 50/5
	10	T ₃ = 0/10	T ₁₃ = 25/10	T ₂₃ = 50/10
	20	T ₄ = 0/20	T ₁₄ = 25/20	T ₂₄ = 50/20
ANA	5	T ₅ = 0/5	T ₁₅ = 25/5	T ₂₅ = 50/5
	10	T ₆ = 0/10	T ₁₆ = 25/10	T ₂₆ = 50/10
	20	T ₇ = 0/20	T ₁₇ = 25/20	T ₂₇ = 50/20
AIA	5	T ₈ = 0/5	T ₁₈ = 25/5	T ₂₈ = 50/5
	10	T ₉ = 0/10	T ₁₉ = 25/10	T ₂₉ = 50/10
	20	T ₁₀ = 0/20	T ₂₀ = 25/20	T ₃₀ = 50/20

En el Cuadro N° 3 se incluyen tres tratamientos adicionales con sus respectivas repeticiones. El tratamiento 1 que representa al tratamiento que no contiene ningún regulador de crecimiento. El tratamiento 11 suplementado con 25 μ M de BAP y sin auxinas. Por último se adicionó el tratamiento 21 que fue suplementado con 50 μ M de BAP y sin auxinas, los cuales no corresponden a tratamientos factoriales. Para la comparación de estos tres últimos tratamientos (testigos) con los tratamientos factoriales, se empleo un Diseño Completamente al Azar con criterio de clasificación de 30 tratamientos.



3.3.2.5.1. Modelo Lineal Aditivo de la Primera Fase Experimental con un arreglo factorial 3x3x3 en Diseño Completamente al Azar.-

El Modelo Lineal Aditivo empleado fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \gamma_k + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde:

Y_{ijkl} = Cualquier Observación

μ = Media Poblacional

α_i = Efecto del i- esimo tipo de Auxina

β_j = Efecto de la j-esima concentración de Auxina

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto de la interacción del i-esimo tipo de Auxina con la j-ésima concentración de Auxina

γ_k = Efecto de la k-esima concentración de BAP

$(\alpha\gamma)_{ik}$ = Efecto de la interacción del i-ésimo tipo de Auxina con la k-ésima concentración de BAP

$(\beta\gamma)_{jk}$ = Efecto de la interacción de la j-ésima concentración de Auxina con la k-ésima concentración de BAP

ε_{ijkl} = Error Experimental



3.3.2.5.2. Modelo Lineal Aditivo de la Primera Fase Experimental para evaluar 30 tratamientos en Diseño Completamente al Azar.-

El Modelo Lineal Aditivo empleado para analizar los resultados del conjunto de los 30 tratamientos en la primera fase experimental fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Cualquier Observación

μ = Media Poblacional

α_i = Efecto del i -ésimo tratamiento

ε_{ij} = Error Experimental.

3.3.2.5.3. Pruebas de Significancia de la Primera Fase .-

Se realizó la prueba de Duncan con un nivel de confianza de 95%, para los efectos principales de Tipo de Auxina, Concentración de Auxina, Concentración de BAP y los 30 tratamientos, de todas las variables de respuesta a los 28, 56, 84 y 112 días respectivamente, cuando se detectaron diferencias estadísticas en el Análisis de Varianza.

3.3.2.5.4. Transformación de Datos de la Primera Fase.-

Según Steel y Torrie (1992) y Reyes (1995), la transformación de datos es una herramienta útil cuando los datos obtenidos no cumplen con los supuestos del Análisis de Varianza como ser porcentajes, conteos y otros. Se emplea este tipo de mecanismos para determinar si existen o no diferencias significativas en las diferentes fuentes de variación. Al respecto Calzada (1970), indica que el coeficiente de variación no debe exceder de 30%. Se realizaron diferentes



transformaciones de datos según la variable de respuesta, como se podrá observar más adelante.

3.3.3. Segunda Fase: Iniciación, Establecimiento y Crecimiento en Suspensión Celular de *Stevia rebaudiana* B.-

Se inició la segunda fase experimental empleando el tratamiento que dio la mejor respuesta para la inducción y mantenimiento de callos por sus cualidades intrínsecas como un cien por ciento de porcentaje de formación de callo, alta friabilidad, peso promedio de 1,5 g y una supervivencia de 73.3% a los 112 días de evaluación.

Para comparar qué efecto tuvo la presencia o ausencia de los reguladores de crecimiento, en el establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Stevia rebaudiana* B. reflejado en la mayor producción de células a los 23 días de evaluación y para poder aplicar este resultado en posteriores investigaciones como la obtención de metabolitos secundarios, embriogénesis somática y otros, se elaboraron tres tratamientos: El tratamiento 1 (T1) fue el tratamiento testigo porque no fue adicionado con ningún regulador de crecimiento. El segundo (T2), fue suplementado con los reguladores de crecimiento del tratamiento óptimo disminuidos a un 50% (10 μ M 2,4-D y 25 μ M BAP). El tratamiento 3 (T3) que fue adicionado con 20 μ M de 2,4-D y 50 μ M de BAP siendo éstas, las concentraciones óptimas empleadas para la inducción y mantenimiento de callo (Cuadro N° 6).

Se empleó la metodología sugerida por Choi 1997, Gómez 1999 y Cioffi (2002), aplicada para la producción de metabolitos secundarios y para la producción de embriones somáticos a partir de suspensiones celulares (punto 3.3.3.2.). Asimismo, se utilizó esta metodología para iniciar y establecer la suspensión celular durante 21 días para luego determinar la curva de crecimiento de la



suspensión celular en 23 días más, evaluando día por medio todas las variables de respuesta detalladas en el punto 3.3.3.3.

La cantidad de inóculo fue constante de acuerdo a la metodología descrita por Cioffi (2002), en la que emplea una cantidad de callo constante de 3g de inóculo en 50 ml de medio de cultivo líquido, es decir, 1,5 g/25 ml de medio de cultivo.

3.3.3.1. Preparación del Medio de Cultivo.-

- a) Se utilizó el medio de cultivo basal MS (1962) completo, para cada uno de los tratamientos suplementado con 3% de sacarosa, adicionado con 2,4-D y BAP a diferentes concentraciones descritas en el Cuadro N° 5. El pH fue ajustado a 5.8 antes de llevar el medio de cultivo al autoclave.
- b) Se esterilizó el medio de cultivo a 121°C y 124kPa de presión. Una vez esterilizado se distribuyó a 25 ml de medio en la campana de flujo laminar en Erlenmeyers con capacidad de 100ml previamente esterilizados.
- c) Se sellaron y etiquetaron los frascos Erlenmeyer, para posteriormente ser sembrados con callos.

3.3.3.2. Inicio y Establecimiento de la suspensión celular.-

Para el inicio, establecimiento y crecimiento celular se utilizó la metodología sugerida por Choi *et al.* 1997, Gómez 1999 y Cioffi 2002, donde se realizaron algunas modificaciones con fines prácticos, Esta metodología se encuentra descrita a continuación y sintetizada en el Gráfica N° 3.



- a) Dentro de la campana de flujo laminar, se introdujo el material estéril y las cajas Petri con callos. También se incluyó, frascos Erlenmeyers con medio de cultivo suplementado con 2,4-D y BAP según cada tratamiento.
- b) Se transfirieron los callos de las cajas Petri a un Erlenmeyer prepesado con 25 ml de medio de cultivo para asegurar el peso del callo en 1.5g, Se selló el Frasco con gasa, algodón, papel estaño y parafilm, para evitar una posible contaminación con microorganismos.
- c) Con un fotoperiodo de 16 Hrs. luz y una temperatura aproximada de 25 °C el Erlenmeyer fue colocado en una plataforma rotatoria a una velocidad de agitación constante de 105 rpm, por siete días en la cámara de crecimiento.
- d) Pasados 7 días, se preparó 20 ml de medio de cultivo fresco el cual fue descrito en el punto 3.3.3.1, suplementado con las mismas concentraciones de 2,4-D y BAP, y fue dispensado en los frascos Erlenmeyer con capacidad de 100 ml cada uno.
- e) El frasco Erlenmeyer N° 1 que contenía el medio antiguo, los callos dispersos y las células agrupadas o aisladas, fue homogenizado con un vortex, para luego extraer 5 ml de esta suspensión con ayuda de una micropipeta, estos 5ml se adicionaron al medio fresco de los Erlenmeyers N° 2, 3 y 4.
- f) Pasados 7 días más, se repitieron los dos puntos anteriores y se distribuyó la suspensión celular de los Erlenmeyers N° 2, 3 y 4 en los Erlenmeyers N° 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13 con el medio fresco. De esta forma, se obtuvo 9 frascos con 20 ml de medio fresco y 5ml de suspensión celular del frasco antiguo. Este procedimiento se repitió después de 7 días y se obtuvo 27 frascos Erlenmeyer con 20 ml de medio de cultivo fresco y 5 ml de suspensión celular.



- g) Una vez que se obtuvieron los 27 frascos se seleccionaron 12 frascos al azar para realizar las evaluaciones correspondientes día por medio durante 23 días consecutivos. Además se descartó uno a uno cada frasco después de ser evaluado.
- h) Esta metodología descrita fue empleada para los tres tratamientos. Se realizaron 4 repeticiones por frasco. No se adicionaron otros frascos por razones de disponibilidad de material de laboratorio y equipos. Tampoco se pudo realizar al mismo tiempo los tres tratamientos, pero se procuró mantener las mismas condiciones de cultivo para que estas no influyan en los resultados finales.

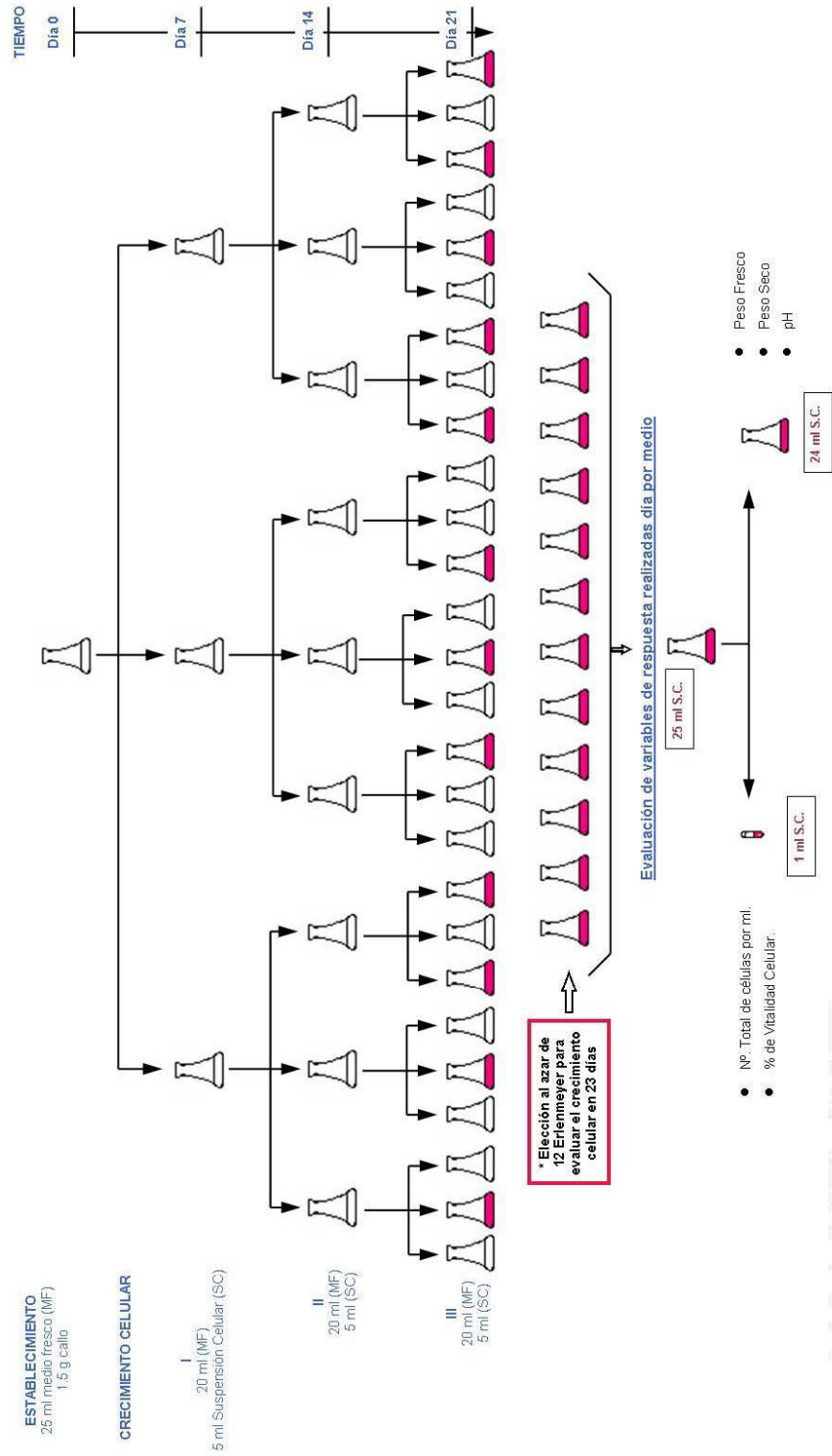
La suspensión celular obtenida tenía un color semi transparente donde se apreciaba la presencia de algunos vestigios de callo diminutos. En la fotografía N° 2 se aprecia una suspensión celular de 3 semanas contenida en Erlenmeyers de 125 ml de capacidad.



* Fuente Propia

Fotografía N° 2: T 2
(10 μ M 2,4-D/ 25 μ M BAP)

Gráfico N° 3: Inicio, Establecimiento y Crecimiento de cultivos en suspensión celular de *Stevia rebaudiana* B.



Fuente: Basado en Choi 1997, Gómez 1999 y Cioffi (2002)



3.3.3.3. Variables de Respuesta.-

La evaluación de todas las variables de respuesta se realizó día por medio descartando cada frasco en cada tratamiento, durante 23 días.

3.3.3.3.1. Recuento Total del Número de Células por mililitro.-

- a) Se eligió al azar uno de los 12 frascos Erlenmeyer, éste fue homogenizado con un Vortex durante un minuto, luego con una micropipeta se extrajo 1ml de suspensión celular y se colocó en un tubo Eppendorf (Nº 1) de 1.5 ml de capacidad.
- b) Se homogenizó la muestra del tubo Eppendorf (Nº 1) y se extrajo 50µl de la suspensión celular llevando esta alícuota a otro tubo Eppendorf (Nº2).
- c) Al tubo Eppendorf (Nº 2), se le adicionó 50µl de Azul de Evans al 0.1%, y fue homogenizada nuevamente la muestra. (metodología descrita por Gómez, 1999).
- d) Para desagregar la suspensión celular se emplearon jeringas de insulina, pasando la suspensión celular de 4 a 5 veces vigorosamente. (metodología descrita por Gómez, 1999).
- e) Se colocó un cubre cámaras sobre la cámara de Neubauer y con ayuda de una micropipeta se transfirió la suspensión celular por acción capilar a ambos lados de la cámara.
- f) El conteo celular se realizó según la metodología sugerida por French (1982) y Sigma (1989) y el cálculo del número de células por mililitro se



realizó de acuerdo a la fórmula descrita en el Cuadro N° 4 sugerida por Gómez (1999):

Cuadro N° 4. Fórmula para determinar el número de células por ml.

$$\text{N}^\circ \text{ de Células por ml.} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células en el cuadrado grande}}{10^6}$$

- g) Se tomaron 3 muestras adicionales de suspensión celular para el recuento celular. Los datos sirvieron para el análisis estadístico. Finalmente se hicieron los cálculos correspondientes para poder aplicar la fórmula descrita por Gómez 1999.

3.3.3.3.2. Porcentaje de Vitalidad Celular.-

Se calculó el porcentaje de células vivas y muertas día por medio, durante 23 días empleando el colorante Azul de Evans, el cual permite diferenciar las mismas por su capacidad de exclusión de las células vivas. Las células muertas fueron diferenciadas porque absorbieron el colorante Azul de Evans, tiñéndose de color azul. Una vez diferenciadas las células vivas de las muertas, se las contó por separado, obteniendo el número de células vivas, muertas y la suma de estas dio el total de las células por ml. Con el número de células vivas se pudo evaluar el porcentaje de vitalidad celular a través de la siguiente fórmula descrita en el Cuadro N° 5 y se aplicó a todos los tratamientos y todas las muestras.

Cuadro N° 5. Fórmula para evaluar el Porcentaje de Vitalidad Celular.

$$\text{Vitalidad Celular} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células Vivas}}{\text{N}^\circ \text{ Total de células}} * 100$$



3.3.3.3.3. Peso Fresco y Peso Seco.

- a) Los 24 ml de medio con su suspensión celular se emplearon para obtener el peso fresco y peso seco de la suspensión celular.
- b) La suspensión celular fue homogenizada y filtrada a través de una membrana de filtración millipore 0.40 μ m con ayuda de un extractor al vacío para obtener el peso fresco de la suspensión celular, que se obtuvo por diferencia entre el peso del filtro y la masa celular.
- c) El peso seco se obtuvo una vez secada la muestra en estufa a 60°C durante 24 horas hasta alcanzar un peso constante de acuerdo a lo recomendado por Gómez (1999).

Las unidades de medida son: “gramos de masa fresca por litro” y “ gramos masa seca por litro” simbolizados por (gm/L y gms/L), respectivamente. Estos datos permitieron evaluar la variación del peso de la suspensión celular día por medio durante 23 días.

3.3.3.3.4. pH del medio de cultivo.

- a) La medición del pH del medio de cultivo sirvió para evaluar el comportamiento del mismo durante el crecimiento celular puesto que la variación de pH en el tiempo de cultivo es un indicador del consumo de nutrientes.
- b) Se midió el pH de todas las muestras de los tres tratamientos día por medio conjuntamente con la evaluación de las otras variables de respuesta, durante 23 días.



3.3.3.3.5. Diluciones para el conteo celular.-

Para el recuento celular, en la cámara de Neubauer se tuvieron que hacer diluciones de: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000 y 1:10000000.

3.3.3.4. **Diseño Experimental de la Segunda Fase.-**

Para analizar los resultados de las variables de respuesta número total de células por ml y porcentaje de vitalidad celular de la segunda fase experimental se utilizó un diseño completamente al azar a un criterio de clasificación de tres tratamientos con cuatro repeticiones basados en el mejor tratamiento de la primera fase experimental, descritos a continuación:

Cuadro N° 6: Tratamientos con diferentes concentraciones ([C]) de 2,4-D y BAP correspondientes a la Segunda Fase.

Nº de Tratamiento	[C] 2,4-D	[C] BAP
1	0	0
2	10	25
3	20	50

* Las [C] están dadas en μM

3.3.3.4.1. Modelo Lineal Aditivo de la Segunda Fase.-

El Modelo Lineal Aditivo que fue empleado para analizar los resultados de la segunda fase experimental fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Cualquier Observación

μ = Media Poblacional

α_i = Efecto del i -ésimo tratamiento

ε_{ij} = Error Experimental.



3.3.3.4.2. Pruebas de Significancia de la Segunda Fase .-

Se realizó la prueba de Duncan con un nivel de confianza del 95%, para los 3 tratamientos tomando en cuenta las variables de respuesta: Número de Células Totales y Porcentaje de Vitalidad Celular para los días 1, 13 y 23 de evaluación de la suspensión celular cuando se presentaron diferencias estadísticas en el Análisis de Varianza.

No se realizaron pruebas estadísticas del peso fresco y peso seco por la falta de repeticiones y del pH, por tratarse de variables indicadoras del comportamiento del crecimiento celular en el tiempo. Estos resultados serán presentados más adelante.

3.3.3.4.3. Transformación de Datos de la Segunda Fase.-

Según Steel y Torrie (1992) y Reyes (1995), Se realiza la transformación de datos cuando los datos obtenidos no cumplen con los supuestos del Análisis de Varianza. Normalmente se transforma los datos cuando se evalúan porcentajes, conteos, entre otros, para así determinar si existen o no diferencias significativas en las diferentes fuentes de variación. Al respecto Calzada (1970) indica que el Coeficiente de Variación no debe exceder un 30%. En la segunda fase experimental, se realizaron transformaciones de datos que serán expuestos más adelante.



CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. MULTIPLICACIÓN MASIVA DE PLANTAS *in vitro* DE *Stevia rebaudiana* B.

Después de realizar la multiplicación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* siguiendo la metodología descrita anteriormente, se obtuvo una gran cantidad de vitroplantas que se emplearon para la primera fase experimental.

Según los objetivos planteados en este trabajo de investigación, a continuación se presentan los resultados obtenidos en la primera y segunda fase experimental.

4.2. PRIMERA FASE: INDUCCIÓN Y MANTENIMIENTO DE CALLO.-

A continuación se presentan los resultados obtenidos de las tres variables de respuesta consideradas en la primera fase experimental siendo: Porcentaje de Formación de Callo, Peso Total de Callo y Porcentaje de Supervivencia de Callo con su respectivo análisis de varianza y pruebas de significancia.

4.2.1. Porcentaje de Formación de Callos.-

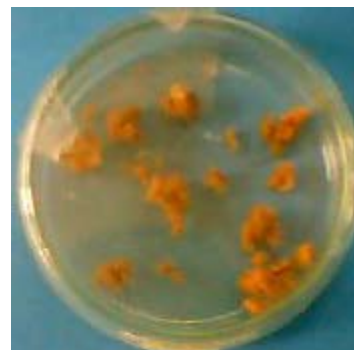
El porcentaje de formación de callo es la variable de respuesta que permitió determinar el estado de formación de callo a los 28, 56 y 84 días después de la siembra. Se consideró como indicios claros de formación de callo al aspecto cristalino de la superficie cortada del explante (Mglliones *et al.* 1992), la despigmentación y un agrandamiento seguido de una hinchazón del explante.



Estos cambios, derivaron en la formación de callos con características morfológicas únicas según la acción de los reguladores de crecimiento, como por ejemplo la presencia de brotes y raíces. También se observó la consistencia del callo que vario de compactos a friables, y el color de éstos de amarillo a beige y en algunos casos de marrón a negro dependiendo del grado de necrosamiento del explante (Ponce *et al.* 1998).

Las fotografías presentadas a continuación, muestran las características morfológicas mencionadas anteriormente y la variedad de callos obtenidos que servirán para la interpretación de los resultados.

- **Callos Friables**



* Fuente Propia

Fotografía N° 3: T4

(20 μ M 2,4-D/0 μ M BAP)

Fotografía N° 4: T14

(20 μ M 2,4-D/25 μ M BAP)

Fotografía N° 5: T24

(20 μ M 2,4-D/50 μ M BAP)

Las Fotografías N° 3, 4 y 5 muestran los tratamientos suplementados con 2,4-D a una concentración de 20 μ M y suplementados con BAP a diferentes concentraciones. Estos callos son altamente friables, de color beige en los tres casos y de diferente tamaño y peso dependiendo de la interacción que tuvieron con BAP.

Es necesario destacar que todos los tratamientos suplementados con 2,4-D, no derivaron en morfogénesis, lo que muestra que el conjunto de estas



características son útiles para el establecimiento de una suspensión celular, a diferencia de los tratamientos suplementados con ANA y AIA que desarrollaron callos compactos en esta primera fase de investigación.

- **Callos Compactos con raíces**



* Fuente Propia

Fotografía N° 6 : T5

(5 μ M ANA/0 μ M BAP)

Fotografía N° 7: T15

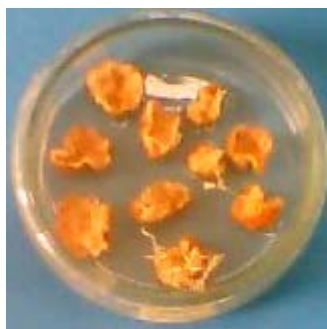
(5 μ M ANA/25 μ M BAP)

Fotografía N° 8: T25

(5 μ M ANA/50 μ M BAP)

En las Fotografías N° 6, 7 y 8, se aprecia los tratamientos suplementados con 5 μ M de ANA y BAP (0 μ M, 25 μ M y 50 μ M) respectivamente. El tratamiento 5 que solo fue suplementado con ANA, produjo callos provistos de gran cantidad de raíces, mientras que los tratamientos suplementados con BAP formaron callos compactos sin indicios de morfogénesis y en proceso necrótico en el caso del tratamiento 15.

- **Callos compactos con raíces o brotes.**



Fotografía N° 9: T9

(10 μ M AIA/0 μ M BAP)

Fotografía N° 10: T19

(10 μ M AIA/25 μ M BAP)

Fotografía N° 11: T29

(10 μ M AIA/50 μ M BAP)



En las Fotografías N° 9, 10 y 11 se aprecia el efecto de la concentración de $10\mu\text{M}$ de AIA y $0\mu\text{M}$, $25\mu\text{M}$ y $50\mu\text{M}$ de BAP respectivamente. En la primera se observa la formaron de callos con raíces laterales, en la segunda se observa la formaron brotes laterales y en la tercera, se observa callos compactos y en proceso necrótico.

- **Callos formados solo con la citocinina BAP.**



* Fuente Propia

Fotografía N° 12: T11

($25\mu\text{M}$ BAP)



Fotografía N° 13: T21

($50\mu\text{M}$ BAP)

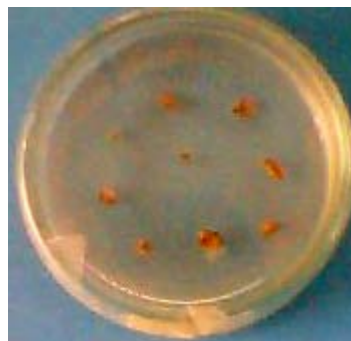
En las Fotografías N° 12 y 13 se observa a los tratamientos que solo fueron suplementados con BAP, donde los callos fueron compactos y sin indicios de morfogénesis. El tratamiento 21 presenta un fuerte indicio de necrosamiento.

- **Tratamiento testigo.**



Fotografía N° 14: T1

($0\mu\text{M}$ Auxinas/ $0\mu\text{M}$ BAP)



Fotografía N° 15: T1

($0\mu\text{M}$ Auxinas/ $0\mu\text{M}$ BAP)



En las Fotografías 14 y 15 se observa el comportamiento que tuvo el tratamiento testigo, donde no se formaron callos pero si hubo, en alguno de los casos, desarrollo de vitroplantas vitrificadas. En la mayoría los explantes murieron.

4.2.1.1. Porcentaje de Formación de callos a los 28 días.-

A través del Análisis de Varianza del Cuadro N° 7. correspondiente a la evaluación del Porcentaje de Formación de Callo a los 28 días se obtuvieron los resultados descritos a continuación

Cuadro N° 7. Análisis de Varianza Factorial para el Porcentaje de Formación de Callo a los 28 días de inducción.

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Significancia
Tipo de Auxina	2	3.111	1.5555	1.9	0.1528	N.S
[C] Auxina	2	2.1278	1.0639	1.3	0.2752	N.S
Tipo Auxina * [C] Auxina	4	11.594	2.8985	3.55	0.0086	**
[C] de BAP	2	6.5177	3.2588	3.99	0.0207	*
Tipo de Auxina * [C] BAP	4	7.5454	1.8863	2.31	0.0609	N.S
[C] Auxina * [C] BAP	4	6.1921	1.548	1.89	0.1147	N.S
Error	140	114.4	0.817			
Total	158	151.45				

* Significativo ** Altamente Significativo **NS** No Significativo

$$CV = 9.19 \%$$

En los efectos principales no existen diferencias significativas del Tipo de Auxina y la Concentración de Auxina, mientras que la Concentración de BAP presenta diferencias significativas entre las diferentes concentraciones empleadas de BAP.

La similitud del comportamiento del Tipo de Auxina se debe a que AIA, 2,4-D y ANA son ampliamente usadas para la inducción y proliferación de callo por su capacidad de promover el alargamiento y división celular en concentraciones óptimas para regular y estimular el crecimiento y desarrollo de éstos.



También AIA y ANA promueven el enraizamiento y morfogénesis combinada con citocininas, mientras que el 2,4-D suprime la morfogénesis y otorga una rápida proliferación de callos friables (Mejia y Vittorelli 1988, Ramírez 1989, Bu'Lock 1990, Mgliones *et al.* 1992), por lo que el elevado porcentaje de formación de callo de *Stevia rebaudiana*, confirma la capacidad de estas auxinas de promover tejidos callosos.

Marcovillica (1989), obtuvo una gran cantidad de callo de *Stevia rebaudiana* en medio de cultivo MS, suplementado con BAP 5mg/l y 2,4-D 1mg/l Esta información es confirmada por el presente trabajo de investigación puesto que se obtuvieron callos con el mismo medio de cultivo MS, suplementado con ANA, AIA y 2,4-D en forma individual o combinadas cada una con BAP a diferentes concentraciones representadas en los 27 tratamientos.

Sivaram y Mukundan (2003), obtuvieron callos que dieron un contenido de glucósido 5.8%, este valor es mayor que el contenido de glucósido en hojas *in vitro*, en medio MS suplementado con BA 8.87 μ M y AIB 9.8 μ M por lo que concluyeron que los tejidos de callos desorganizados son una fuente potencial de los compuestos edulcorantes de la Stevia.

En el Análisis de Varianza expuesto en el Cuadro N° 7, no se encontró diferencias significativas entre las Concentraciones de Auxinas aplicadas a las 27 combinaciones en el Porcentaje de Formación de Callo. Esta similitud en la respuesta de los explantes, se atribuye a que todas estas concentraciones se encuentran dentro del rango recomendado para la formación de callo por Hurtado y Merino (1991).



Cuadro N° 8. Prueba Duncan (5%) para los efectos de la Concentración de BAP en el Porcentaje de Formación de Callo a los 28 días de inducción.

[C] de BAP (μ M)	Media (%)	Duncan
50	99.623	A
25	97.547	AB
0	92.83	B

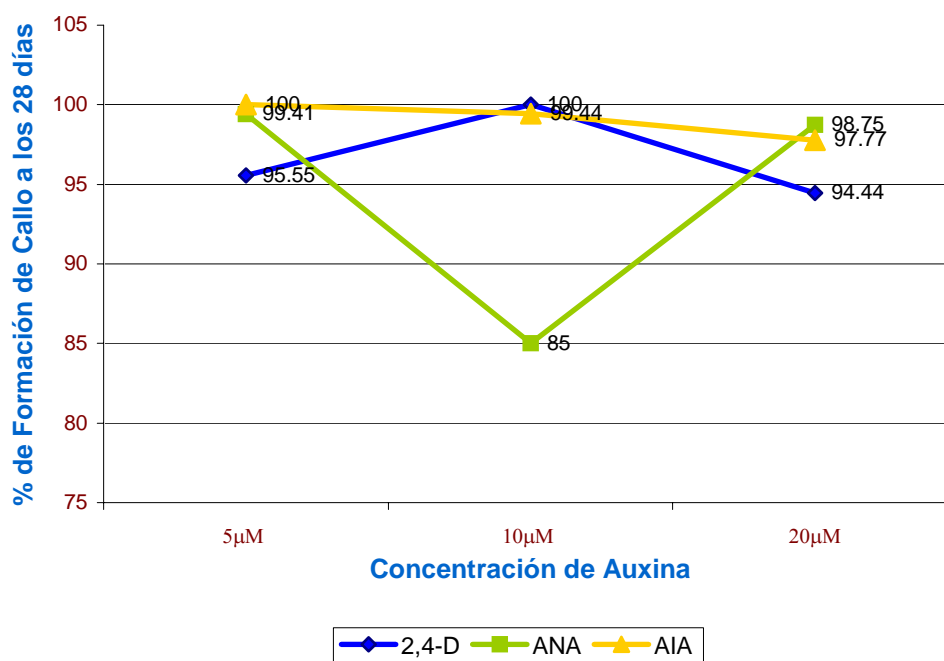
Debido a que el Análisis de Varianza mostró significancia en esta variable se realizó la prueba de Duncan, que mostró diferencias significativas entre las concentraciones de 50 μ M con 99.62 % y 0 μ M con 92.83% de formación de callo. Esta diferencia se atribuye a la ausencia de BAP que promueve la división celular y que actúa conjuntamente con las auxinas para la formación de callo (Roca y Mrongnski 1989, Bu'Lock 1990 y Hurtado y Merino 1991).

La interacción de Tipo de Auxina * Concentración de Auxina presentó diferencias altamente significativas, por lo que se realizó un análisis de efectos simples de dicha interacción lo que será expuesto a continuación. Las interacciones de Tipo de Auxina * Concentración de BAP y Concentración de Auxina * Concentración de BAP no presentaron diferencias estadísticas significativas.

Cuadro N° 9. Análisis de los Efectos Simples de la Interacción de Tipo de Auxina por [C] de Auxina del Porcentaje de Formación de Callo a los 28 días de inducción.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft 0.05	Ft 0.01	Significancia
Tipo de Aux. ([C] 5 μ M Aux.)	2	3.1009	1.5504	1.8977	3.07	4.76	N.S.
Tipo de Aux. ([C] 10 μ M Aux.)	2	13.6781	6.839	8.3709	3.07	4.76	**
Tipo de Aux. ([C] 20 μ M Aux.)	2	11.3541	5.677	6.9486	3.07	4.76	**
[C] de Aux. (2,4-D)	2	1.0266	0.5133	0.6283	3.07	4.76	N.S.
[C] de Aux. (ANA)	2	3.5982	1.7991	2.2021	3.07	4.76	N.S.
[C] de Aux. (AIA)	2	0.1531	0.0765	0.0937	3.07	4.76	N.S.
Error Experimental	140	114.3904	0.817				

* Significativo ** Altamente Significativo **NS** No Significativo



Gráfica N° 4. Efectos Simples del Tipo de Auxina dentro de cada concentración de Auxina sobre el Porcentaje de Formación de Callo a los 28 días.

En la Gráfica N° 4, respaldada por el Cuadro N° 9, se aprecia que a una concentración de 10 μM de la auxina ANA el porcentaje de formación de callo es estadísticamente inferior al resto de las auxinas a la misma concentración. También muestra que a una concentración de 20 μM de 2,4-D alcanzó un 94.44%, siendo este porcentaje inferior a los alcanzados por ANA y AIA con 98.75% y 97.77% respectivamente.

El bajo Porcentaje de Formación de Callo de 2,4-D (20 μM) y de ANA (10 μM) frente a las demás concentraciones se atribuye al balance auxina - citocinina porque la disminución sustancial del porcentaje proviene de los tratamientos 4 (20 μM 2,4-D, 0 μM BAP) y 6 (10 μM ANA, 0 μM BAP) respectivamente, que no desarrollaron un adecuado porcentaje de formación de callo. Ambos tratamientos no contenían BAP mientras que éste regulador de crecimiento actuó



sinérgicamente y promovió una mayor formación de callo con ANA y 2,4-D con las mismas concentraciones mencionadas anteriormente.

La prueba de Duncan realizada para los efectos principales de la Concentración de BAP indica que la presencia de BAP influye positivamente en el porcentaje de formación de callo. Estos resultados también se pueden atribuir al tiempo ya que los callos requieren de 3 a 8 semanas para desarrollarse (Hurtado y Merino 1991).

4.2.1.1.1. Análisis del comportamiento general de los tratamientos.-

A continuación, se presenta el Análisis de Varianza expuesto en el Cuadro N° 10 que detectó diferencias altamente significativas entre todos los tratamientos además con la prueba de Duncan (Anexo 3), se analizaron estas diferencias estadísticas.

Cuadro N° 10. Análisis de Varianza para los 30 Tratamientos del Porcentaje de Formación de Callo a los 28 días de inducción.

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Significancia
Auxina* [C]* BAP	29	464.93	16.03	21.61	0.0001	**
Error	147	109.04	0.74			
Total	176	573.94				

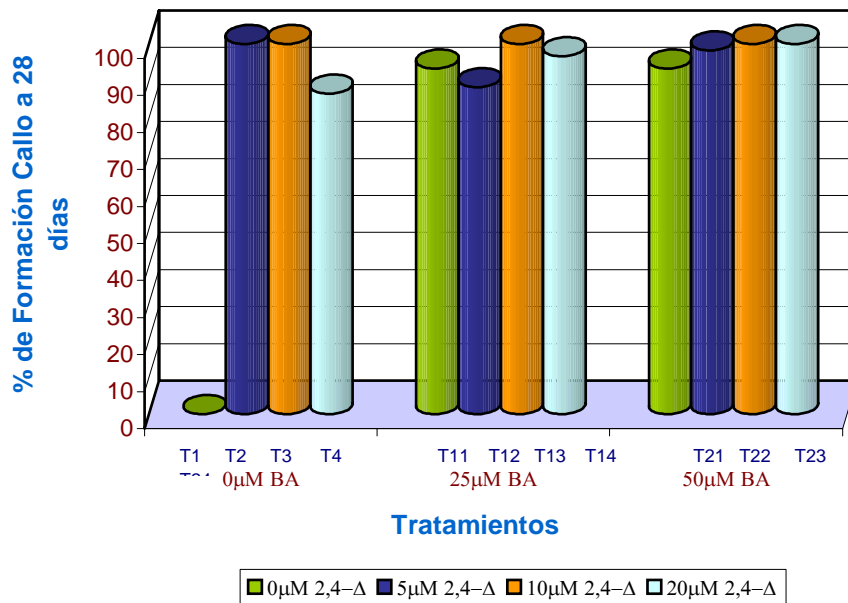
* Significativo ** Altamente Significativo NS No Significativo

CV = 9.02%

La prueba detectó que no existen diferencias entre la mayoría de los tratamientos con medias que oscilan entre 86.67% y 100% de formación de callo, probando la efectividad de los reguladores de crecimiento en todas sus concentraciones a excepción de los tratamientos 6 con 61.66% y 1 con 0% de formación de callo, siendo éstos significativamente inferiores. El bajo porcentaje del tratamiento 6 probablemente se deba a la ausencia de BAP ya que el balance de ANA y BAP promovió elevados porcentajes de formación de callo como en los tratamientos 16 (93.33%) y 26 (100%).



Por otro lado, el tratamiento 1 (0 μ M auxina y 0 μ M BAP), que no fue suplementado con ningún regulador de crecimiento, no formó callo, este resultado demuestra que los explantes de hojas de *Stevia rebaudiana* requieren la suplementación de auxinas y citocininas para formar callo.



Gráfica N° 5. Diferencias entre medias del Porcentaje de Formación de Callos friables y los tratamientos: 1, 11 y 21 a los 28 días de inducción.

En la Gráfica N° 5, se encuentran representados todos los tratamientos suplementados con 2,4-D combinados con BAP a diferentes concentraciones, donde se aprecia la capacidad de esta auxina de formar callos friables de tamaño considerable sin derivar en morfogénesis. Así, se constituye en una masa amorfa en constante expansión, con características ideales para iniciar y establecer una suspensión celular, alcanzando un porcentaje de formación de callo desde un 86% hasta un 100 %.



Choi *et al.* (1997), obtuvo una gran proliferación de callos opacos, blancos y friables de *Acanthopanax koreanum* N. desarrollados sobre medio con 4.5 μ M de 2,4-D siendo un punto crítico para la inducción de callos embriogénicos. Esta información confirma la influencia de 2,4-D en la consistencia del callo.

En la misma gráfica se aprecia el comportamiento del tratamiento testigo (T1 = 0 μ M auxina /0 μ M BAP) que no formó callo y los tratamientos 11(0 μ M auxina /25 μ M BAP) y 21(0 μ M auxina/50 μ M BAP) que alcanzaron un 93.33% de formación de callo en ambos casos. Estos callos fueron de gran tamaño, color amarillo, consistencia dura y ausencia de morfogénesis además que se observó un proceso necrótico del material vegetal. Lo cual confirma los resultados obtenidos por Yamazaki *et al.* (1991).

Es importante destacar que si bien la mayoría de los tratamientos formaron callos, éstos poseían diferentes características morfológicas que determinaron su empleo para la siguiente fase experimental, como el caso de 2,4-D descrita anteriormente. Los tratamientos suplementados con ANA y AIA formaron callos provistos principalmente de raíces, la adición de BAP formó callos sin raíces y de consistencia dura debido a la acción inhibidora de BAP a elevadas concentraciones. (Bu'lock 1990, Hurtado y Merino 1991) ni brotes (Yamazaki, 1991 y Choi *et al.* 1997).

4.2.1.2. Porcentaje de Formación de callos a los 56 días.-

Pasados 56 días de la inducción a callo se realizó la segunda evaluación y a través del Análisis de Varianza descrito en el Cuadro N° 11 se detectaron las siguientes diferencias.



Cuadro N° 11. Análisis de Varianza Factorial para el Porcentaje de Formación de Callo a los 56 días de inducción.

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Significancia
Tipo de Auxina	2	4.1001	2.05	2.99	0.0534	N.S.
[C] Auxina	2	3.5361	1.768	2.58	0.0794	N.S.
Tipo Auxina * [C] Auxina	4	10.085	2.5212	3.68	0.007	**
[C] de BAP	2	4.3219	2.1609	3.16	0.0458	*
Tipo de Auxina * [C] BAP	4	7.5147	1.8786	2.74	0.0311	*
[C] Auxina * [C] BAP	4	6.32	1.58	2.31	0.0613	N.S.
Error	135	92.449	0.6848			
Total	153	129.42				

* Significativo ** Altamente Significativo **NS** No Significativo

CV = 8.36 %

En los efectos principales de Tipo de Auxina y Concentración de Auxina no se encontraron diferencias estadísticas, este resultado se debe a que las diferentes auxinas empleadas y a diferentes concentraciones se encuentran son recomendadas por Hurtado y Merino (1991). Por lo tanto, bajo estas condiciones los explantes respondieron a un fuerte estímulo hormonal formando callo.

Por otro lado en los efectos principales de la Concentración de BAP se encontraron diferencias significativas por lo que se realizó la Prueba de Duncan descrita a continuación.

Cuadro N° 12. Prueba Duncan (5%) para los efectos de la Concentración de BAP en el Porcentaje de Formación de Callo a los 56 días de inducción.

[C] de BAP (μ M)	Media (%)	Duncan
50	100	A
25	98.302	AB
0	94.51	B



La prueba de Duncan del Cuadro N° 12, indica que existe una diferencia significativa entre las concentraciones 50 μ M y 0 μ M, siendo esta última estadísticamente inferior. Esta diferencia en el porcentaje de formación de callo se debe a la falta de la citocinina BAP porque la presencia de ésta en el medio de cultivo combinada con diferentes auxinas incrementan la división celular.

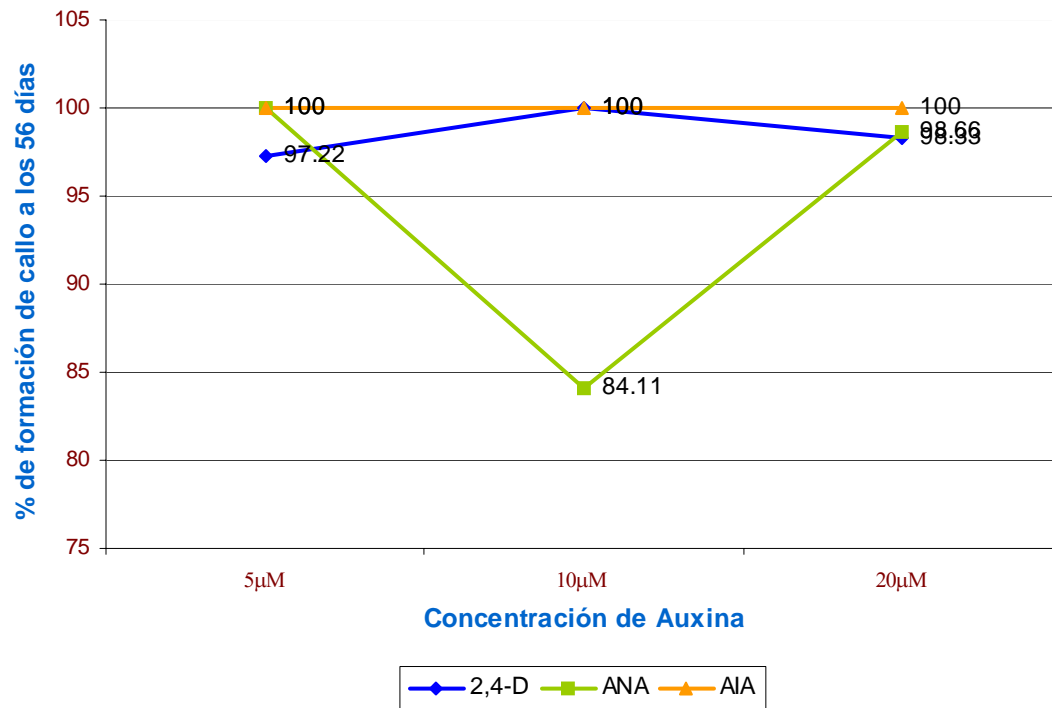
Este resultado concuerda con el trabajo realizado por Marcovillica (1989), en *Stevia rebaudiana* donde obtuvo una gran proliferación de callos cuando fueron suplementados con BAP y 2,4-D a los 60 días de evaluación. También Yamazaki (1991) obtuvo una gran proliferación de callos de *Stevia rebaudiana* cuando adicionó 25 μ M y 50 μ M al medio de cultivo MS.

En la interacción de la Concentración de Auxina por Concentración de BAP no se encontraron diferencias estadísticas significativas, mientras que la interacción del Tipo de Auxina por la Concentración de Auxina y Tipo de Auxina por Concentración de BAP se detectaron diferencias estadísticas por lo que se realizaron los análisis de efectos simples y las gráficas correspondientes a estas interacciones que se presentan a continuación.

Cuadro N° 13. Análisis de los Efectos Simples de la Interacción de Tipo de Auxina por Concentración de Auxina del Porcentaje de Formación de Callo a los 56 días de inducción.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft 0.05	Ft 0.01	Significancia
Tipo de Auxina ([C] 5 Auxina)	2	2.91715	1.4586	2.1299	3.07	4.76	N.S.
Tipo de Auxina ([C] 10 Auxina)	2	14.0365	7.0183	10.249	3.07	4.76	**
Tipo de Auxina ([C] 20 Auxina)	2	2.7969	1.3985	2.0421	3.07	4.76	N.S.
[C] de Auxina (2,4-D)	2	2.28982	1.1449	1.6719	3.07	4.76	N.S.
[C] de Auxina (ANA)	2	15.3541	7.6771	11.211	3.07	4.76	**
[C] de Auxina (AIA)	2	3.74076	1.8704	2.7313	3.07	4.76	N.S.
Error Experimental	135	92.4486	0.6848				

* Significativo ** Altamente Significativo **NS** No Significativo



Gráfica N° 6. Efectos Simples del Tipo de Auxina dentro de cada Concentración de Auxinas sobre el Porcentaje de Formación de Callo a los 56 días.

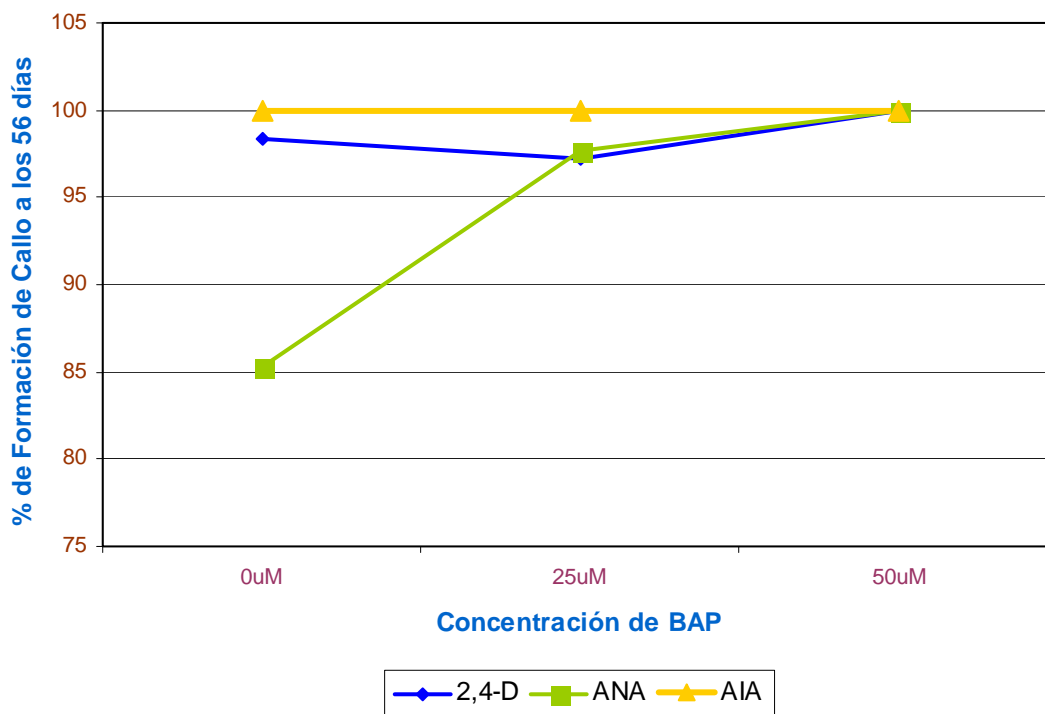
En la Gráfica N° 6, ANA (84.11%) a una [C] de 10 μM es estadísticamente inferior al resto de las interacciones en el porcentaje de formación de callo a los 56 días. Roca y Mrongnski (1989), Bu'lock (1990) y Hurtado y Merino (1991) mencionan que BAP promueve la división celular e incrementa la actividad celular resultando en una proliferación de células y callos. La ausencia de este regulador de crecimiento puede ser la causa de esta disminución del porcentaje de formación de callos ya que esta disminución ocurre únicamente cuando el medio de cultivo está suplementado sólo con ANA.



Cuadro Nº 14. Análisis de los Efectos Simples de la Interacción de Tipo de Auxina por Concentración de BAP del Porcentaje de Formación de Callo a los 56 días de inducción.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft 0.05	Ft 0.01	Significancia
[C] BAP (2,4-D)	2	0.22452	0.11226	0.1639	3.06	4.766	N.S.
[C] BAP (ANA)	2	11.5805	5.79027	8.4554	3.06	4.766	**
[C] BAP (AIA)	2	0	0	0	3.06	4.766	N.S.
Tipo de Auxina([C] 0uM BAP)	2	12.1471	6.07357	8.8691	3.06	4.766	**
Tipo de Auxina([C] 25uM BAP)	2	0.248	0.124	0.1811	3.06	4.766	N.S.
Tipo de Auxina([C] 50uM BAP)	2	0	0	0	3.06	4.766	N.S.
Error Experimental	135	92.4486	0.6848				

* Significativo ** Altamente Significativo **NS** No Significativo



Gráfica Nº 7. Efectos Simples del Tipo de Auxina dentro de cada Concentración de BAP sobre el Porcentaje de Formación de Callo a los 56 días.

En la Gráfica Nº 7 se aprecia el comportamiento de cada auxina dentro de cada concentración de BAP. El Análisis de Efectos Simples indica que existen



diferencias altamente significativas del Tipo de Auxina en la Concentración 0 μ M de BAP.

La ausencia de BAP provocó una disminución en el Porcentaje de Formación de Callo cuando fueron suplementados los tratamientos únicamente con ANA. Este resultado indica que existe una acción sinérgica en la formación de callo cuando se combinan ambos reguladores de crecimiento que fue reflejado en el incremento del porcentaje cuando fueron combinados con BAP.

4.2.1.2.1. Análisis del comportamiento general de los tratamientos.-

A continuación se presenta el análisis de varianza para los 30 tratamientos que detectó diferencias altamente significativas.

Cuadro N° 15. Análisis de Varianza para los 30 Tratamientos del Porcentaje de Formación de Callo a los 56 días de inducción.

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Significancia
Auxina* [C]* BAP	29	507.0947	17.486	30.16	0.0001	**
Error	142	82.315	0.579			
Total	171	589.409				

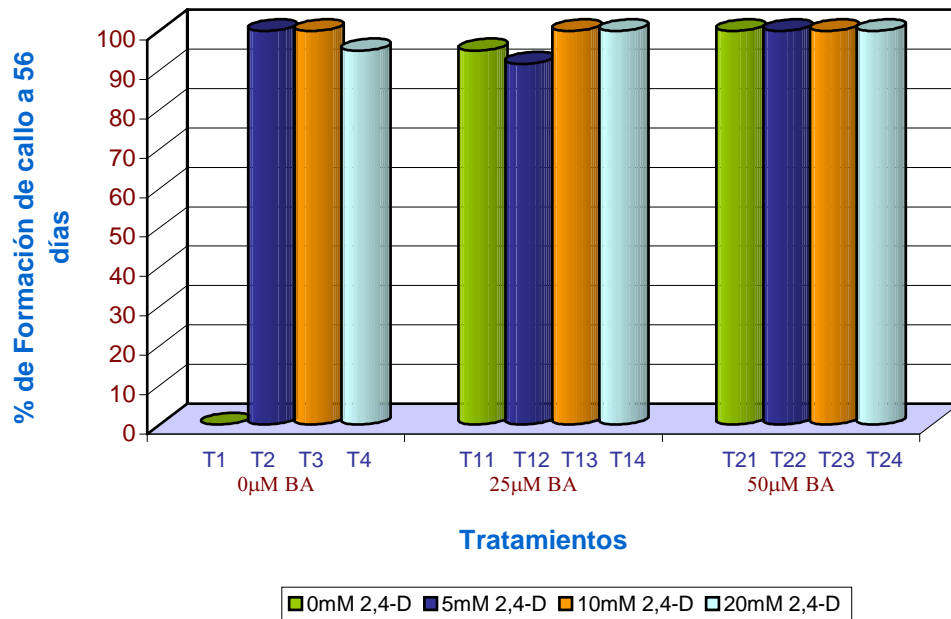
* Significativo ** Altamente Significativo NS No Significativo

$$CV = 7.94\%$$

Al existir diferencias altamente significativas entre todos los tratamientos se realizó la Prueba de Duncan (Anexo N° 4), que determinó que la diferencia principal radicaba en los tratamientos 6 y 1 que obtuvieron los promedios mas bajos, 61.67% y 0 % respectivamente. El descenso en el porcentaje de formación de callo de ambos tratamientos se debe a: El tratamiento 6, no fue suplementado con BAP, esta ausencia derivó en la falta de desarrollo del callo. En el caso del tratamiento 1, éste no formó callos debido a la ausencia de reguladores de crecimiento en dicho tratamiento.



Los 28 tratamientos restantes mantuvieron sus características morfológicas con la diferencia que a los 56 días, los tratamientos suplementados con ANA, AIA y BAP iniciaron un proceso de necrosamiento debido principalmente al estrés del cambio de medio de cultivo.



Gráfica Nº 8. Diferencias entre medias del Porcentaje de Formación de Callos friables y los tratamientos: 1, 11 y 21 a los 56 días de inducción.

La Gráfica Nº 8, muestra los tratamientos suplementados con 2,4-D que mantuvieron constante su proliferación de callos friables sin derivar en morfogénesis formando una masa amorfa de color beige y en estado vigoroso libre de procesos necróticos. El tratamiento 1 no formó callo y en algunos casos formó vitroplantas carentes de pigmentación y en proceso de vitrificación.

Por otro lado, los tratamientos suplementados con 25µM (T11) y 50µM (T21) de BAP alcanzaron un 95 % y 100% de formación de callo respectivamente. Se formaron callos compactos de gran tamaño, con un elevado nivel de transpiración



Se observó signos profundos de envejecimiento y necrosamiento tornándose éstos de color negro lo que oxidó el medio de cultivo a los 56 días.

El análisis estadístico a los 84 días (tercera evaluación en Anexos 5 y 6) presentó los mismos resultados del Análisis de Varianza a los 56 días de evaluación. En este sentido, sus resultados y discusiones son similares a los presentados en el análisis del comportamiento de los callos a los 56 días.

4.2.2. Peso de Callo.-

El peso del callo permitió determinar indirectamente el crecimiento de los callos a los 28, 56 y 84 días, permitiendo conocer su desarrollo a través del tiempo. El incremento de peso dependió directamente del balance auxina-citocinina porque estos reguladores de crecimiento promovieron una gran variedad de callos, que afectó notoriamente al peso de éstos marcando grandes diferencias entre unos y otros tratamientos reflejándose en el análisis estadístico que a continuación se presenta.

4.2.2.1. Peso de Callo a los 28 días.-

En el análisis de varianza expuesto en el Cuadro N° 16 se encontró que los efectos principales de los factores: Tipo de Auxina, Concentración de Auxina, Concentración de BAP y sus respectivas interacciones no presentan diferencias estadísticas significativas.



Cuadro N° 16. Análisis de Varianza Factorial para el Peso de Callo a los 28 días de inducción.

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Significancia
Tipo de Auxina	2	0.3991	0.1995	2.66	0.061	N.S
[C] Auxina	2	0.3825	0.1912	2.74	0.068	N.S
Tipo Auxina * [C] Auxina	4	0.4809	0.1202	1.73	0.148	N.S
[C] de BAP	2	0.1259	0.0629	0.9	0.408	N.S
Tipo de Auxina * [C] BAP	4	0.5016	0.1254	1.8	0.133	N.S
[C] Auxina * [C] BAP	4	0.5016	0.0963	1.38	0.243	N.S
Error	134	0.3854	0.0697			
Total	152	11.6508				

* Significativo ** Altamente Significativo **NS** No Significativo

$$CV = 16.62\%$$

Si bien el análisis de varianza no detectó diferencias estadísticas significativas se observó una superioridad en el peso debido a la gran proliferación de raíces y tejidos callosos de consistencia dura promovida por los tratamientos suplementados con AIA y ANA que cumplen la función, a diferentes concentraciones, de desarrollar raíces como indican Ramírez (1989), Bu'Lock (1990) y Hurtado y Merino (1991).

En cambio los tratamientos suplementados con 2,4-D alcanzaron pesos bajos con una proliferación masiva de callos friables sin evidencias de ningún tipo de morfogénesis. Al respecto, Mejia (1988) y Hurtado y Merino (1991), explican que esta auxina suprime esta acción en las células. Esta atribución fundamental de friabilidad de los callos suplementados con 2,4-D los hace aptos para el propósito fundamental de este trabajo de investigación, ya que es imprescindible que exista una buena desagregación del callo para formar una suspensión celular.

En el Análisis de Varianza tampoco se detectó diferencias estadísticas entre las diferentes Concentraciones de Auxinas debido a que el rango empleado en las concentraciones de auxinas se encuentra dentro del recomendado por Roca y Mrongnski (1989) A estas concentraciones se produce normalmente el



alargamiento celular y con un balance adecuado de citocininas y auxinas se promueve la formación de callo. (Mgíones *et al.* 1992). Otro factor que influyó en este resultado es el corto tiempo transcurrido desde la inducción a callo hasta la primera evaluación.

También se observó que a los 28 días de inducción a callo que si bien el análisis de varianza no detectó diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de BAP si se observaron cambios morfológicos según la presencia o ausencia de ésta. La ausencia de BAP y la presencia de ANA y AIA en el medio de cultivo permitieron el desarrollo de raíces. La formación de raíces fue inhibida cuando en el medio de cultivo se encontraba BAP en las concentraciones de 25 μ M y 50 μ M. Al respecto Hurtado y Merino (1991) indican que a elevadas concentraciones BAP inhibe la formación de raíces pero a bajas concentraciones (0.05 μ M) induce a la formación de raíces laterales.

En relación a este punto, Castillo (1994), obtuvo una proliferación de callos (77%), con raíces (44.4%) del total de explantes de hojas sometidos a 8.06 μ M de ANA y 6.66 μ M de BAP en Muña Blanca (*Minthos Tachus andina Brett epling*), con pesos de callo y raíces de 1.33g aproximadamente, además, los tratamientos sometidos a concentraciones mayores de BAP disminuyeron paulatinamente la formación de raíces, por lo que se corrobora que a concentraciones altas de BAP como ser 25 μ M y 50 μ M, empleadas en la presente investigación, inhibe la formación de raíces.

4.2.2.1.1. Análisis del comportamiento general de los tratamientos.-

Para evaluar el comportamiento de los 30 tratamientos se realizó un Análisis de Varianza descrito a continuación en el Cuadro N° 17.



Cuadro Nº 17. Análisis de Varianza para los 30 Tratamientos del Peso Total de Callo a los 28 días de inducción.

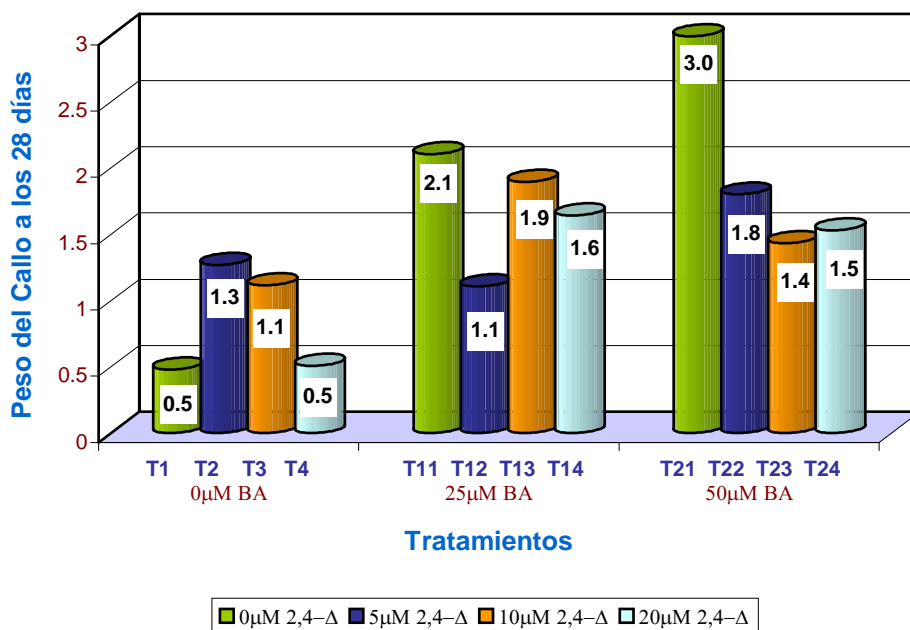
FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Significancia
Auxina* [C]* BAP	29	4.357668	0.150265	1.77	0.0156	*
Error	140	11.8863	0.0849			
Total	169	16.24405				

* Significativo ** Altamente Significativo **NS** No Significativo

CV = 18.32%

El Análisis de Varianza indica que existen diferencias significativas entre los 30 tratamientos y los resultados de la Prueba de Duncan (Anexo 7) muestran que los tratamientos 5, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 25, 28, 29 y 30 no presentan diferencias estadísticas significativas y son estadísticamente superiores al resto de los tratamientos. Es probable que estos tratamientos sean superiores porque las combinaciones realizadas para cada uno de estos tratamientos promovieron una buena formación de callo que en la mayoría de los casos fueron de consistencia dura y desarrollaron morfogénesis lo que afectó al peso de los callos.

Es importante destacar que los callos formados por la auxina 2,4-D fueron altamente friables y adecuados para el establecimiento de suspensiones celulares, mientras que el resto de los tratamientos formaron callos compactos y en algunos casos con raíces laterales, siendo estos inadecuados para los objetivos de esta investigación, por lo que no se los consideró en la selección final de tratamientos aptos para la siguiente fase.



Gráfica Nº 9. Diferencias entre medias del Peso Total de Callos friables y los tratamientos: 1, 11 y 21 a los 28 días de inducción.

En la Gráfica Nº 9, se describen todos los tratamientos suplementados con 2,4-D debido a sus características morfológicas mencionadas anteriormente y su utilidad para la siguiente fase experimental siendo los tratamientos 13, 14 y 22 con peso de 1.8968g, 1.6411 g y 1.8019 g respectivamente, superiores estadísticamente al resto de los tratamientos suplementados con dicha auxina. El tratamiento 24 con una media de 1.5317g fue superior a los tratamientos 2, 3, 4, 12 y 23 con medias que oscilan entre 0.5081g y 1.435 g.

Es evidente que los tratamientos suplementados con 2,4-D y BAP tuvieron un mayor rendimiento en peso que aquellos que solo estaban adicionados con 2,4-D, siendo este resultado importante, ya que se demuestra la influencia en el peso y por consiguiente en el crecimiento del callo por la acción conjunta de ambos reguladores de crecimiento, porque BAP interviene en la división celular y 2,4-D en el alargamiento celular además de ser estimulador de la respiración, hecho correlacionado con el crecimiento del explante. Choi *et al.* 1997, reportó un



incremento en peso fresco de los callos suplementados con 2,4-D combinados con BAP y KIN, lo que fue corroborado en el presente estudio.

Dentro de la gráfica, también están incluidos los tratamientos 11 y 21 que solo fueron suplementados con BAP, éstos tuvieron una respuesta favorable en la variable peso ya que alcanzaron promedios de 2.995 g y 2.1052 g, formando callos compactos y sin indicios de morfogénesis. Finalmente, el tratamiento 1, que fue empleado como testigo, por no estar suplementado con ningún regulador de Crecimiento ($0\mu\text{M}$ BAP y $0\mu\text{M}$ Auxinas), obtuvo el menor peso promedio, por lo que los explantes formaron plantas vitrificadas y no callo. Este resultado demuestra que la formación de callo en *Stevia rebaudiana* B. depende de la suplementación de auxinas y de BAP.

4.2.2.2. Peso de Callo a los 56 días.-

De acuerdo al análisis de varianza descrito del Cuadro N° 18, en los efectos principales del Tipo de Auxina, Concentración de Auxina y Concentración de BAP, se detectaron diferencias estadísticas altamente significativas, también en las interacciones de Concentración de Auxina por Concentración de BAP se detectaron diferencias altamente significativas por lo tanto existe una relación estrecha en esta interacción que influye directamente en el peso de callo.

No se encontraron diferencias estadísticas significativas en las interacciones de Tipo de Auxina por Concentración de Auxina y Tipo de Auxina por Concentración de BAP en el Análisis de Varianza.



Cuadro N° 18. Análisis de Varianza Factorial para el Peso Total de Callo a los 56 días de inducción.

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Significancia
Tipo de Auxina	2	2.03389	1.01694	11.7	0.0001	**
[C] Auxina	2	1.10634	0.55317	6.37	0.0023	**
Tipo Auxina * [C] Auxina	4	0.58519	0.14629	1.68	0.1576	N.S.
[C] de BAP	2	1.20429	0.60215	6.93	0.0014	**
Tipo de Auxina * [C] BAP	4	0.29355	0.07338	0.84	0.4993	N.S.
[C] Auxina * [C] BAP	4	1.30417	0.32604	3.75	0.0064	**
Error	130	11.2954	0.08689			
Total	148	17.8341				

* Significativo ** Altamente Significativo **NS** No Significativo

$$CV = 17.19\%$$

A continuación se presentan las respectivas pruebas de Duncan para los efectos principales y el análisis de las interacciones detectadas en el Análisis de Varianza del Cuadro N° 18.

Cuadro N° 19. Prueba Duncan (5%) para los efectos del Tipo de Auxina en el Peso Total a los 56 días de inducción a callo.

Tipo de Auxinas	Media(g)	Duncan
AIA	2.5318	A
ANA	2.1532	A
2,4-D	1.5331	B

De acuerdo a la prueba de Duncan, no se detectaron diferencias estadísticas entre AIA (2.53g) y ANA (2.15g). respectivamente. Sin embargo, sí se detectaron diferencias estadísticas altamente significativas con 2,4-D (1.5331g.) siendo inferior a los pesos promedios de las otras dos auxinas. Según Hurtado y Merino (1991), la superioridad en peso puede deberse a la acción morfogénica de ANA y AIA que promovieron la proliferación masiva de callos compactos provistos de raíces.

Por otro lado, a los 56 días los tratamientos suplementados con AIA incrementaron su peso promedio en un 30.8% con 0.7799g; los tratamientos suplementados con



ANA incrementaron su peso en un 21.25% con 0.4577 g y los tratamientos suplementados con 2,4-D incrementaron su peso en un 10.82% con 0.1659 g. Estos datos indican que existió un crecimiento de los callos en 28 días que varió de 10% a 30%, aproximadamente.

Cuadro N° 20. Prueba Duncan (5%) para los efectos de la Concentración de Auxina en el Peso Total a los 56 días de inducción a callo.

[C] de Auxinas (μM)	Media (g)	Duncan
5	2.4606	A
10	1.8833	B
20	1.7865	B

De acuerdo a la prueba de Duncan, se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones $5\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$ y $20\mu\text{M}$ alcanzando un mayor peso promedio los callos con la concentración de auxinas mas baja. Sin embargo, el promedio de peso de las concentraciones de $10\mu\text{M}$ y $20\mu\text{M}$ tuvieron un comportamiento estadístico análogo entre ellas.

Esta superioridad en peso ejercida por la concentración menor de auxina se atribuye a dos factores, el primero a que un exceso de auxinas puede suprimir la división celular derivando en la disminución o detención del crecimiento celular citado por Ramírez (1989) y Hurtado y Merino (1991), el segundo, al parecer estaría relacionado a que los mayores pesos se registraron en aquellos tratamientos que derivaron en morfogénesis.

Cuadro N° 21. Prueba Duncan (5%) para los efectos de la Concentración de BAP en el Peso Total a los 56 días de inducción a Callo.

[C] de BAP (μM)	Media (g)	Duncan
25	2.3239	A
50	2.149	A
0	1.6905	B



Según la prueba de Duncan son estadísticamente iguales los efectos de las concentraciones 25 μ M con 2.3239 g y 50 μ M con 2.149 g, mientras que los efectos de la concentración de 0 μ M con 1.6905 g. es estadísticamente inferior a las otras concentraciones. También se encontró un incremento en peso de 0.7127 g de los callos sometidos a una concentración de 25 μ M, mientras que se halló un incremento de 0.6262g cuando se adicionó 50 μ M de BAP. La presencia de BAP en los tratamientos, promovió una mayor división celular que permitió un mayor incremento en peso que aquellos tratamientos que no fueron suplementados con BAP

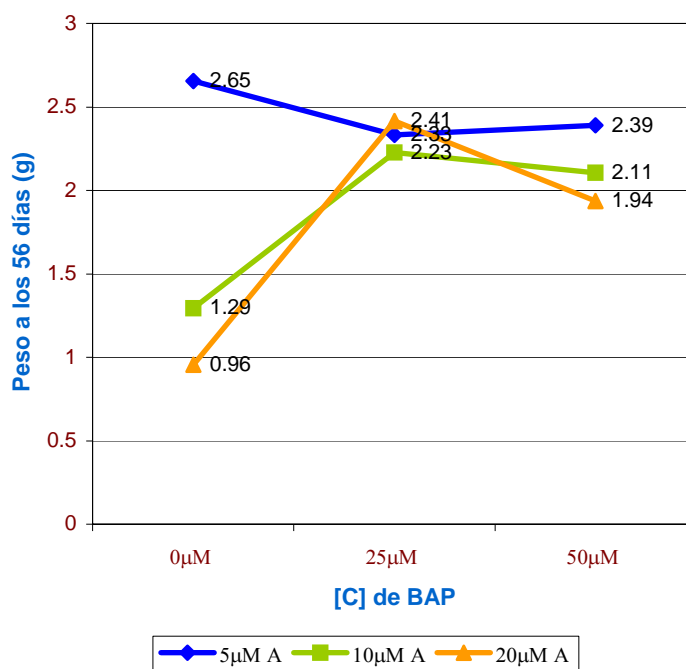
Finalmente se registró un incremento en peso de 0.033 g cuando no se adicionó BAP al medio de cultivo. Estos resultados demuestran la acción favorable de BAP que derivó en un mayor crecimiento y desarrollo de los callos. No obstante, la ausencia de BAP en aquellos tratamientos que solo fueron tratados con auxinas tuvieron un menor incremento en el desarrollo del callo como indican Roca y Mrongnski (1989), Hurtado y Merino (1991) y Mgliones *et al.* (1992).

Yamasaki *et al.* 1991, emplearon concentraciones de 30 μ M, 50 μ M de BAP y 0 μ M de Auxinas, donde obtuvieron una gran formación de callos compactos a partir de raíces de *Stevia rebaudiana*, mientras que a una concentración 0 μ M no obtuvieron callo. En esta investigación se pudieron repetir estos resultados además se demostró las relaciones existentes entre 2,4-D, ANA y AIA y BAP que influyeron positivamente en el incremento del peso de callo.



Cuadro Nº 22. Análisis de los Efectos Simples de la interacción de la Concentración de Auxina por la Concentración de BAP del Peso Total de Callo a los 56 días de inducción.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft 0.05	Ft 0.01	Significancia
[C]Auxina ([C] 0 μ M BAP)	2	4.862102	2.4311	27.979	3.07	4.77	**
[C] Auxina ([C] 25 μ M BAP)	2	0.09336	0.0467	0.537	3.07	4.77	N.S.
[C] Auxina ([C] 50 μ M BAP)	2	0.114325	0.0572	0.658	3.07	4.77	N.S.
[C] BAP ([C] 5 μ M Auxina)	2	0.237174	0.1186	1.365	3.07	4.77	N.S.
[C] BAP ([C] 10 μ M Auxina)	2	0.650784	0.3254	3.745	3.07	4.77	*
[C] BAP ([C] 20 μ M Auxina)	2	3.230054	1.615	18.588	3.07	4.77	**
Error Experimental	130	11.2954	0.0869				



Gráfica Nº 10. Efectos Simples de las Concentraciones de Auxina dentro de cada Concentración de BAP sobre el Peso Total de Callo a los 56 días de Inducción.

En la Gráfica Nº 10, se observa el comportamiento de las auxinas en cada concentración de BAP del peso de los callos a los 56 días de inducción. El comportamiento de los efectos simples de las concentraciones de las auxinas en



las concentraciones de 25 μ M y 50 μ M de BAP, no presentan diferencias estadísticas significativas.

Sin embargo, en la concentración 0 μ M de BAP el efecto de las auxinas en el peso alcanzaron diferencias altamente significativas según el análisis de efectos simples del Cuadro N° 22, por lo que a una concentración de 5 μ M el peso promedio fue 2.65g, siendo éste superior a los pesos que alcanzaron las concentraciones 10 μ M y 20 μ M.

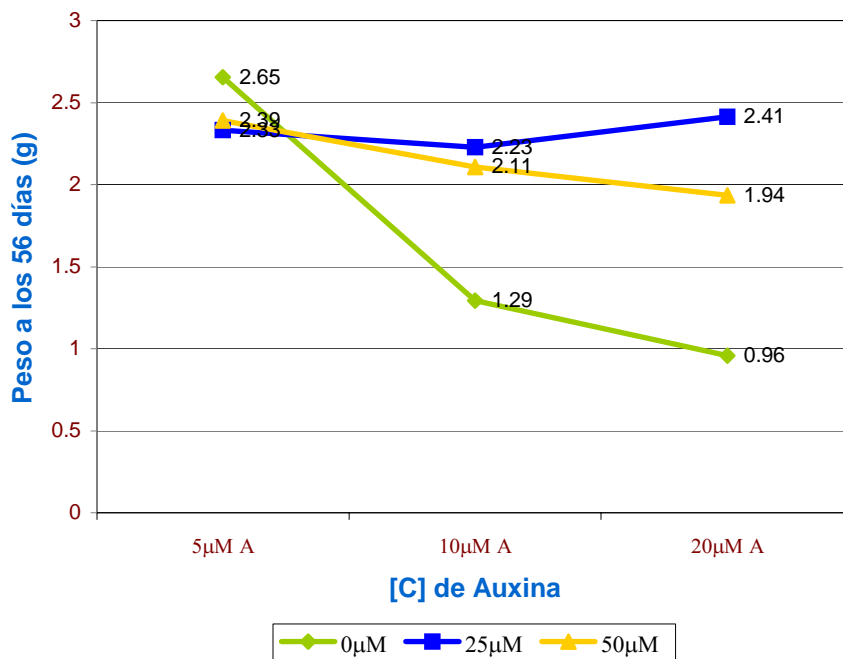
Esta diferencia del efecto de la concentración 5 μ M de las auxinas se atribuye a que a esta concentración se desarrolla mejor la organogénesis (formaron raíces y callos de gran tamaño y de consistencia dura) que fue promovida por ANA y AIA cuando la concentración de BAP es 0 μ M. En el caso de 2,4-D, ésta formó callos friables y de buen tamaño frente a las concentraciones de 10 μ M y 20 μ M. Ramírez (1989) y Hurtado y Merino (1991) indican que este comportamiento puede deberse a la acción adversa de los reguladores de crecimiento los cuales a concentraciones elevadas se inhibe el crecimiento y desarrollo del callo.

Por lo tanto, se puede apreciar la acción sinérgica que existe cuando se combinan estas auxinas con BAP, porque no existen diferencias significativas en peso con su presencia a diferentes concentraciones. Este resultado es complementado por el trabajo de Skoog y Miller (1957), citado por Hurtado y Merino (1991), que demostraron que la acción de las auxinas o citocininas por separado no tienen un efecto importante en el crecimiento y desarrollo del callo, mientras que al emplearlas simultáneamente éstas incrementaron su desarrollo notoriamente en callos de tabaco.

También la presencia de BAP inhibió la formación de raíces lo que influyó decisivamente en el peso de callo a los 56 días de inducción. Además, la presencia de BAP a diferentes concentraciones promovió la formación de callos de



buen tamaño y de consistencia dura ó blanda que según Mateo (1988) citado por Cuellar (1996), depende de la combinación con el tipo de auxina.



Gráfica N° 11. Efectos Simples de las Concentraciones de BAP dentro de cada Concentración de Auxina sobre el Peso Total de Callo a los 56 días de inducción.

En la Gráfica N° 11. se aprecia el comportamiento de las concentraciones de BAP en cada concentración de Auxina. En las concentraciones 5µM y 10µM de Auxina el comportamiento de BAP es semejante en todas sus concentraciones y no presenta diferencias según el análisis de efectos simples del Cuadro N° 22.

En las concentraciones de 10µM y 20 µM de Auxina, en las concentraciones de BAP existen diferencias significativas y altamente significativas, respectivamente según el análisis de efectos simples del Cuadro N° 22. En la gráfica, se muestra que es significativamente superior la concentración 25µM de BAP con 2.41g. en relación a la concentración de 0µM con 0.96g. También el análisis de los efectos simples detectó que existen diferencias significativas entre las tres



concentraciones de BAP dentro de la concentración 10 μ M de la auxina. La concentración de 0 μ M de BAP fue inferior a las concentraciones de 25 μ M y 50 μ M. Esta diferencia se debe al sinergismo que se presenta en el crecimiento y desarrollo del callo cuando se emplean citocininas y auxinas en concentraciones óptimas (Mejía 1988 y Hurtado y Merino 1991).

4.2.2.2.1. Análisis del comportamiento general de los tratamientos.-

El Análisis de Varianza del Cuadro N° 23, muestra que existe una diferencia altamente significativa entre tratamientos (Auxina * Concentración * BAP), que incluye las tres concentraciones de BAP que no formaron parte del análisis factorial 3x3x3.

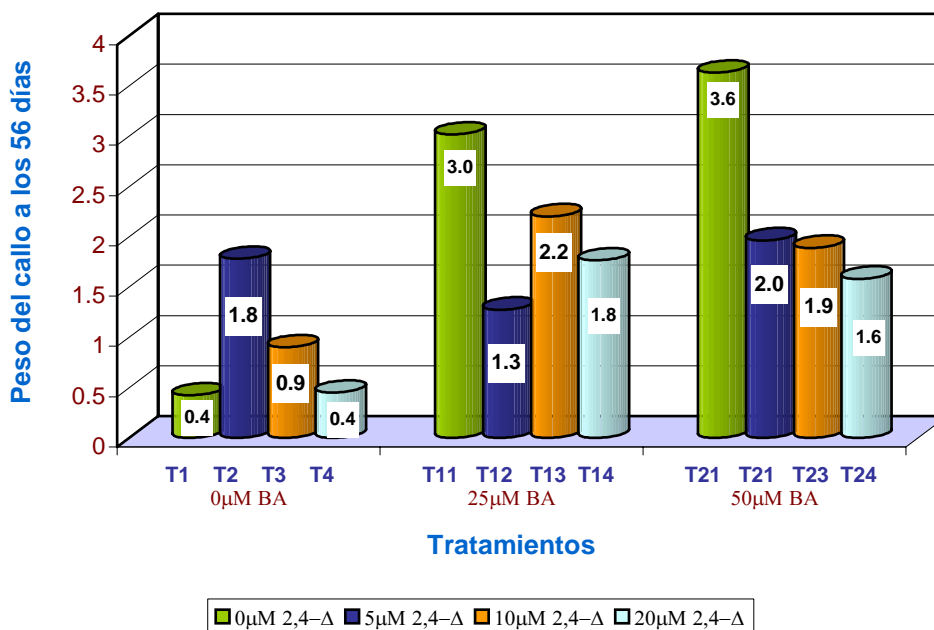
Cuadro N° 23. Análisis de Varianza para los 30 Tratamientos del Peso Total de Callo a los 56 días de inducción.

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Significancia
Auxina* [C]* BAP	29	8.89264	0.30664	2.72	0.0001	**
Error	136	15.3383	0.1127			
Total	165	24.2309				

Al encontrarse diferencias entre tratamientos se realizó la prueba de Duncan (Anexo N° 8) que detectó las siguientes diferencias: Los tratamientos 2, 5, 8, 9, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 27, 28, 29 y 30, no presentan diferencias estadísticas significativas, en el peso de callo y son significativamente superiores a los demás tratamientos. Esta superioridad en peso se atribuye a las siguientes causas: a) es posible que se deba a la morfogénesis promovida por los tratamientos suplementados con ANA y AIA que influyó en el peso de callos, b) la presencia de BAP en combinación con las distintas auxinas en el medio de cultivo, permitió una gran proliferación de tejido tipo callo que según su consistencia (compactos y friables) derivó en un incremento en peso. c) la presencia de BAP



permitió una mejor proliferación de callo que aquellos tratamientos que no contenían BAP.



Gráfica N° 12. Diferencias entre medias del Peso Total de Callos friables y los tratamientos: 1, 11 y 21 a los 56 días de inducción.

En la Gráfica N° 12, se encuentran los tratamientos suplementados con 2,4-D a diferentes concentraciones que alcanzaron pesos que oscilan entre 0.45 g y 1.98 g debido a la presencia o ausencia de BAP. Aquellos tratamientos que no fueron suplementados con BAP a excepción del tratamiento 2 obtuvieron los pesos más bajos en este grupo de tratamientos. Los demás tratamientos que fueron suplementados con BAP a diferentes concentraciones, a excepción de los tratamientos 12 y 24 son estadísticamente iguales y superiores al resto de los tratamientos suplementados con 2,4-D. Sin embargo, el tratamiento 24 (20µM 2,4-D y 50µM BAP) con 1.58g. fue el mas sobresaliente por su alta friabilidad y elevado porcentaje de supervivencia registrado hasta la fecha.



Los tratamientos 1, 11 y 21 que también están incluidos en la gráfica pero que no forman parte del diseño experimental factorial 3x3x3 presentaron el siguiente comportamiento: Los tratamientos 11 (25µM) con 3.0262 g y 21 (50µM) con 3.6319 g son estadísticamente y morfológicamente iguales, formando callos de gran tamaño, de consistencia dura y en proceso necrótico. El tratamiento control (T1: 0µM Auxina y 0µM BAP) alcanzó el peso mas bajo (0.42 g), porque no formó callo. Estos resultados también fueron obtenidos en la investigación realizada por Yamazaki *et al.* 1991.

4.2.2.3. Peso de Callo a los 84 días.-

A los 84 días de inducción a callo, el Análisis de Varianza descrito en Cuadro N° 24, muestra que los efectos principales de Tipo de Auxina y Concentración de BAP presentan diferencias altamente significativas, mientras que la Concentración de Auxina no presenta diferencias estadísticas. Las tres interacciones que están consideradas dentro del modelo (Tipo de Auxina por Concentración de Auxina; Tipo de Auxina por Concentración de BAP y Concentración de auxina por Concentración de BAP) no presentan diferencias estadísticas.

Cuadro N° 24. Análisis de Varianza Factorial para el Peso Total de Callo a los 84 días de inducción.

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Significancia
Tipo de Auxina	2	2.6218	1.3109	14.4	0.0001	**
[C] Auxina	2	0.1202	0.0601	0.66	0.5199	N.S
Tipo Auxina * [C] Auxina	4	0.6519	0.163	1.79	0.1406	N.S
[C] de BAP	2	1.8338	0.9169	10.08	0.0001	**
Tipo de Auxina * [C] BAP	4	0.7244	0.1811	1.99	0.1056	N-S.
[C] Auxina * [C] BAP	4	0.7633	0.1908	2.1	0.0905	N.S
Error	69	6.2791	0.091			
Total	87	13.263				

* Significativo ** Altamente Significativo **NS** No Significativo

$$CV = 17.32\%$$



A continuación se presentan las pruebas de Duncan del Tipo de Auxina y Concentración de BAP.

Cuadro N° 25. Prueba Duncan (5%) para los efectos del Tipo de Auxina en el Peso Total a los 84 días de inducción a callo.

Tipo de Auxinas	Media(g)	Duncan
AIA	3.0039	A
ANA	2.7576	A
2,4D	1.5618	B

Como se pueden observar en la prueba de Duncan (Cuadro N° 25) AIA y ANA alcanzaron pesos promedios de 3 g y 2.75 g respectivamente siendo iguales entre ellas y significativamente superiores a 2,4-D con 1.56 g.

Los tratamientos suplementados con AIA aumentaron su peso promedio a 0.4221g, los tratamientos suplementados con ANA a 0.6044 g y los tratamientos suplementados con 2,4-D a 0.0287 g, por lo que se advierte un incremento en peso y tamaño en menor proporción respecto a las anteriores fechas. En el caso de AIA y ANA este incremento se debió a que promovieron la formación de callos provistos de raíces ó con la acción conjunta de BAP formando callos compactos y de gran tamaño, lo que hizo que fueran superiores a todos los tratamientos suplementados con 2,4-D, por otro lado los tratamientos suplementados con 2,4-D desarrollaron callos friables y no derivaron en morfogénesis haciéndolos útiles para la obtención de suspensiones celulares (Roca y Mrognski 1989).

Cuadro N° 26. Prueba Duncan (5%) para los efectos de la Concentración de BAP en el Peso Total a los 84 días de inducción a Callo.

[C] de BAP (μ M)	Media (g)	Duncan
50	2.5998	A
25	2.5637	A
0	1.4532	B



Según la prueba de Duncan, los pesos promedios de los callos suplementados con 25µM y 50µM no presentaron diferencias estadísticas significativas, mientras que la concentración de 0µM es estadísticamente inferior frente a las otras concentraciones. Esta superioridad en peso se atribuye a la acción estimuladora de BAP en el crecimiento y desarrollo del callo y a la acción conjunta existente con las auxinas ya que sin la presencia de la BAP (0µM) el peso registrado se debe exclusivamente a la acción de las auxinas.

4.2.2.3.1. Análisis del comportamiento general de los tratamientos.-

El Análisis de Varianza que fue empleado para detectar diferencias entre los 30 tratamientos descrito en el Cuadro N° 27, detecta diferencias altamente significativas entre tratamientos.

Cuadro N° 27. Análisis de Varianza para los 30 Tratamientos del Peso Total de Callo a los 84 días de inducción.

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Significancia
Auxina* [C]* BAP	29	7.66606	0.264347	3.19	0.0001	**
Error	68	5.6379	0.0829			
Total	97	13.304				

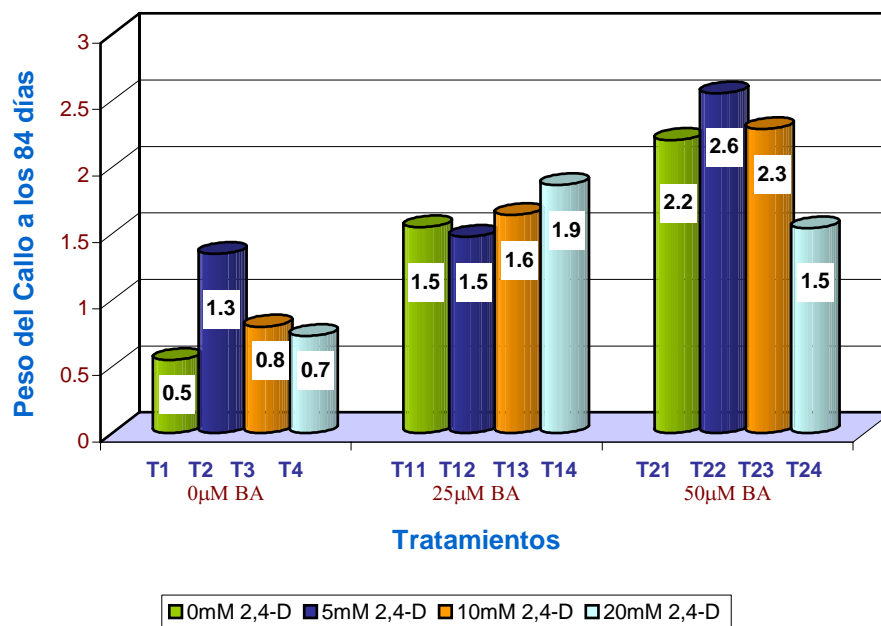
* Significativo ** Altamente Significativo **NS** No Significativo

CV = 16.92%

La prueba de Duncan (Anexo 9), muestra las siguientes diferencias entre tratamientos: Los tratamientos 19, 29, 16 y 5 no presentan diferencias estadísticas significativas entre ellos y son estadísticamente superiores al resto de los tratamientos debido a una gran formación de raíces, callos duros, pesados y en proceso necrótico. Por sus características morfológicas y pese a tener los mejores promedios en peso no son adecuados para esta investigación, por esta razón, se detalla a continuación los tratamientos suplementados con 2,4-D además de los



tratamientos testigos para auxina (aquellos que no formaron parte del diseño experimental 3x3x3).



Gráfica Nº 13. Diferencias entre medias del Peso Total de Callos friables y los tratamientos: 1, 11 y 21 a los 84 días de inducción.

La Gráfica Nº 13, muestra a los tratamientos suplementados con 2,4-D y combinada con BAP; estos tratamientos alcanzaron medias que oscilan entre 2.554 g y 0.731g. Según la prueba de Duncan los tratamientos 2, 12, 13, 14, 22, 23 y 24 son estadísticamente iguales entre sí y superiores a los tratamientos 3 y 4. Estos dos últimos tratamientos muestran poca eficiencia en el peso debido a la falta de BAP, porque existe una acción conjunta entre 2,4-D y la BAP que está demostrado en los tratamientos suplementados con 25μM y 50μM de BAP, y con las mismas concentraciones de 2,4-D incrementaron notoriamente su peso como es el caso del tratamiento 24 (20μM 2,4-D y 50μM BAP) que alcanza un peso promedio de 1.53 g. frente a 0.731g. del tratamiento 4, formando callos altamente friables y que son útiles según Roca y Mrognoski (1989) para el establecimiento de una suspensión celular. Los tratamientos 11 con 1.547g. y 21 con 2.204g.



tuvieron fuertes procesos necróticos derivados en la muerte de los callos, por lo que el peso total de los explantes disminuyó hasta un 50%. Finalmente el tratamiento testigo (T1) mantuvo hasta la fecha algunas *vitroplantas* vitrificadas y en su mayoría explantes de hoja completamente vitrificados.

4.2.3. Porcentaje de Supervivencia de Callo.-

Esta variable de respuesta permitió determinar el comportamiento a través del tiempo de los callos sometidos a diferentes concentraciones de auxinas y citocininas dado que la supervivencia es una variable determinante para poder continuar con la siguiente fase experimental. Hurtado y Merino (1991) afirman que en el proceso de senescencia se activan enzimas por la edad del cultivo, que interfieren en el crecimiento y desarrollo de los callos, llevándolos a la muerte con el transcurso del tiempo.

Según, Roca y Mrongnski (1989) el genotipo de la planta influye en la supervivencia de los callos. Otro factor que influye en esta variable, es la tolerancia al estrés por un manipuleo constante y por el cambio a un medio fresco de idénticas condiciones que el medio de inducción. Según Ponce *et al.* (1998), estos cambios de medio de cultivo promueven y permiten el desarrollo y crecimiento continuo de los callos.

En esta investigación se evaluó la supervivencia del callo, a los 56, 84 y 112 días después de los primeros 28 días de cada subcultivo, con una frecuencia de supervivencia de los callos que varía de 0% a 100%. Los resultados provenientes de los tres análisis de varianza son semejantes por lo que se presenta la discusión de éstos en la tercera y última evaluación a los 112 días de inducción a callo.

En las fotografías presentadas a continuación se muestran las características los callos que servirán para la interpretación de los resultados.



- **Callos Vivos**



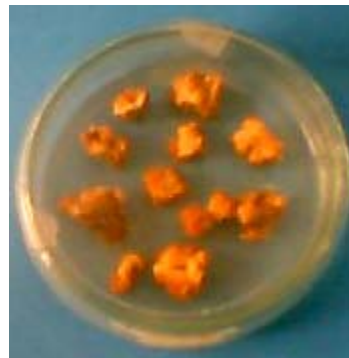
Fotografía N° 16: T7
(20 μ M ANA/0 μ M BAP)



Fotografía N° 17: T14
(5 μ M ANA/25 μ M BAP)

En las Fotografías 16 y 17 se exponen los callos vivos debido a su crecimiento activo, apariencia y color entre amarillo y marrón, asimismo por la apariencia y consistencia del medio de cultivo que fue cristalino y libre de contaminación.

- **Callos en proceso necrótico**



* Fuente Propia

Fotografía N° 18: T18
(5 μ M AIA/25 μ M BAP)



Fotografía N° 19: T21
(0 μ M Auxina/50 μ M BAP)

Los callos que se muestran en las Fotografías 18 y 19, son callos que presentaron un proceso de necrosamiento estimado principalmente por el cambio de color beige ó amarillo a marrón ó negro a partir de los extremos inferiores del callo. Muestran también, el contacto con el medio de cultivo, la supresión del crecimiento del callo y oxidación del medio de cultivo.



- **Callos Muertos**



* Fuente Propia

Fotografía N° 20: T8

(5 μ M AIA/25 μ M BAP)



Fotografía N° 21: T28

(5 μ M AIA/50 μ M BAP)

Los callos expuestos en las Fotografías 20 y 21 fueron considerados muertos por el aspecto del callo, de color café a negro, con el medio de cultivo en proceso ó completamente oxidado y con la supresión total de crecimiento reflejado en el peso del callo.

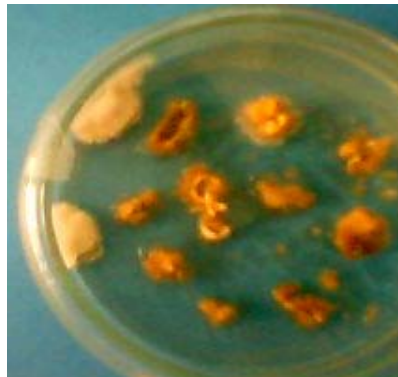
- **Callos contaminados.**



* Fuente Propia

Fotografía N° 22: T15

(5 μ M ANA/25 μ M BAP)



Fotografía N° 23: T19

(10 μ M AIA/25 μ M BAP)



El porcentaje de supervivencia de los callos también se vio afectado por pérdidas debido a la contaminación por hongos o bacterias de las cajas Petri como se puede apreciar en las Fotografías 22 y 23.

4.2.3.1. Porcentaje de supervivencia a los 56 días (4 semanas después del Primer Subcultivo).-

Después de transcurrir cuatro semanas del primer subcultivo se realizó la primera evaluación del porcentaje de supervivencia de callo y se obtuvieron los siguientes resultados.

Cuadro Nº 28. Análisis de Varianza Factorial para el Porcentaje de Supervivencia de Callo a los 56 días de inducción.

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Significancia
Tipo de Auxina	2	2.7418	1.3709	9.42	0.0001	**
[C] Auxina	2	0.3586	0.1793	1.23	0.2946	N.S.
Tipo Auxina * [C] Auxina	4	0.8896	0.2224	1.53	0.197	N.S.
[C] de BAP	2	0.4805	0.2402	1.65	0.1954	N.S.
Tipo de Auxina * [C] BAP	4	0.213	0.0533	0.37	0.8325	N.S.
[C] Auxina * [C] BAP	4	0.3645	0.0911	0.63	0.6445	N.S.
Error	143	20.806	0.1454			
Total	161	25.854				

* Significativo ** Altamente Significativo NS No Significativo

$$CV = 21.16 \%$$

A las cuatro semanas del primer subcultivo, el análisis de varianza detectó diferencias altamente significativas en el efecto principal del Tipo de Auxina. Por el contrario, la Concentración de Auxina y la Concentración de BAP no presentaron diferencias estadísticas.

No se encontraron diferencias estadísticas de las interacciones: Tipo de Auxina por Concentración de Auxina; Tipo de Auxina por Concentración de BAP y Concentración de Auxina por Concentración de BAP.



Cuadro N° 29. Prueba Duncan (5%) para los efectos del Tipo de Auxina en el Porcentaje de Supervivencia a los 56 días de inducción a callo.

Tipo de Auxinas	Media(%)	Duncan
2,4-D	88.889	A
AIA	70	B
ANA	59.63	B

Según la prueba de Duncan, la auxina 2,4-D con media de 88.88% de supervivencia de callo es significativamente superior frente a AIA y ANA.

4.2.3.1.1. Análisis del comportamiento general de los tratamientos.-

El Análisis de Varianza expuesto en el Cuadro N° 30, detectó diferencias altamente significativas entre tratamientos.

Cuadro N° 30. Análisis de Varianza para los 30 Tratamientos del Porcentaje de Supervivencia de Callo a los 56 días de inducción.

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Sig. al 1%
Auxina* [C]* BAP	29	10.5728	0.3645	2.79	0.0001	**
Error	150	19.63	0.1308			
Total	179	30.202				

* Significativo ** Altamente Significativo **NS** No Significativo

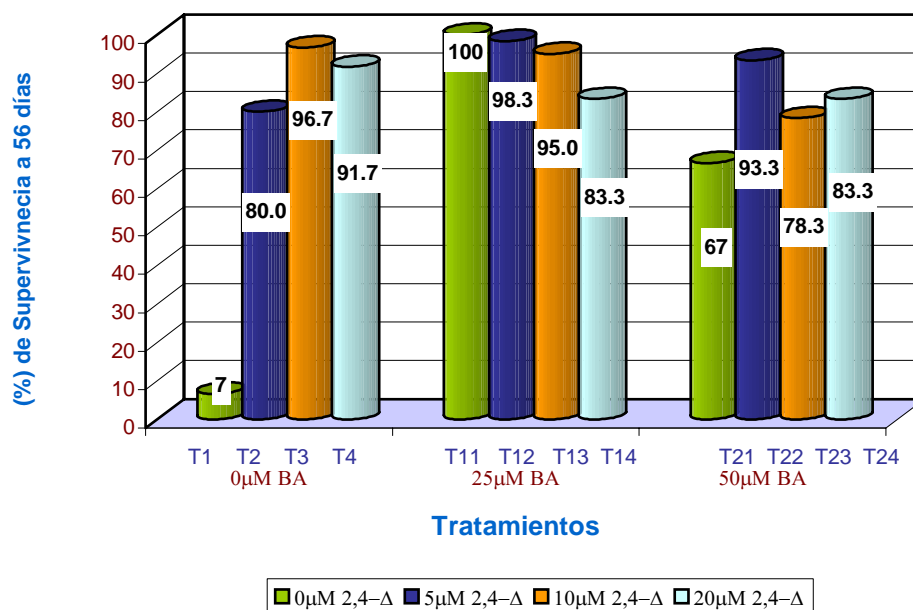
$$CV = 20.25 \%$$

Al encontrarse diferencias estadísticas entre tratamientos se realizó la prueba de Duncan (Anexo 10) y detectó las siguientes diferencias entre tratamientos:

Los tratamientos suplementados tanto con ANA como con AIA y en combinación con BAP fueron, en algunos de los casos, estadísticamente iguales a los tratamientos suplementados con 2,4-D y solo. Estos resultados no se consideran para esta investigación, por el tipo de callos (compactos y con morfogénesis) que desarrollaron éstos tratamientos.



A continuación, se presentan los tratamientos suplementados con 2,4-D a diferentes concentraciones y suplementados con BAP, además de incluirse los 3 tratamientos testigos.



Gráfica N° 14. Diferencias entre medias del Porcentaje de Supervivencia de Callos friables y los tratamientos: 1, 11 y 21 a los 56 días de inducción.

Los tratamientos suplementados con 2,4-D detallados en la Gráfica N° 14, son estadísticamente iguales alcanzando un porcentaje de supervivencia de un 78.33% a un 98.33%. Estos callos fueron de consistencia altamente friable, de apariencia vigorosa y en constante crecimiento, además que no presentaron signos de envejecimiento ni indicios de morfogénesis. En este sentido Hurtado y Merino (1991) indican que el 2,4-D tiene la acción específica de acumularse por mas tiempo y tener un periodo activo relativamente mas prolongado que otras auxinas.



En la misma gráfica se aprecia el comportamiento de los tratamientos 11 y 21 suplementados con 25µM y 50µM de BAP respectivamente y 0µM de auxinas, que tuvieron una respuesta favorable en el porcentaje de supervivencia a los 56 días debido a la acción de BAP que influye en el retraso de la senescencia de callo (Bu'lock 1990 y Hurtado y Merino 1991) Estos dos tratamientos son estadísticamente iguales entre sí y con los tratamientos suplementados con 2,4-D pero con características morfológicas diferentes con callos de consistencia dura y de gran tamaño. Por otro lado, el tratamiento testigo (T1) si bien no formó callo, desarrolló *vitro* plantas en alguno de los casos y en la mayoría, los explantes presentaron una vitrificación total, por lo que alcanzo el porcentaje más bajo de supervivencia el cual fue estadísticamente inferior a todos los tratamientos.

4.2.3.2. Porcentaje de supervivencia a los 84 días (4 semanas después del Segundo Subcultivo).-

A los 84 días de inducción a callo se evaluó la supervivencia de los callos donde se obtuvo los siguientes resultados

Cuadro Nº 31. Análisis de Varianza Factorial para el Porcentaje de Supervivencia de Callo a los 84 días de inducción.

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Significancia
Tipo de Auxina	2	5.9429	2.9714	14.87	0.0001	**
[C] Auxina	2	0.1029	0.0514	0.26	0.7733	N.S.
Tipo Auxina * [C] Auxina	4	0.9312	0.2328	1.17	0.3288	N.S.
[C] de BAP	2	0.0201	0.01	0.05	0.9509	N.S.
Tipo de Auxina * [C] BAP	4	0.4722	0.118	0.59	0.6698	N.S.
[C] Auxina * [C] BAP	4	0.4166	0.1041	0.52	0.7202	N.S.
Error	143	28.572	0.1998			
Total	161	36.458				

* Significativo ** Altamente Significativo NS No Significativo

$$CV = 27.87 \%$$



El Análisis de Varianza del Cuadro N° 31, detectó diferencias altamente significativas en el Efecto Principal de Tipo de auxina, sin embargo, no existen diferencias significativas en la Concentración de Auxina y la Concentración de BAP.

De igual manera, todos las interacciones (Tipo de Auxina por Concentración de Auxina, Tipo de Auxina por Concentración de BAP y Concentración de Auxina por Concentración de BAP) no presentan diferencias estadísticas.

Cuadro N° 32. Prueba Duncan (5%) para los efectos del Tipo de Auxina en el Porcentaje de Supervivencia de Callo a los 84 días de inducción.

Tipo de Auxinas	Media(%)	Duncan
2,4-D	76.481	A
AIA	49.63	B
ANA	33.333	C

La prueba de Duncan, indica que existen diferencias altamente significativas en el porcentaje de supervivencia de los callos a las 4 semanas del segundo subcultivo. La auxina 2,4-D con una media de 76.481%, es superior a las medias de AIA y ANA. Además la media de AIA con 49.63%, es estadísticamente superior a ANA que alcanzó el menor porcentaje de formación de callo con 33.33% de supervivencia.

4.2.3.2.1. Análisis del comportamiento general de los tratamientos.-

El análisis de varianza del Cuadro N° 33 indica que existen diferencias altamente significativas entre los 30 tratamientos que se describe a continuación.



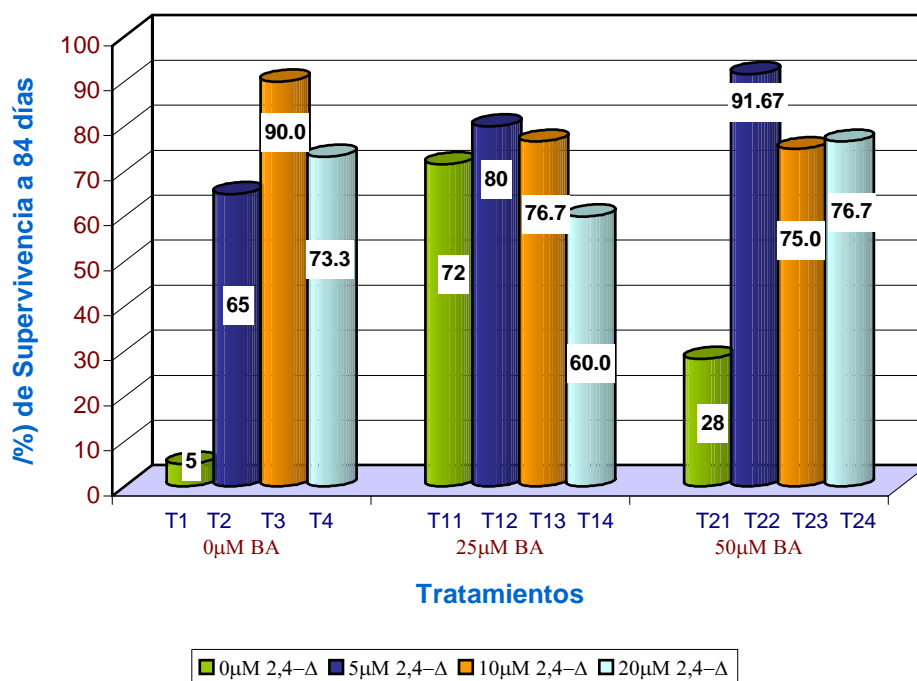
Cuadro Nº 33. Análisis de Varianza para los 30 Tratamientos del Porcentaje de Supervivencia de Callo a los 84 días de inducción.

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Sig. al 1%
Auxina* [C]* BAP	29	10.6445	0.367	1.87	0.0085	**
Error	150	29.4827	0.1965			
Total	179	40.13				

* Significativo ** Altamente Significativo **NS** No Significativo

CV = 27.9%

Al encontrarse diferencias entre tratamientos se realizó la Prueba de Duncan (Anexo 11) donde se observa que los tratamientos suplementados con ANA, AIA y combinadas con BAP, mantuvieron una supervivencia de los callos entre 78.3% y 11.67%, en la mayoría de los casos se observó un acelerado envejecimiento de los explantes Este envejecimiento puede deberse según Hurtado y Merino (1991) a que tanto ANA como AIA son eliminadas más rápidamente por la acción enzimática de AIA oxidasa por lo que se detiene el crecimiento y se inicia el necrosamiento del explante. También puede deberse a la falta de capacidad de los callos formados con ANA y AIA de soportar el estrés derivado de un cambio de medio de cultivo.



Gráfica N° 15. Diferencias entre medias del Porcentaje de Supervivencia de Callos friables y los tratamientos: 1, 11 y 21 a los 84 días de inducción.

La Gráfica N° 15 muestra todos los tratamientos suplementados con 2,4-D combinada con BAP a diferentes concentraciones. Según la prueba de Duncan (Anexo 11), todos estos tratamientos son estadísticamente iguales, con un promedio que varía de 60 a 90% de supervivencia a los 84 días de inducción a callo y con dos subcultivos, demostrando tolerancia al cambio de medio de cultivo, presentando las mismas características morfológicas descritas anteriormente y manteniendo un crecimiento constante, principalmente en los tratamientos suplementados con BAP a una concentración de 50µM. Estas pérdidas de los callos se debieron principalmente a la contaminación y muerte de los explantes.

En la misma gráfica se encuentran representados los tratamientos 11 y 21 que a los 84 días de evaluación mostraron que eran estadísticamente diferentes porque el tratamiento 11 (71.67%), fue estadísticamente superior al tratamiento 21



(28.33%) ya que presentaba fuertes indicios de envejecimiento debido a una alta oxidación de los explantes que derivó en un proceso necrótico irreversible. Por último, el tratamiento testigo (T1) tubo un 5% de supervivencia de los explantes que desarrollaron plantas vitrificadas con una mayor necrosis.

4.2.3.3. Porcentaje de supervivencia a los 112 días (4 semanas después del Tercer Subcultivo).-

El Análisis de Varianza del Cuadro N° 34 descrito a continuación, detectó diferencias altamente significativas en los efectos principales del Tipo de Auxina, sin embargo, en los efectos principales de la Concentración de Auxina y Concentración de BAP no se encontraron diferencias estadísticas ni en las interacciones Tipo de Auxina por Concentración de Auxina, Tipo de Auxina por Concentración de BAP y Concentración de Auxina por Concentración de BAP.

Cuadro N° 34. Análisis de Varianza Factorial para el Porcentaje de Supervivencia de Callo a los 112 días de inducción.

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Significancia
Tipo de Auxina	2	6.0462	3.0231	23.44	0.0001	**
[C] Auxina	2	0.4276	0.2138	1.66	0.1941	N.S.
Tipo Auxina * [C] Auxina	4	0.5111	0.1277	0.99	0.4146	N.S.
[C] de BAP	2	0.6967	0.3483	2.7	0.0705	N.S.
Tipo de Auxina * [C] BAP	4	1.29	0.3225	2.5	0.0451	*
[C] Auxina * [C] BAP	4	0.4452	0.1113	0.86	0.4878	N.S.
Error	143	18.44	0.1289			
Total	161	27.857				

* Significativo ** Altamente Significativo **NS** No Significativo

$$CV = 28.63 \%$$

Los Análisis de Varianza (Cuadros N° 28, 31 y 34) de las tres fechas de evaluación no detectaron diferencias estadísticas en los efectos principales de la Concentración de Auxina ni en la Concentración de BAP, esta respuesta en la supervivencia de callo puede atribuirse a la acción específica de cada regulador



de crecimiento y no a las concentraciones que se empleen de éstos. Sin embargo, en los tres análisis de varianza se detectaron diferencias altamente significativas en el **Tipo de Auxina**.

Como se detectaron diferencias significativas del Tipo de Auxina en el Análisis de Varianza se realizó la prueba de Duncan descrita a continuación.

Cuadro Nº 35. Prueba Duncan (5%) para los efectos del Tipo de Auxina en el porcentaje de Supervivencia de Callo a los 112 días de inducción.

Tipo de Auxinas	Media(%)	Duncan
2,4-D	43.519	A
AIA	10.741	B
ANA	8.33	B

La prueba de Duncan detectó diferencias altamente significativas en el Tipo de Auxina, la auxina 2,4-D (43.52%) es superior a las medias de AIA y ANA (10.74% y 8.33%) respectivamente. Las pruebas de Duncan de los Cuadros Nº. **29 y 32**, también detectaron que 2,4-D que existe una superioridad de 2,4-D frente a ANA y AIA a los 56, 84 y 112 días de inducción a callo.

Según Mejia y Vittorelli (1988) y Hurtado y Merino (1991), 2,4-D es la más fuerte de las tres, por lo que tiende a acumularse por mas tiempo con un periodo activo prolongado y también suprime la morfogénesis y rápidamente forma callo. Es por estas razones que se atribuye la superioridad de 2,4-D en el porcentaje de supervivencia del callo frente a las demás auxinas empleadas en este estudio.

Los callos formados con 2,4-D, fueron de consistencia friable, de tamaño mediano y de color beige con una gran tolerancia al manipuleo y cambio de medio frecuente. Marcovillica, en 1989 logró la organogénesis en callos de *Stevia rebaudiana* Bertoni a los 60 días después de la inducción donde detectaron los primeros primordios de yemas con la combinación de BAP con 5mg y 2,4-D 1mg/l



por lo que se puede afirmar que existe una acción sinérgica entre ambos reguladores de crecimiento en la formación y mantenimiento del callo.

Hurtado y Merino (1991), indican que, AIA tiene un periodo más corto de acción, la degradación de este regulador de crecimiento se da por vía enzimática causada por la formación de AIA – oxidasa, estas enzimas se activan con la edad del tejido, además de que existe una correlación negativa entre el crecimiento de los órganos y el contenido de AIA- oxidasa.

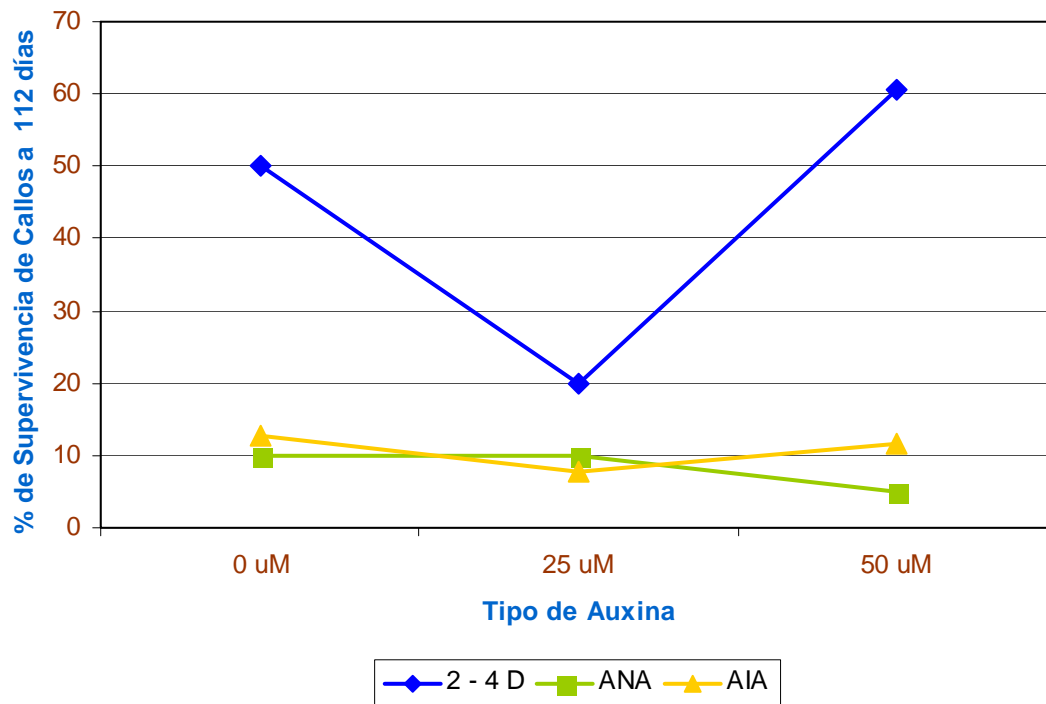
Después de la inducción y mantenimiento de callos la última etapa es el envejecimiento y pérdida de la capacidad de crecimiento acelerado por lo que los callos según su consistencia, tipo de células, explante, capacidad regenerativa y otros factores llegan a este último proceso (Hurtado y Merino 1991).

Como en el Análisis de Varianza del Cuadro N° 34. se detectaron diferencias estadísticas en la interacción Tipo de Auxina por Concentración de BAP se realizó el análisis de efectos simples y la gráfica correspondiente a esta interacción.

Cuadro N° 36. Análisis de los Efectos Simples de la interacción de la Tipo de Auxina por la Concentración de BAP del Porcentaje de Supervivencia de Callo a los 112 días de inducción.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft 0.05	Ft 0.01	Significancia
[C] BAP (2.4-D)	2	1.9092	0.9546	7.40574	3.059	4.7567	**
[C] BAP (ANA)	2	0.0624	0.0312	0.24205	3.059	4.7567	N.S.
[C] BAP (AIA)	2	0.0252	0.0126	0.09775	3.059	4.7567	N.S.
Tipo de Auxina (0uM BAP)	2	2.3268	1.1634	9.0256	3.059	4.7567	**
Tipo de Auxina (25uM BAP)	2	0.3276	0.1638	1.27075	3.059	4.7567	N.S.
Tipo de Auxina (50uM BAP)	2	4.7604	2.3802	18.4655	3.059	4.7567	**
Error	143	18.44	0.1289				

* Significativo ** Altamente Significativo **NS** No Significativo



Gráfica N° 16. Efectos Simples del Tipo de Auxina dentro de cada Concentración de BAP sobre el Porcentaje de Supervivencia de Callo a los 112 días de inducción.

En la Gráfica N° 16 se observa el comportamiento de las diferentes auxinas en cada concentración de BAP, donde 2,4-D es significativamente superior a ANA y AIA en las concentraciones 0 μ M y 50 μ M de BAP. Esta diferencia del comportamiento de 2,4-D se puede atribuir a que existe una acción combinada con BAP a una concentración de 50 pero no así cuando BAP se emplea a menores concentraciones.

Según Hurtado y Merino (1991) BAP promueve la división celular y 2,4-D contribuye a la elongación de las células produciéndose así una mayor multiplicación celular. Roca y Mrognski (1989) indican que debe existir un balance óptimo de los reguladores de crecimiento para obtener resultados favorables y que la ausencia o escasez de algún regulador de crecimiento puede influir negativamente en el crecimiento y desarrollo del tejido. Los resultados obtenidos



en la presente investigación son respaldados por las citas mencionadas anteriormente.

4.2.3.3.1. Análisis del comportamiento general de los tratamientos.-

El Análisis de Varianza presenta diferencias altamente significativas que están representadas en el Cuadro N° 37 citado a continuación

Cuadro N° 37. Análisis de Varianza para los 30 Tratamientos del Porcentaje de Supervivencia de Callo a los 112 días de inducción.

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Sig. al 1%
Auxina* [C]* BAP	29	10.6389	0.3668	2.81	0.0001	**
Error	150	19.5673	0.1304			
Total	179	30.2062				

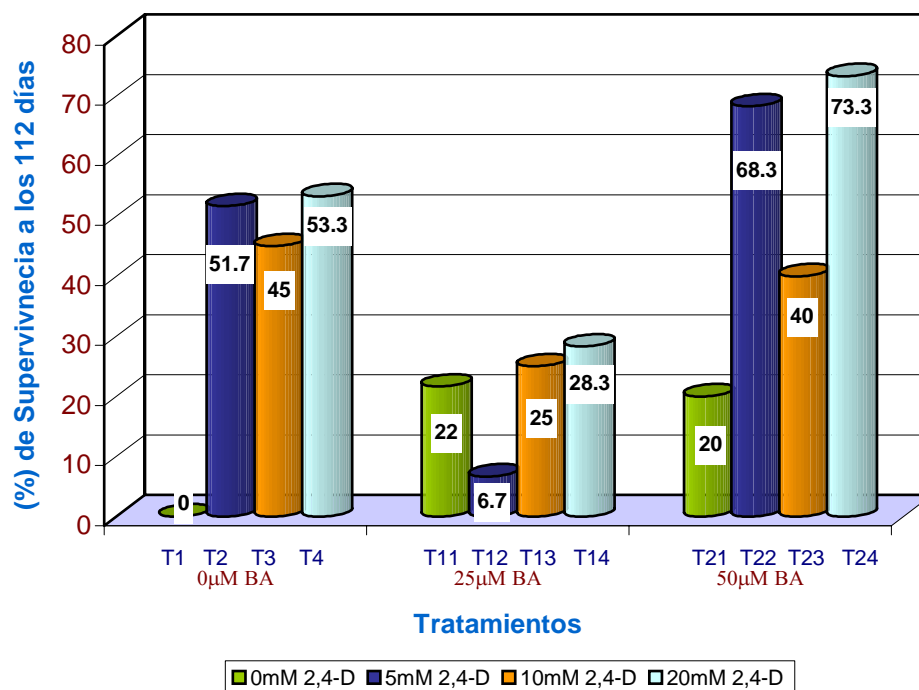
* Significativo ** Altamente Significativo **NS** No Significativo

CV = 28.95 %

Al detectarse diferencias entre tratamientos se realizó la prueba de Duncan (Anexo 12) donde se indica las diferencias entre tratamientos.

Los tratamientos que no fueron suplementados con 2,4-D tuvieron una supervivencia de 23.33% a 0% por lo que se aprecia claramente que estos explantes no son adecuados para un repique constante ni aptos para el establecimiento de una suspensión celular por sus características morfológicas mencionadas anteriormente.

A continuación, se presentan los tratamientos suplementados con 2,4-D además de los tratamientos testigo para su posterior interpretación.



Gráfica N° 17. Diferencias entre medias del Porcentaje de Supervivencia de Callos friables y los tratamientos: 1, 11 y 21 a los 112 días de inducción.

En la Gráfica N° 17, están representados todos los tratamientos suplementados con 2,4-D y adicionados con BAP. Los tratamientos 24 (73.33%), 22 (68.33%), 4 (53.33%), 2 (51.67%), 3 (45%) y 23 (40%) no presentan diferencias estadísticas significativas y son superiores a los demás tratamientos que alcanzaron un porcentaje de supervivencia que oscila 28.33% y 0%.

Por otra parte, los tratamientos 11 y 21 son estadísticamente iguales en el porcentaje de supervivencia de los callos, alcanzando un 21.67 y 20 % respectivamente y al mismo tiempo inferiores a los tratamientos arriba mencionados. El tratamiento 1 al igual que los tratamientos 7, 8, 16, 18, 19, 25, 26 y 28 no sobrevivieron al tercer subcultivo.



4.2. SEGUNDA FASE: INICIO, ESTABLECIMIENTO Y CRECIMIENTO CELULAR EN SUSPENSIÓN DE *Stevia rebaudiana* B.-

Para iniciar y establecer el cultivo de células en suspensión de *Stevia rebaudiana* B, se emplearon los callos del tratamiento 24 (20 μ M 2,4-D y 50 μ M BAP), proveniente de la primera fase experimental. Se eligieron estos callos debido a sus cualidades intrínsecas como ser un 100% de formación de callo y la alta friabilidad que es considerada un factor clave para el éxito en el inicio y establecimiento de la suspensión celular Choi *et al.* (1997).

Para el inicio, establecimiento y crecimiento celular en suspensión se utilizaron callos altamente friables en medio líquido, en constante agitación y un fotoperiodo de 16 hrs luz. En estas condiciones las células fueron desagregadas y liberadas obteniéndose después de un periodo de tres semanas una suspensión celular libre de residuos indeseables como recomiendan Choi *et al.* (1997), Gómez (1999) y Cioffi (2002).

Para el desarrollo de la segunda fase experimental, se emplearon tres tratamientos basados en la modificación de los reguladores de crecimiento para evaluar el desarrollo y crecimiento de las células en suspensión de acuerdo al Cuadro N° 6.

Se realizaron evaluaciones día por medio durante 23 días del número de células por ml. y porcentaje de vitalidad celular, pero por fines prácticos y porque son los datos más representativos del crecimiento celular de una suspensión según lo que indica Cioffi (2002). Se presentan las evaluaciones de los días 1, 13 y 23.



4.2.1. Número Total de Células por mililitro.-

El número de células por mililitro es una variable de respuesta ampliamente usada que permite determinar la densidad celular durante la evaluación del crecimiento de las células en suspensión a través del tiempo.

Al inicio de la evaluación del crecimiento celular las suspensiones celulares empleadas en esta investigación tenían un periodo previo de establecimiento de 21 días en el cual las células ya fueron sembradas y repicadas en sus respectivos tratamientos. Debido a lo descrito anteriormente, que al primer día de evaluación se ya detectaron diferencias entre tratamientos.

Los resultados obtenidos con esta variable de respuesta se presentan a continuación:

4.2.1.1. Número Total de Células por ml al primer día de evaluación.-

En el primer día de evaluación se registraron los siguientes resultados.

Cuadro N° 38. Análisis de Varianza para el Número Total de Células por ml al primer día.

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Significancia
Tratamiento	2	9.184 *10E+13	4.592*10E+13	486.33	0.0001	**
Error	9	8.494 *10E+11	9.437*10E+10			

Total 11 9.269*10E+13

* Significativo ** Altamente Significativo **NS** No Significativo

CV = 15.7 %

Según el Análisis de Varianza del Cuadro N° 38 y la prueba de Duncan (Cuadro N° 39), en el primer día de evaluación de la suspensión celular, existen diferencias altamente significativas entre tratamientos.



Cuadro N° 39. Prueba Duncan (5%) para las diferencias entre medias del Número Total de Células por ml al 1^{er} día del recuento celular.

Tratamiento	Media (N° cel/ml)	Duncan
3	5868750	A
2	2670	B
1	452	B

La prueba de Duncan del Cuadro N° 39, en el primer día de evaluación de la suspensión celular, indica que el tratamiento 3 (20 μ M 2,4-D y 50 μ M BAP) con una media de 5.8×10^6 de células totales por ml, es significativamente superior a los tratamientos 2 (10 μ M 2,4-D y 25 μ M BAP) con 2.6×10^3 y 1 (0 μ M 2,4-D y 0 μ M BAP) con 4.5×10^2 .

Esta diferencia se atribuye a que el tratamiento 3, estuvo suplementado con concentraciones mayores de 2,4-D y BAP, que promovieron una mayor proliferación de células. Según Gómez (1999), 2,4-D cumple varias funciones a nivel celular como el incremento del contenido osmótico de las células, aumentó en la permeabilidad celular al incrementarse la plasticidad de la pared celular y el aumento de la síntesis de ARNm y proteínas específicas (enzimas), derivando finalmente en el alargamiento celular. También la auxina duplica el ADN y actúa en la mitosis (anafase y metafase). Asimismo 2,4-D, se complementa con BAP que induce a la citocinesis, promoviendo división del citoplasma para formar células hijas logrando un mayor crecimiento celular.

La reducción de los reguladores de crecimiento en un 50% o la ausencia de éstos representados en los tratamientos 2 y 1 respectivamente, provocó una disminución del número de células para esta de la evaluación de las suspensiones celulares.

Es importante destacar que en la presente investigación, el número de células totales obtenidas al inicio del conteo celular en el caso del tratamiento 3, fue elevado en relación a las empleadas por Gómez (1999), y Cioffi, (2002) que



reportaron densidades de 10×10^3 a 15×10^3 cel/ml para iniciar el cultivo de células. Al respecto Gómez (1999), menciona que por debajo de esta densidad celular el cultivo tiende a no desarrollarse normalmente, debido a los índices bajos de división celular, mientras que a densidades mayores existe una mejor respuesta en el crecimiento de la suspensión celular, lográndose un aumento sustancial en el número de células por mililitro en corto tiempo.

Esta alta densidad hallada al inicio de la evaluación, se atribuye a dos elementos: a) La cantidad de inóculo empleada para iniciar la suspensión celular sugerida por Cioffi (2002), que fue de 2 a 3 veces mayor que las sugeridas por Hurtado y Merino (1991) y Gómez (1999) y b) el balance de los reguladores de crecimiento que indujo a una mayor proliferación de células por su acción, descrito anteriormente.

4.2.1.2. Número Total de Células por ml a los 13 días de evaluación .-

A los 13 días de evaluación de la suspensión celular se reportaron los siguientes resultados.

Cuadro N° 40. Análisis de Varianza para el Número Total de Células por ml a los 13 días.

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Sig. al 1%
Tratamiento	2	489.9948	244.99742	4552.9	0.0001	**
Error	9	0.484297	0.05381088			
Total	11	490.4791				

* Significativo ** Altamente Significativo **NS** No Significativo
CV = 1.65 %

Según el Análisis de Varianza del Cuadro N° 40, a los trece días de evaluación, existen diferencias altamente significativas entre tratamientos.



Cuadro N° 41. Prueba de Duncan (5%) para las diferencias entre medias del Número Total de Células a los 13 días del recuento celular.

Tratamiento	Media (N° cel/ml)	Duncan
3	9103906250	A
2	74203.25	B
1	3135.25	C

La prueba de Duncan del Cuadro N° 41, a los trece días de evaluación, detectó diferencias altamente significativas entre tratamientos, siendo el tratamiento 3 (9.10×10^9 cel/ml), que fue nuevamente superior a los tratamientos 2 y 1. También existen diferencias entre los tratamientos 2 (7.42×10^4 cel/ml) y 1 (3.13×10^3 cel/ml), siendo este último, significativamente inferior a los otros dos.

A los 13 días del cultivo celular se presentaron marcadas diferencias entre los tratamientos 2 y 1, donde el tratamiento 2 tuvo un incremento mayor de células respecto al tratamiento 1. Por lo tanto, entre los tres tratamientos, el tratamiento 3 tuvo la mejor respuesta en el crecimiento celular reportado hasta esa fecha, por lo que se advierte que una disminución al 0% y 50% de los reguladores de crecimiento afectó negativamente al desarrollo de la suspensión celular. Este crecimiento lento en relación al tratamiento 3 se atribuye a la baja densidad celular encontrada para la primera evaluación, producto de la poca adaptación y establecimiento de las células en dichos medios de cultivo.

4.2.1.3. Número Total de Células por ml a los 23 días de evaluación.-

En la última evaluación de la suspensión celular se reportaron los siguientes resultados.



Cuadro Nº 42. Análisis de Varianza para el Número Total de Células por ml a los 23 días.

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Sig. Al 1%
Tratamiento	2	538.8794	269.4397	6525.9	0.0001	**
Error	9	0.371589	0.04128768			
Total	11	539.25104				

* Significativo ** Altamente Significativo **NS** No Significativo
CV = 1.15 %

El Análisis de Varianza del Cuadro Nº 42, detectó diferencias altamente significativas entre tratamientos en el último día de evaluación de la suspensión celular.

Cuadro Nº 43. Prueba Duncan (5%) para las diferencias entre medias del Número Total de Células por ml a los 23 días del recuento celular.

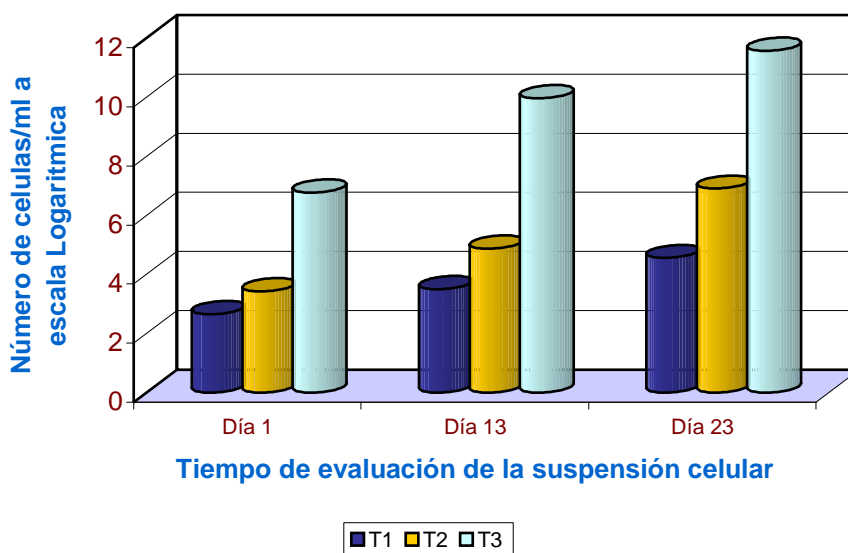
Tratamiento	Media (Nº cel/ml)	Duncan
3	3.7 E+11	A
2	7971875	B
1	35726.5	C

La prueba de Duncan, descrita en el cuadro 48, demostró que el tratamiento 3 es significativamente superior a los tratamientos 2 y 1, este resultado se repitió en el día trece de evaluación de la suspensión celular. Este tratamiento demostró que los tratamientos 2 y 1 son estadísticamente diferentes, siendo el tratamiento 2 superior al tratamiento 1. Las marcadas diferencias entre los tres tratamientos se mantuvieron hasta el último día de evaluación de la suspensión celular, siendo estos resultados consecuentes con el respaldo bibliográfico descrito anteriormente.

A través de este último resultado se puede concluir que para el establecimiento de células en suspensión de *Stevia rebaudiana* es necesario mantener las mismas concentraciones de los reguladores de crecimiento que se emplearon para el establecimiento y mantenimiento de los callos. También es importante destacar



que, la densidad inicial de células por ml influyó decisivamente en el incremento de células, ya que a una densidad inicial mayor se observaron mejores resultados que a densidades por debajo de los niveles recomendados por Gómez (1999) y Cioffi (2002).



Grafica Nº 18. Número de células /ml en escala logarítmica en el 1º, 13º y 23º día de evaluación del crecimiento celular.

En la Gráfica Nº 18, se muestra el incremento de las células por mililitro de los 3 tratamientos que mostraron un incremento regular de las células. El tratamiento 3 se inició con la mayor densidad celular (5.8×10^5 cel/ml), debido al efecto positivo de los reguladores de crecimiento descrito anteriormente. Además presentó un crecimiento constante y elevado hasta el día 23 de evaluación (3.7×10^{11} cel/ml), por lo que se afirma que es el tratamiento que respondió mejor al crecimiento celular.



El tratamiento 2 mostró un incremento superior al tratamientos 1 que no fue suplementado con ningún regulador de crecimiento, por lo que se puede afirmar que la presencia de 2,4-D y BAP, promovió un mayor crecimiento celular y que son necesarias para el inicio, establecimiento y crecimiento celular de *Stevia rebaudiana* B.

4.2.2. Porcentaje de Vitalidad Celular.-

Es importante determinar el porcentaje de Vitalidad celular, debido a que la muerte de las células puede perjudicar ciertos procesos productivos de una suspensión celular (Steward *et al.* 1999).

La cantidad de células muertas es usualmente estimada por métodos de coloración, como el colorante Azul de Evans al 0.1% utilizado en el presente trabajo. Al respecto, Steward *et al.* 1999 indica que debido a que el colorante penetra en las células muertas porque son incapaces de excluirlo debido a la pérdida de la integridad membranal Por ello, las células muertas, se tiñen de color azul intenso, mientras que las células vivas permanecen intactas, manteniendo su color que en el caso de las células de *Stevia rebaudiana* fueron translúcidas y ligeramente verduscas.

A continuación se presentan Fotografías de células vivas y muertas, de diferentes tamaños y formas que se obtuvieron en la suspensión celular. Todas las Fotografías fueron tomadas con diferentes filtros para apreciar los resultados obtenidos en la investigación realizada y a un aumento de 1000x.

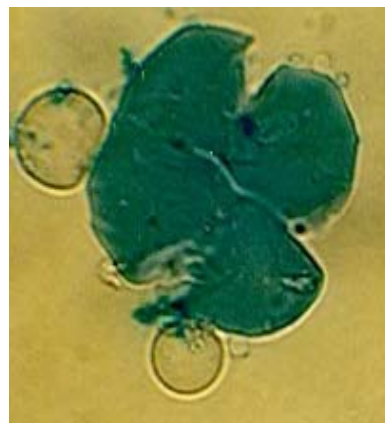


* Fuente Propia

Fotografía N° 24



Fotografía N° 25



Fotografía N° 26

En las Fotografías se aprecian células gigantes. En la Fotografía N° 24, no se le adicione el colorante Azul de Evans. En la Fotografía N° 25 se aprecia como penetra el tinte y en la Fotografía N° 26 se aprecia una célula completamente teñida con azul de Evans y deformada por la destrucción de su membrana, además, a su alrededor se observan células vivas, de menor tamaño y con su membrana íntegra.

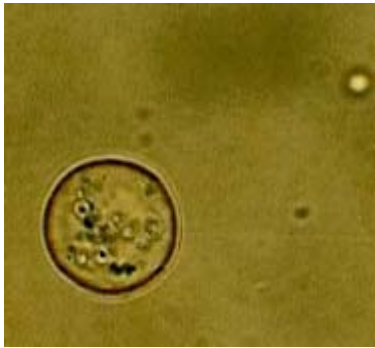


* Fuente Propia

Fotografía N° 27



En la Fotografía 27 se observan células vivas que se están desprendiendo del tejido que esta completamente teñido con azul de Evans. Estas células tienen una forma completamente esférica y son semitransparentes ó en algunos casos brillantes y son pequeñas en relación a las expuestas anteriormente. Hao (2002), indica que las células hijas son mas pequeñas en relación a las células que se encuentran en metafase o anafase.

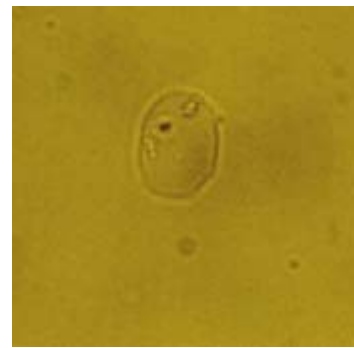


* Fuente Propia

Fotografía N° 28

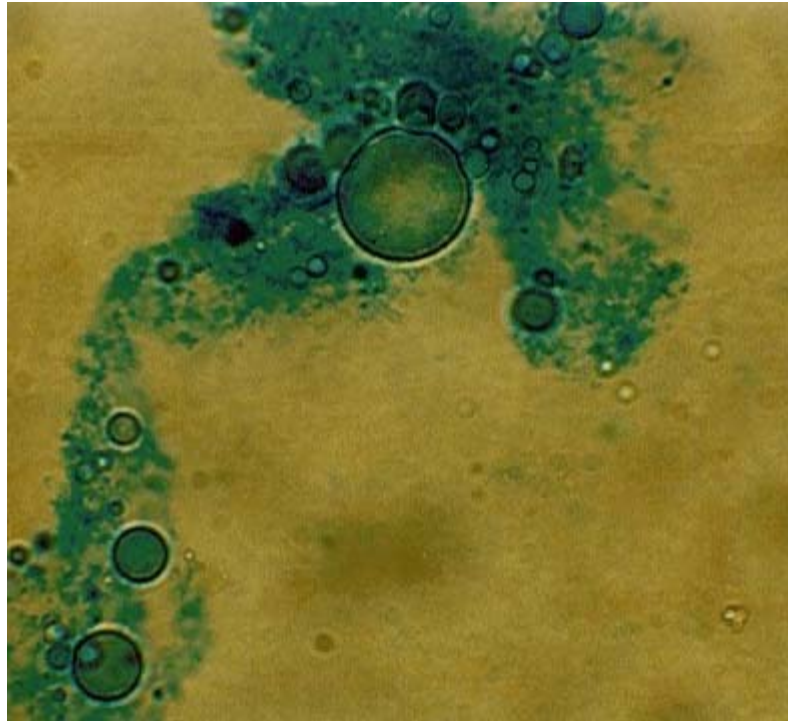


Fotografía N° 29



Fotografía N° 30

En las Fotografías se muestran inclusiones dentro de las células. En las Fotografías N° 28 y N° 29 se utilizó el colorante azul de Evans que tiñó la membrana que rodea a la célula, además de teñir a algunos organelos los cuales no se pudieron distinguir debido al reducido tamaño de las células cultivadas. En la Fotografía 30 no se añadió el colorante y también se apreciaba la presencia de algunas inclusiones dentro de la célula por no tener la forma esférica característica de esta suspensión celular sino mas bien alargada.



* Fuente Propia

Fotografía N° 31

En la Fotografía 31, se observan células esféricas muertas de diferentes tamaños teñidas con azul de Evans, además se observa el colorante diseminado en el medio de cultivo.

Finalmente, para determinar la vitalidad celular se contaron las células muertas y por diferencia con el total de las células obtenidas se pudo calcular el número de células vivas y así determinar la vitalidad celular a través de la fórmula descrita en el Cuadro N° 5, para luego establecer la influencia de los diferentes tratamientos en esta variable de respuesta.



4.2.2.1. Porcentaje de Vitalidad Celular al primer día de evaluación de la suspensión celular.-

En el primer día de evaluación del porcentaje de Vitalidad celular se registraron los siguientes resultados:

Cuadro N° 44. Análisis de Varianza para el Porcentaje de Vitalidad Celular por ml al primer día de evaluación de la suspensión celular.

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Sig. al 1%
Tratamiento	2	208.1558	104.0779	11.77	0.0031	*
Error	9	79.586	8.8428			
Total	11	287.74				

* Significativo ** Altamente Significativo NS No Significativo

$$CV = 3.41 \%$$

El Análisis de Varianza del Cuadro N° 44, detectó diferencias significativas entre todos los tratamientos, diferencias que son explicadas a través de la prueba de Duncan en el Cuadro N° 45.

Cuadro N° 45. Prueba Duncan (5%) para las diferencias entre medias del Porcentaje de Vitalidad Celular por ml al primer día de evaluación.

Tratamiento	% Vitalidad Celular	Duncan
2	91.92	A
1	87.34	A
3	81.73	B

La prueba de Duncan, detectó al primer día de evaluación del porcentaje de vitalidad celular que los tratamientos 2 y 1 con 91.92% y 87.34% respectivamente, fueron estadísticamente iguales y superiores al tratamiento 3 el cual, alcanzó el menor porcentaje de vitalidad celular.



4.2.2.2. Porcentaje de Vitalidad celular a los 13 días del recuento celular.-

A los trece días de la evaluación de la suspensión celular se obtuvieron los siguientes resultados.

Cuadro N° 46. Análisis de Varianza para el Porcentaje de Vitalidad Celular por ml a los 13 días de evaluación de la suspensión celular.

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Sig. al 1%
Tratamiento	2	676.4763	338.23	5.13	0.0327	*
Error	9	593.9683	65.99			
Total	11	1270.444				

* Significativo ** Altamente Significativo NS No Significativo

$$CV = 10.98 \%$$

Según el Análisis de Varianza del Cuadro N° 46. existen diferencias significativas entre tratamientos en el porcentaje de vitalidad celular a los 13 días de evaluación.

Cuadro N° 47. Prueba de Duncan (5%) para las diferencias entre medias del Porcentaje de Vitalidad Celular por ml a los 13 días de evaluación

Tratamiento	% Vitalidad Celular	Duncan
2	81.62	A
1	76.51	AB
3	71.61	B

Según la prueba de Duncan los tratamientos 2 y 1 no presentan diferencias estadísticas significativas, tampoco se detectó diferencias significativas entre los tratamientos 1 y 3. La prueba también indica que existen diferencias entre los tratamientos 2 y 3 en el porcentaje de vitalidad celular a los 13 días de evaluación donde el tratamiento 2 es superior al tratamiento 3 en cuanto al el porcentaje de vitalidad celular



Esta diferencia en el porcentaje de la vitalidad celular puede deberse a que existió una mayor actividad celular en el tratamiento 3 por la elevada densidad celular al inicio de la suspensión de células en relación a los otros dos tratamientos que presentaron un incremento celular mucho más lento donde pudieron mantenerse vivas por un periodo de tiempo mayor. Al respecto Gómez (1999) indica que cuando existen bajas densidades de células existe una baja división celular y una menor competencia de los nutrientes .

4.2.2.3. Porcentaje de Vitalidad Celular a los 23 días de evaluación de la suspensión celular.-

En el último día de evaluación se registraron los siguientes resultados en el porcentaje de vitalidad celular.

Cuadro N° 48. Análisis de Varianza para la Vitalidad Celular por ml a los 23 días de evaluación de la suspensión celular.

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Sig. al 1%
Tratamiento	2	3566.277	1783.13	52.38	0.0001	**
Error	9	306.36	34.04			
Total	11	3872.63				

* Significativo ** Altamente Significativo **NS** No Significativo

$$CV = 12.24 \%$$

Por otro lado, el Análisis de Varianza presentado en el Cuadro N° 48, detectó diferencias altamente significativas entre tratamientos, por lo que en la prueba de Duncan (Cuadro N° 49) se determinó cuales tratamientos presentaron estas diferencias.

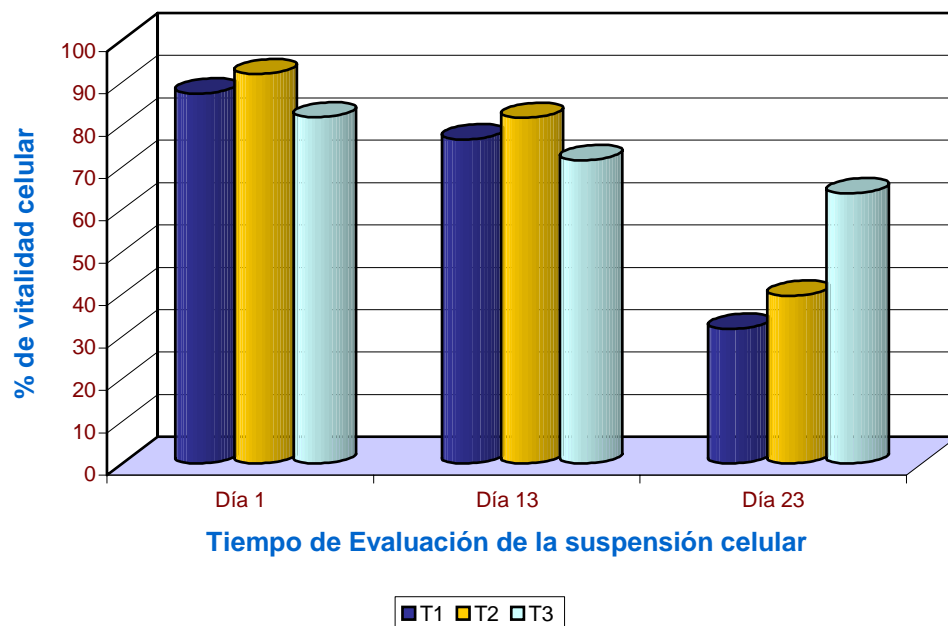


Cuadro N° 49. Prueba de Duncan (5%) para las diferencias entre medias del Porcentaje de Vitalidad Celular por ml a los 23 días.

Tratamiento	% Vitalidad Celular	Duncan
3	63.77	A
2	39.58	B
1	31.77	B

En el último día de evaluación el porcentaje de vitalidad celular del tratamiento 3 fue de 63.77%, el cual fue estadísticamente superior al resto de los tratamientos, por lo que se puede afirmar que a una concentración de 20 μ M de 2,4-D y 50 μ M de BAP, existe un efecto positivo en el mantenimiento de la vitalidad celular a los 23 días de evaluación de la suspensión celular.

En esta última evaluación el porcentaje de vitalidad celular fue mayor del tratamiento 3 en relación a los tratamientos 2 y 1 porque existió una mayor tasa de división celular lo que permitió que existiera una mayor cantidad de células vivas. En los otros tratamientos 2 y 1 debido al bajo número de células éstas empezaron a morir cuando pasaron de la fase estacionaria a la fase de desaceleración en la curva de crecimiento, por la falta de algunos de los nutrientes existen en el medio de cultivo o porque la misma suspensión celular se tornó tóxica, lo que provocó la muerte de muchas de las células en el cultivo en suspensión.

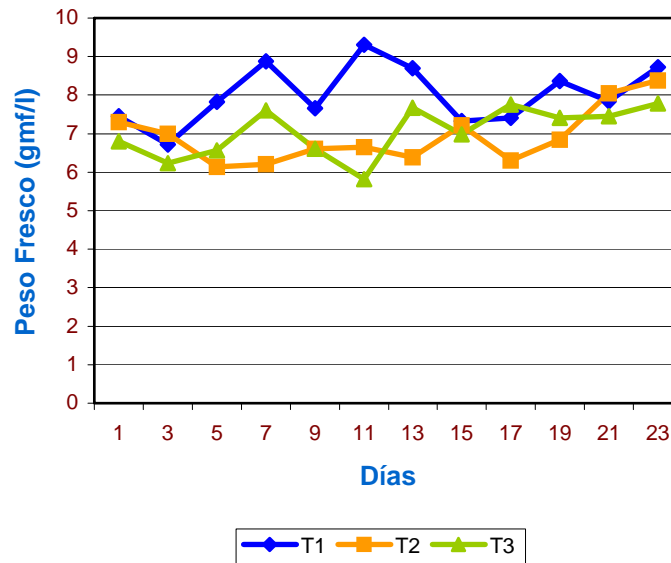


Grafica Nº 19. Porcentaje de vitalidad celular en el 1º, 13º y 23º día de evaluación del crecimiento celular.

En el Gráfico Nº 19, se aprecia que el porcentaje de vitalidad celular disminuyó a través del tiempo, los tratamientos 1 (87.34%) y 2 (91.93%), presentaron un mayor porcentaje de vitalidad celular al primer día de evaluación, disminuyendo progresivamente hasta el día 23. Por otro lado, el tratamiento 3 (81.73%) inició con un menor porcentaje de vitalidad celular pero en el último día de evaluación alcanzó el 63.77%, y fue mayor que los otros tratamientos. Este resultado fue considerado óptimo demostrando que los reguladores de crecimiento influyen positivamente en el porcentaje de vitalidad celular de *Stevia rebaudiana* B.

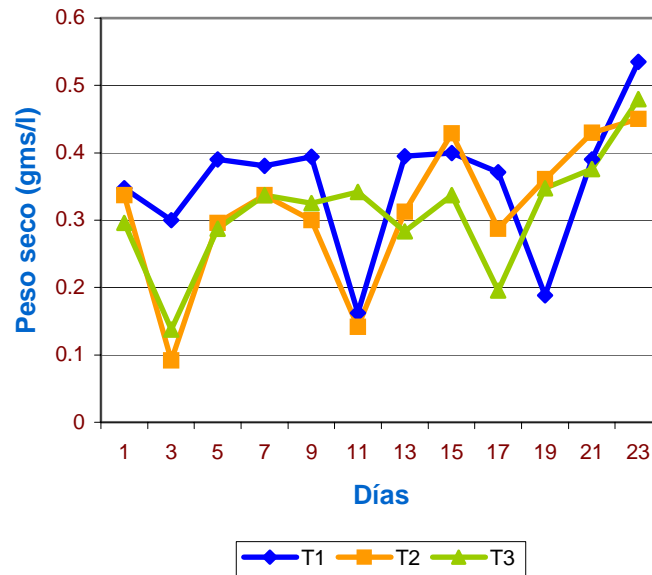


4.2.3. Peso Fresco y Peso Seco de la suspensión celular por tratamiento.-



Gráfica N° 20: Peso Fresco de las suspensiones celulares, en gramos de masa por litro, de los tres tratamientos, en 23 días de evaluación.

En la Gráfica N° 20, se muestra el comportamiento del peso fresco de los tres tratamientos, éste fue bastante irregular y poco referencial ya que debería existir un incremento constante en el peso fresco a medida que pasa el tiempo (Pollard 1990) lo que no se reflejó en el crecimiento celular en 23 días de evaluación. Esta irregularidad se atribuye a la metodología empleada para la obtención de datos (descarte de los frascos Erlenmeyer), por lo que no se tomaron los datos de la misma unidad experimental sino de su homólogo y a que este tipo de evaluación requiere de un gran número de repeticiones como indica Gómez (1999), para obtener resultados fidedignos. Por estas dos causas, se incrementaron las irregularidades en los datos, resultando en una curva inadecuada que no indica el comportamiento real de los tres tratamientos en estudio.

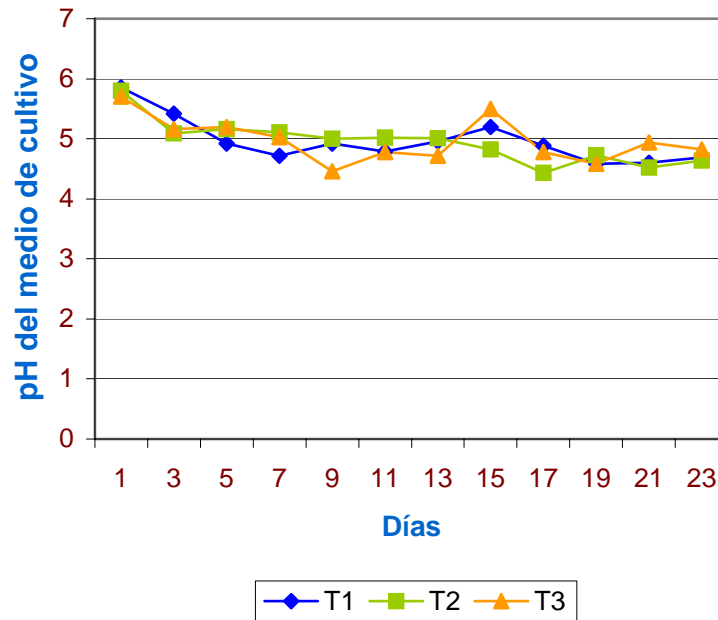


Gráfica N° 21: Peso Seco de las suspensiones celulares en gramos de masa seca por litro, de los tres tratamientos, en 23 días de evaluación.

Según Pollard (1990), el peso seco de la masa celular por litro, es una de las formas más adecuadas de medir el crecimiento celular debido a que su comportamiento es muy similar a una curva de crecimiento típicamente sigmoide. En esta investigación, no se pudo evidenciar este comportamiento debido a que las curvas obtenidas fueron completamente irregulares (Gráfica N° 21), por lo que no reflejan el crecimiento de las células en suspensión contrastadas con el conteo celular principalmente. Al igual que el peso fresco se atribuye esta variación a las mismas causas citadas anteriormente.



4.2.4. Fluctuación del pH en el medio de cultivo en 23 días de evaluación.-



Gráfica N° 22. Efecto de las diferentes concentraciones de auxina-citocinina en la variación del pH durante 23 días de cultivo celular continuo.

En la Gráfica N° 22, se observa el comportamiento del pH de los tres tratamientos durante los 23 días de evaluación de la suspensión celular. Los tratamientos 1, 2 y 3, presentaron medias de 4.79 ± 0.36 , 4.94 ± 0.36 y 4.97 ± 0.36 respectivamente del pH del medio de cultivo, teniendo un comportamiento similar y constante durante la evaluación.

El mantenimiento del pH influye en la función plasmática evitando la ruptura de la membrana celular; también influye en el consumo de los nutrientes y reguladores de crecimiento que se encuentran en el medio de cultivo. Asimismo, permite que las sales se encuentren solubles y disponibles para el consumo de las células. Consecuentemente, un pH que se mantiene constante influye positivamente en el crecimiento celular. (George y Sherrington 1984).



Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con el análisis del pH reportado por George y Sherrinton (1984). Al mantenerse el pH del medio de cultivo constante, se demuestra que influye positivamente en el crecimiento celular durante toda la evaluación, coincidiendo con los resultados obtenidos en el recuento celular y en el porcentaje de vitalidad celular.

Sin embargo, Gómez (1999), indica que el comportamiento del pH varía según el estado de crecimiento de la suspensión celular, puesto que tiende a descender los primeros días, luego retorna al pH original y disminuye nuevamente coincidiendo con el máximo número de células. En la presente investigación no se pudieron comparar los resultados obtenidos con los reportados por Gómez (1999).

Por último, después de evaluar el peso fresco y peso seco para medir el crecimiento celular de manera paralela al recuento celular, al porcentaje de vitalidad celular, y al pH, se afirma en esta investigación que no reflejan el crecimiento celular adecuadamente debido a la falta de repeticiones.

En consecuencia, la evaluación de la suspensión celular a partir del recuento celular, porcentaje de vitalidad celular y la evaluación del pH durante el crecimiento celular, es la más adecuada porque muestra indicios claros sobre el desarrollo de la suspensión celular a través del tiempo constituyéndose una referencia confiable y directa de alta precisión y fácil accesibilidad.



CAPITULO V: CONCLUSIONES

5.1. INDUCCIÓN Y MANTENIMIENTO DE CALLOS DE *Stevia rebaudiana* Bertoni.-

En base a los resultados obtenidos en la primera fase de investigación se llegaron a las siguientes conclusiones:

- ❖ Las hojas de plantas *in vitro* de *Stevia rebaudiana* son adecuadas para la formación de callos en el medio de cultivo Murashigue y Skoog (1962). En este medio de cultivo se logró inducir y mantener los callos obtenidos a partir de todos los tratamientos suplementados con cualquier regulador de crecimiento empleado en la presente investigación
- ❖ La obtención de callos aptos para el inicio y establecimiento de la suspensión celular fue evaluada a partir de los siguientes parámetros: porcentaje de formación, consistencia, porcentaje de supervivencia y peso total de callo. Todos estos parámetros fueron adecuados y eficaces para evaluar a los callos aptos para la siguiente fase experimental y cumplir con los objetivos planteados en esta investigación
- ❖ De los 30 tratamientos propuestos, se concluye que el tratamiento 24 (20 μ M 2,4-D y 50 μ M BAP), permitió un 100% de formación de callo, con una alta friabilidad, peso promedio de 1.53g a los 84 días de evaluación y una tolerancia a la manipulación puesto que no se observaron procesos de oxidación. Esta tolerancia se reflejó en un 73.33 % de supervivencia del callo a los 112 días de la inducción a callo, siendo adecuado para el inicio de suspensiones celulares de *Stevia rebaudiana* B.



- ❖ Para la formación de callos de *Stevia rebaudiana* se requiere la presencia de reguladores de crecimiento, dado que el tratamiento testigo (T1: 0 μ M Auxinas y 0 μ M de BAP), no formó callos de ningún tipo, presentando el menor peso (0.42g) a los 84 días de evaluación y 0% de supervivencia a los 112 días de evaluación.

5.2. INICIO, ESTABLECIMIENTO Y CRECIMIENTO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE *Stevia rebaudiana* Bertoni.

En la segunda fase de investigación se llegaron a las siguientes conclusiones:

- ❖ Se combinaron las metodologías propuestas por Cioffi 2002 y por Choi *et al* (1997) y Gómez (1999). La combinación de técnicas realizada en esta investigación permitió el inicio y establecimiento de las suspensiones celulares en los tres tratamientos propuestos en esta fase experimental a partir de los callos provenientes del tratamiento 24 (20 μ M 2,4-D y 50 μ M BAP) por sus características ideales para este objetivo.
- ❖ El crecimiento celular fue evaluado por los siguientes parámetros: el recuento del número de células por mililitro, el porcentaje de vitalidad celular, el peso fresco, el peso seco y el pH. Los más adecuados y eficaces parámetros para la determinación del comportamiento de las células de *Stevia rebaudiana* B. Fueron: El recuento celular, el porcentaje de la vitalidad celular y el mantenimiento del pH durante los 23 días de evaluación.



- ❖ Dentro de los 3 tratamientos planteados en la segunda fase experimental, el tratamiento con 20 μ M 2,4-D y 50 μ M BAP (T3), fue el que presentó el mejor comportamiento en cuanto al crecimiento según el número de células por ml y el porcentaje de vitalidad celular. Este alcanzó el mayor número de células por mililitro, desde el inicio hasta el final de la evaluación de las células en suspensión con 3.7×10^{11} en el último día de evaluación. Asimismo, en el porcentaje de vitalidad celular, se registró un comportamiento óptimo 63.77% en el último día de evaluación. Finalmente, el mantenimiento del pH con un promedio de 4.97 ± 0.36 permitió el normal desarrollo de la suspensión celular durante toda la evaluación.
- ❖ La evaluación del crecimiento celular a través del peso fresco y del peso seco, no reflejaron adecuadamente el crecimiento celular debido al excesivo número de repeticiones que requieren estos parámetros de evaluación para obtener resultados confiables.

La metodología empleada en el presente trabajo de investigación es adecuada para la inducción y mantenimiento de callos y el inicio, establecimiento y crecimiento celular y puede ser aplicada para posteriores trabajos de investigación en *Stevia rebaudiana* Bertoni.



5.3. OBTENCIÓN DE CALLOS CON DIFERENTES CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS SEGÚN LA COMBINACIÓN DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO EN *Stevia rebaudiana* B.-

5.3.1. Efecto de 2,4-D combinado con BAP.-

- ❖ Los callos formados en medio de cultivo suplementados con 2, 4- D desarrollaron alta friabilidad y alcanzaron un porcentaje de formación de callo de 98.49% a los 56 días de evaluación, asimismo alcanzaron los niveles más altos en el porcentaje de supervivencia del callo con un 43.51% a los 112 días de inducción a callo mostrando una alta tolerancia a la manipulación, al cambio de medio de cultivo y la no presentaron oxidación.
- ❖ La combinación realizada con BAP promovió un mayor incremento en peso de los callos, demostrándose así que la combinación de ambos reguladores de crecimiento, promovió un mejor desarrollo se los callos de *Stevia rebaudiana*.
- ❖ Sin embargo, estos callos alcanzaron los pesos mas bajos (1.36g, 1.53g y 1.56g) a los 28, 56 y 84 días de evaluación, en relación a los demás tratamientos suplementados con diferentes reguladores de crecimiento.

5.3.2. Efecto de ANA combinado con BAP.-

- ❖ La ausencia de BAP en los tratamientos 5 (5 μ M ANA y 0 μ M BAP), 6 (10 μ M ANA y 0 μ M BAP) y 7 (5 μ M ANA y 0 μ M BAP) permitió el desarrollo de raíces en los callos registrados a los 28, 56 y 84 días de evaluación, mientras que los tratamientos adicionados con BAP no derivaron en la formación de raíces ni brotes, pero todos los callos formados a partir de estas combinaciones fueron de consistencia dura y compacta.



- ❖ Los callos formados en medios de cultivo suplementados con ANA y BAP, alcanzaron un promedio de 94.11% de formación de callo. Sin embargo, el porcentaje de supervivencia disminuyó a 10.7% a los 112 días de evaluación.
- ❖ El peso promedio, se incremento constantemente y a los 84 días de evaluación se registró un peso de 2.7576 g, que fue influenciado por la presencia de las raíces en los callos.

5.3.3. Efecto de AIA combinada con BAP.-

- ❖ Los callos formados en medios de cultivo, suplementados con AIA a diferentes concentraciones alcanzaron un 100% de formación de callos a los 56 días de inducción a callo y fueron compactos de consistencia muy dura. Se desarrollaron raíces que derivo en un incremento en peso, con 3.0039 g a los 84 días de inducción y que fueron superiores a los tratamientos suplementados con 2,4-D. Sin embargo, estos callos paulatinamente fueron muriendo y en la última evaluación se registró un 8.3% de supervivencia de callo.
- ❖ La Combinación de AIA con BAP (10 μ M AIA /25 μ M BAP) promovió la formación de brotes vegetativos a partir de callos a los 56 días de inducción a callo.
- ❖ La presencia de BAP inhibió la formación de raíces formando callos compactos a concentraciones de 25 μ M y 50 μ M.



5.3.4. Efecto de BAP.-

- ❖ Los tratamientos 11(0 μ M Auxinas y 25 μ M de BAP), y 21 (0 μ M Auxinas y 50 μ M de BAP), que no fueron suplementados con ningún tipo de auxina alcanzaron un porcentaje de formación de callo alrededor del 95% a los 56 días. Se formaron callos compactos de gran tamaño que mostraron fuertes signos de necrosamiento y oxidación del medio de cultivo a 112 días del inicio y establecimiento de callo.

- ❖ Ambos tratamientos registraron un elevado peso en todas las evaluaciones, pero por su consistencia compacta, poca tolerancia al manipuleo, cambio de medio de cultivo y oxidación progresiva, no fueron adecuados para alcanzar los objetivos planteados en esta investigación.



CAPITULO VI: RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados logrados en la presente investigación, se citan a continuación las siguientes recomendaciones:

- ❖ Para futuros ensayos se recomienda iniciar y mantener el cultivo de callos a partir de las concentraciones de 20 μ M de 2,4-D y 50 μ M de BAP.
- ❖ Se recomienda emplear la metodología descrita por Choi 1997, Gómez 1999 y Cioffi 2002 para el inicio, establecimiento y crecimiento de suspensiones celulares a partir de las mismas concentraciones empleadas para la inducción a callo, por su efectividad, fácil manejo y accesibilidad.
- ❖ Para posteriores ensayos sobre organogénesis indirecta de *Stevia rebaudiana* se recomienda partir de una concertación de 10 μ M AIA y 25 μ M BAP para la obtención de brotes vegetativos.
- ❖ El recuento celular se constituye como la mejor alternativa para evaluar el crecimiento celular por su eficiencia y accesibilidad y emplear el colorante Azul de Evans para evaluar la vitalidad celular de las células de *Stevia rebaudiana* B.
- ❖ Determinar el tiempo óptimo para el subcultivo celular, manteniendo la velocidad del crecimiento celular en la fase exponencial, evitando la fase de reposo donde no existe división celular por el proceso de adaptación al medio de cultivo en células de *Stevia rebaudiana* B.



- ❖ Analizar el contenido de steviosido de las plantas *in vitro*, de callos y de la suspensión celular de *Stevia rebaudiana* B. debido a su importancia en la industria como su actividad hipoglicemiante entre otros.

- ❖ Iniciar investigaciones sobre la obtención de líneas celulares a partir de las suspensiones celulares obtenidas de *Stevia rebaudiana* B., que produzcan steviosido y la obtención de embriones somáticos con vistas a la producción de semilla sintética y regeneración de plantas *in vitro* más dulces y de alta calidad.



CAPITULO VII: BIBLIOGRAFÍA

Aguado, GA; Cabrera, JL; Ramírez, E; León CG; Rascon Q; Herrera, L; Olalde V. 2001. Establecimiento, characterization and plant regeneration from highly chlorophyllous embryogenic cell cultures of blue grama grass, *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag. Ex Steud. 20:131-136.

Agusti, M; Sheeler P. 1991. Aplicaciones de Fitorreguladores en la Citricultura. 1ed.ES. Aedos. p. 49-62.

Akita M; Shigcoka T; Koizumi Y; Kawamura M. 1994. Mass propagation of shoots of *Stevia rebaudiana* using a large scale bioreactor. Plant Cell Reports 13:180-183.

Apaza, VA. 2003. Evaluación agronómica de la Estevia (*Stevia rebaudiana* B).bajo tres niveles de Fertilización Nitrogenada en los Yungas de La Paz. Tesis, Lic. La Paz, BO. UMSA 87p.

Botidarev N; Reshetnyak O; Nesov A 2003. Effects of nutrient medium composition on development of *Stevia rebaudiana* Shoots cultivated in the roller bioreactor and their production of stiviol glycosides. Plant Science v 165: 845-850.

Brandle JE; Rosa N. 2001. Heritability for Yield, Leaf: stem Ratio and Stevioside Content Estimated from a Landrace Cultivar of *Stevia rebaudiana*. (en linea) CA. Consultado 9 Oct. 2001. HTML. Disponible en:
http://res2.agr.ca/london/pmrc/english/faq/cjps_ste.html

Brandle JE; Starrat AN Gijzen M.2001. *Stevia rebaudiana* Its biological, chemical and agricultural properties. (en linea) CA. Consultado 9 Oct. 2001. HTML. Disponible en: http://res2.agr.ca/london/pmrc/english/faq/stevia_rev.html



Brandle JE; Yao Y; Reeleder R; Beyaert R; Gijzen M. 2001. Stevia, Nature's Natural Low Calorie Sweetener. (en línea) CA. Consultado 9 Oct. 2001, Disponible en: <http://res2.agr.ca/london/pmrc/english/faq/stevia.html>.

Bu'lock, J; Kristiansen, B. 1990. Biotecnología Básica. Trad. P Liras. Zaragoza, ES. Acribia. p. 45-70.

Caballero, RE. 2000. Extracción, Purificación y Caracterización del Esteviosido presente en la *Stevia rebaudiana* B. Tesis. Lic. Ing. Qmc. Santa Cruz de la Sierra, BO. U.G.R.M. 166p.

Calzada J. 1970. Métodos Estadísticos para la investigación. Lima – PE. Ed. Jurídica. 640p.

Castillo, JA. 1994. Regeneración *in vitro* de la Muña Blanca (*Mintosh tachis andina* Brett Epling), una Especie Nativa con Propiedades Aromáticas y Medicinales de Importancia Económica para Bolivia. Tesis Mag. Cochabamba, BO. UMSS. p. 22-82.

Choi, YE; Kim, JW; Soh, WY. 1997. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of *Acanthopanax koreanum* Nakai. 17:84-88.

Cioffi, G. 2002. Introducción al Cultivo Celular de Plantas: Cultivo de Callos y Suspensiones Celulares. (transparencias). La Paz, BO. s.n.t. 200 transparencias.

Cronquis. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. New York. US. Columbia University Press. p. 1262.



Cuba, M; García, D; Martínez M; Rojas R. 1996. Influencia de la Edad del callo y la densidad de inoculación en el comportamiento del balance celular en suspensiones celulares de *Coffea canephora* Var. Robusta. Cultivos Tropicales. 17(2): 63-65.

Cuellar, ML. 1996. Aplicación del Cultivo de Tejidos en la Propagación y el Mantenimiento del Estado Sanitario de Mussa AAA EV. GrosMichel en el departamento de Santa Cruz de la Sierra. Tesis Lic. Santa Cruz de la Sierra, BO.UGRM. p. 22-52.

Etienne H; Bertrand. B. Trueness-to-type and agronomic characteristics of *Coffea arabica* trees micropropagated by the embryogenic cell suspension technique. Tree Physiology. 21:1031-1038.

Feria, M; Jiménez, E; Barbón, R; Capote, A; Chávez, M; Quiala, E. 2000. Multiplicación de Suspensiones Celulares Embriogénicas de *Coffea arabica* cv Catoimor 9722. Biotecnología Vegetal (1): 13-20.

Flachsland, E.A; Lambart R.H.M 1989. Regeneración de plantas de *Stevia rebaudiana* por cultivo *in vitro* de laminas foliares Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Fisiología Vegetal (10), Reunión Nacional de Fisiología Vegetal (18). Puerto Iguazú, Misiones, AR.; Tisocco R.M. s.n.t. s.p.

French E.; Hebert T. 1982. Métodos de Investigación Fitopatológica. Instituto Iberoamericano de Cooperación para la Agricultura. San José CR. 275p.

Frischknecht, PM; Baumann TW. 1985. Stress Induced Formation of Purine Alkaloids in Plant Tissue Culture of *Coffea arabica*. Phitochemistry. 24(10):2255-2257.



Fundación Bolivia Exporta, BO. s.f. Manual para el productor de hojas de Stevia. La Paz, BO. 11p.

George EF; Sherrington PD. 1948. Planta Propagation by Tissue Culture. US. Ed. Exegetics Limited. 690 p.

Geuns JMC. 2003. Molecules of Interest Stevioside. *Phytochemistry* v 64: 913-921.

Gómez, R. 1999. Aplicaciones de la Biotecnología en la Mejora Genética de Plantas y en la Producción de Semillas: Métodos y Procedimientos para el Cultivo *in vitro* de células. Santa Clara, CU. IBP (Instituto de Biotecnología de las Plantas) 104 p. (Módulo 1).

Hao, JY; You, CX; Deng, XX. 2002. Cell size as a morphological marker to calculate the mitotic index and ploidy level of citrus callus. *Plant Cell Report* 20: 1123-1127.

Hurtado, DV; Merino, ME, 1991. Cultivo de Tejidos Vegetales. 2ed. Trillas MX. 230p

Kinghorn, AD; Soajerto, DD; Nanayakkara, NPD; Medon, PJ; Kanath, SK. 1984. A phytochemical screening procedure for sweet Ent-Kaurene glycosides in the Genus *Stevia*. *Journal of Natural Products*. 47(3):439-444.

López, J; Montano, N; Sweenen, R; Ventura, J; Schoofs, H; Medero, V; García, M; Espinosa, L y Córdova, M. 2000. Establecimiento de Suspensiones Celulares en Plántanos Vianda del Grupo (AAB). *Biotecnología Vegetal*. (1): 59-62.



Marcovillica, MC. 1989. Micropropagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni por medio de segmentos nodales y meristemas. Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Fisiología Vegetal (10), Reunión Nacional de Fisiología Vegetal (18). 1989. Puerto Iguazú, Misiones, AR. s.n.t. s.p.

Marcovillica, MC; Divo de César, MD 1989. Organogénesis en callos de Ka'a-Hee (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Fisiología Vegetal (10), Reunión Nacional de Fisiología Vegetal (18). Puerto Iguazú, Misiones, AR. s.n.t. s.p.

Mejía, R; Vittorelli C. 1988. Cultivo *in vitro* de Plantas de Papa. Instituto Nacional de Investigación Agrícola y Agro Industrial. 109 p.

Melillo P. s.f. Fundamentos de Agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas: Agrotecnología para el cultivo de estevia o hierba dulce. s.l. s.n.t. p.442-450.

Mgkiones, K. 1992. Biotecnología Vegetal Agrícola. Trad. L Fernández. Zaragoza, ES. Acribia. p. 17-104.

Molinas, S. 1989. Ka'a He'e. Asunción PY. Fortuna Stevia del Paraguay. p. 1-4.

Montaño R. 1999. Diagnostico del comportamientos y Potencialidades de la Estevia en el Chapare. Cochabamaba, Bo. IBTA/Chapare.16p.

Montes, S; Martínez, M; Rojas R; Santana, N; Cuba, M. 1995. Obtención de Embriones Somáticos a partir de Suspensiones Celulares de *Coffea canephora* Var. Robusta. Cultivos Tropicales. 16(3): 77-81.



Paja G. 2000. Niveles de fertilización orgánica en el cultivo de Estevia (*Stevia rebaudiana Bertonii*), en la localidad de San Buenaventura. Tesis. Lic. La Paz, BO. UMSA 109p.

Pinaya, A. 1996. Efecto de la densidad de siembra sobre el rendimiento de steviosido en cultivo de *Stevia (Stevia rebaudiana B)*. Tesis. Lic. La Paz. BO. UMSA 85p.

Pollard, JW; Walker, JM. eds. 1990. Plant Cell and Tissue Culture. 2ed. New Jersey, Clifton, EEUU. Humana Press. v. 6, 597.

Ponce, JN; Alvarado, Y; Gómez R.; Jiménez EA; Orellana PA. eds. 1998. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Villa Clara. CU. IBP (Instituto de Biotecnología de las Plantas).v 1, 391 p.

Ramírez, N. 1989. Cultivo de Tejidos. Pueblo y Educación. 66p.

Reyes P. 1995. Bioestadística Aplicada. Ed. Trillas MX 216p.

Rivadeneira, C; Morales Y. 1999. Producción de plantas de *Stevia rebaudiana B*. como alternativa en la elaboración de edulcorantes en Santa Cruz de la Sierra. (Informe). BO. Instituto de Investigación Agrícola "El Vallecito". 11p.

Roca, W; Mrognski, LA. 1989. Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. p. 21-237.

Seal, A; Harza, A; Nag, R; Chaudhuri, S ; DasGupta, M. 2001. Exogenous auxin depletion renders an *Arachis Hypogea* suspensión culture sensitive to water loss without affecting cell growth. 20: 567-573.

Sigma 1994. Plant Culture Catalogue. US 131p.



Silva AR; Saldanha CM; Boelter R; Chagas AM. 1997. Fertility of rats: aqueous extract of *Stevia rebaudiana* (BERT) BERTONI and Stevioside. (en línea) BR. Consultado 24 Sep. 1997. HTML. Disponible en:
<http://www.fastlane.net/-petro/stevia/doc007.html>.

Siverman, L; Mukundan, U. 2003. *In vitro* Culture Studies on *Stevia rebaudiana*. In vitro cell. Dev. Biol - Plant. 39: 520-523.

Starratt A; Kirby C; Pocs R.; Brandle JE. 2002. Rebaudioside F, a diterpene glycoside from *Stvia rebaudiana*. Phytochemistry v 59: 367-370.

Steel, R; Torrie J. 1992. Bioestadística: Principios y Procedimientos. Ed. Mc Graw Hill. MX.621p.

Steward N; Martín R. Engasser JM Georgen JL. 199. A new methodology for plant cell viability assessment using intracellular esterase activity. Plant Cell Reports v. 19:171-176.

Sumida, T. 1997. Posibilidades del Desarrollo Agroindustrial de la *Stevia rebaudiana Bertoni* en Bolivia.(Informe).La Paz BO. MASIA,(Ministerio de Asuntos Campesinos Indígenas y Agropecuarios). 173p.

Ushiyama, M; Furuya, T. 1989. Biotransformation of (RS)-Tropic Acid in Suspension Cultures of *Coffea arabica*, *Datura innoxia*, *Eucalyptus perriniana* and *Nicotiana tabacum*. Phytochemistry. 28(9): 2333 - 2339.

Ushiyama, M; Kumagai, S; Furuya, T. 1989. Biotransformation of Phenylcarboxylic Acids by Plant Cell Cultures. Phytochemistry. 28(12): 3335-3339.



Venek T; NopovimA; Valicek P. 2001. Determination of Stevioside in plant Material and Fruit Teas. *Journal of Food Composition and Analysis*. V14:383-388.

Yamazaki, T; Flores, HE; Shimomura, K; Yoshihira, K. 1991. Examination of steviol glucosides production by hairy root and shoot cultures of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Natural Products* 54(4): 986-992.

ANEXOS

ANEXO 1

MEDIO DE CULTIVO DE MURASHIGUE & SKOOG

MACRONUTRIENTES	Peso	Unidad de peso
KNO ₃	1900	mg/l
NH ₄ NO ₃	1650	mg/l
CaCl ₂ 2H ₂ O	440	mg/l
Mg SO ₄ 7H ₂ O	370	mg/l
K H ₂ PO ₄	170	mg/l
Fe SO ₄ 7H ₂ O	27,85	mg/l
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	37,25	mg/l

MICRONUTRIENTES		
Mn SO ₄ 4H ₂ O	22,3	ug/l
Zn SO ₄ 7H ₂ O	8,6	ug/l
H ₃ BO ₃	6,2	ug/l
KI	0,83	ug/l
Cu SO ₄ 5H ₂ O	0,025	ug/l
Na MoO ₄ H ₂ O	0,25	ug/l
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025	ug/l

VITAMINAS		
TIAMINA	0,1	ug/l
ACIDO NICOTINICO	0,5	ug/l
PIRODOXINA, HCl	0,5	ug/l
GLICINA	2	ug/l

INOSITOL	100	mg/l
FUENTE DE CARBONO		
SUCROSA	30	g/l
AGENTE GELIFICANTE		
AGAR AGAR	6,5	g/l
pH	5,8	———

ANEXO 2

TRATAMIENTOS DE LA PRIMERA FASE EXPERIMENTAL

Tratamientos	Tipo de Auxina	[C] en uM	[BAP] en uM
1	————	0	0
2	2,4-D	5	0
3	2,4-D	10	0
4	2,4-D	20	0
5	ANA	5	0
6	ANA	10	0
7	ANA	20	0
8	AIA	5	0
9	AIA	10	0
10	AIA	20	0
11	————	0	25
12	2,4-D	5	25
13	2,4-D	10	25
14	2,4-D	20	25
15	ANA	5	25
16	ANA	10	25
17	ANA	20	25
18	AIA	5	25
19	AIA	10	25
20	AIA	20	25
21	————	0	50
22	2,4-D	5	50
23	2,4-D	10	50
24	2,4-D	20	50
25	ANA	5	50
26	ANA	10	50
27	ANA	20	50
28	AIA	5	50
29	AIA	10	50
30	AIA	20	50

TRATAMIENTOS DE LA SEGUNDA FASE EXPERIMENTAL

Tratamientos	[2,4-D] en uM	[BAP] en uM
1	0	0
2	10	25
3	20	50

ANEXO 3

Prueba de Duncan (1%) para los efectos de los tratamientos en el Porcentaje de Formación de Callo a los 28 días de inducción

Tratamiento	Media	Duncan
17	100	A
2	100	A
3	100	A
20	100	A
13	100	A
30	100	A
23	100	A
8	100	A
9	100	A
26	100	A
27	100	A
28	100	A
25	100	A
18	100	A
15	100	A
24	100	A
19	100	A
22	98,33	A
5	98,33	A
29	98,33	A
14	96,667	A
7	96	A
16	93,333	A
10	93,333	A
21	93,333	A
11	93,333	A
12	88,33	A
4	86,667	A
6	61,667	B
1	0	C

ANEXO 4

Prueba de Duncan (1%) para los efectos de los tratamientos en el Porcentaje de Formación de Callo a los 56 días de inducción.

Tratamiento	Media	Duncan
17	100	A
2	100	A
3	100	A
20	100	A
5	100	A
22	100	A
23	100	A
8	100	A
9	100	A
10	100	A
27	100	A
28	100	A
13	100	A
14	100	A
15	100	A
24	100	A
25	100	A
18	100	A
19	100	A
30	100	A
21	100	A
26	100	A
29	100	A
7	96	A
4	95	A
11	95	A
16	93,33	A
12	91,667	A
6	61,667	B
1	0	C

ANEXO 5

Análisis de varianza Factorial para el Porcentaje de Formación de Callo a los 84 días de inducción

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Significancia
Tipo de Auxina	2	0,03376	0,0168	7,03	0,0115	N.S.
[C] Auxina	2	0,0421	0,021	8,77	0,0103	N.S.
Tipo Auxina * [C] Auxina	4	0,0758	0,01896	7,89	0,0001	**
[C] de BAP	2	0,0294	0,0147	6,12	0,0433	*
Tipo de Auxina * [C] BAP	4	0,0468	0,0117	4,87	0,0214	*
[C] Auxina * [C] BAP	4	0,0309	0,0077	3,22	0,0665	N.S.
Error	83	0,1994	0,0024			
Total	101	0,3976				

CV = 12,14%

Análisis de Varianza para los 30 Tratamientos del Porcentaje de Formación de Callo a los 84 días de inducción

FV	GL	SC	CM	Fc	P>F	Significancia
Auxina* [C]* BAP	29	5,43	0,1874	257,41	0,0001	**
Error	86	0,06	0,0007			
Total	115	5,49				

CV = 13,57%

ANEXO 6

Prueba de Duncan (1%) para los efectos de los tratamientos en el Porcentaje de Formación de Callo a los 84 días de inducción.

Tratamiento	Media	Duncan
17	100	A
2	100	A
3	100	A
20	100	A
5	100	A
22	100	A
7	100	A
8	100	A
9	100	A
10	100	A
27	100	A
12	100	A
13	100	A
14	100	A
15	100	A
16	100	A
25	100	A
18	100	A
19	100	A
28	100	A
21	100	A
30	100	A
23	100	A
24	100	A
29	100	A
26	100	A
11	98	A
4	95	A
6	35	B
1	0	C

ANEXO 7

Prueba de Duncan (1%) para los efectos de los tratamientos en el Peso de Callo a los 28 días de inducción

Tratamiento	Media	Duncan
21	2,995	A
5	2,9655	AB
11	2,1052	AB
28	2,088	ABC
10	2,0764	ABC
15	1,9472	ABCD
13	1,8968	ABCD
9	1,8422	ABCD
29	1,8193	ABCD
25	1,8104	ABCD
22	1,8019	ABCD
20	1,7328	ABCD
14	1,6411	ABCD
17	1,6228	ABCD
19	1,6043	ABCD
30	1,5859	ABCD
8	1,5422	ABCD
24	1,5317	BCD
18	1,513	BCD
16	1,4839	CD
27	1,4499	CD
23	1,435	CD
7	1,3821	CD
2	1,2691	CD
26	1,2511	CD
6	1,2306	CD
3	1,1152	CD
12	1,106	CD
4	0,5081	D
1	0,4817	D

ANEXO 8
Prueba de Duncan (1%) para los efectos de los tratamientos en el
Peso de Callo a los 56 días de inducción

Tratamiento	Media	Duncan
21	3,6319	A
5	3,193	AB
28	3,0499	AB
11	3,0168	AB
20	2,9382	ABC
15	2,8589	ABC
29	2,8295	ABC
19	2,8007	ABCD
8	2,7769	ABCD
18	2,3965	ABCD
17	2,3375	ABCDE
25	2,3165	ABCDE
30	2,239	ABCDE
13	2,2014	ABCDE
22	1,9626	ABCDE
27	1,9528	ABCDE
9	1,9169	ABCDE
23	1,8891	ABCDE
2	1,7783	ABCDE
16	1,7781	ABCDE
14	1,7619	ABCDE
24	1,5807	BCDE
26	1,4599	BCDE
10	1,3933	BCDE
6	1,3838	BCDE
12	1,2735	BCDE
7	1,0267	CDE
3	0,9011	DE
4	0,4495	E
1	0,4199	E

ANEXO 9

Prueba de Duncan (1%) para los efectos de los tratamientos en el Peso de Callo a los 84 días de inducción

Tratamiento	Media (g)	Duncan
19	5,393	A
29	5,233	AB
16	3,453	ABC
5	3,403	ABC
27	3,127	BCD
20	3,031	BCDE
17	3,011	BCDE
30	2,765	CDE
22	2,554	CDE
8	2,425	CDE
25	2,405	CDE
23	2,286	CDE
21	2,204	CDE
15	2,199	CDE
28	2,095	CDE
14	1,864	CDE
26	1,662	CDE
13	1,639	CDE
10	1,571	CDE
11	1,547	CDE
24	1,539	CDE
12	1,476	CDE
9	1,375	CDE
2	1,346	CDE
7	1,149	CDE
6	1,007	CDE
18	0,97	CDE
3	0,8	DE
4	0,731	DE
1	0,548	E

ANEXO 10

Prueba de Duncan (1%) para los efectos de los tratamientos en el
Porcentaje de Supervivencia de Callo a los 56 días de inducción

Tratamiento	Media	Duncan
11	100	A
12	98,33	A
19	98,33	A
3	96,67	AB
20	95	ABC
13	95	ABC
22	93,33	ABC
30	93,33	ABC
4	91,67	ABC
15	90	ABCD
14	83,33	ABCD
8	83,33	ABCD
24	83,33	ABCD
2	80	ABCD
17	78,33	ABCDE
23	78,33	ABCDE
7	73,33	ABCDEF
9	66,67	ABCDEF
21	66,67	ABCDEF
27	65	ABCDEF
28	58,33	ABCDEF
25	58,33	ABCDEF
29	56,67	ABCDEF
5	53,33	ABCDEF
26	48,33	BCDEFG
18	46,67	CDEFG
16	41,67	DEFG
10	31,67	EFG
6	28,33	FG
1	6,67	G

ANEXO 11

Prueba de Duncan (1%) para los efectos de los tratamientos en el Porcentaje de Supervivencia de Callo a los 84 días de inducción

Tratamiento	Media	Duncan
22	91,67	A
3	90	AB
12	80	ABC
20	78,33	ABC
13	76,67	ABC
24	76,67	ABC
23	75	ABC
19	73,33	ABC
4	73,33	ABC
11	71,67	ABC
9	66,67	ABCD
2	65	ABCD
14	60	ABCDE
8	51,67	ABCDE
30	50	ABCDE
27	46,67	ABCDE
17	45	ABCDE
29	43,33	ABCDE
25	35	ABCDE
7	35	ABCDE
5	33,33	BCDE
15	33,33	BCDE
26	31,67	CDE
18	31,67	CDE
16	28,33	CDE
21	28,33	CDE
10	26,67	CDE
28	25	CDE
6	11,67	DE
1	5	E

ANEXO 12

Prueba de Duncan (1%) para los efectos de los tratamientos en el Porcentaje de Supervivencia de Callo a los 112 días de inducción

Tratamiento	Media	Duncan
24	73,33	A
22	68,33	A
4	53,33	AB
2	51,67	AB
3	45	ABC
23	40	ABCD
14	28,33	BCD
13	25	BCD
9	23,33	BCD
20	23,33	BCD
5	21,67	BCD
11	21,67	BCD
30	21,67	BCD
21	20	BCD
15	15	BCD
10	15	BCD
17	15	BCD
27	15	BCD
29	13,33	BCD
6	8,33	CD
12	6,67	CD
16	0	D
7	0	D
8	0	D
1	0	D
18	0	D
19	0	D
28	0	D
25	0	D
26	0	D