

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

“Efecto del ácido Naftalenacético y Bencilaminopurina en el crecimiento de hojas, brotes y tallo por multiplicación vegetativa de *Stevia Rebaudiana* utilizando un biorreactor de inmersión por gravedad”

TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR:

Bach. Valencia Sánchez, Elsa Xiomara

ASESOR:

M. Sc. Alva Muñoz, Eterio Amaranto

ORCID: 0000-0002-4113-7981

NUEVO CHIMBOTE – PERÚ

2023

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

“Efecto del ácido Naftalenacético y Bencilaminopurina en el crecimiento de hojas, brotes y tallo por multiplicación vegetativa de *Stevia Rebaudiana* utilizando un biorreactor de inmersión por gravedad”

Tesis para optar por el Título Profesional de Licenciado en Biotecnología

Revisado y aprobado por el Asesor

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Eterio Amaranto', is positioned above a horizontal line.

M. Sc. Alva Muñoz, Eterio Amaranto
DNI: 32406295
ID ORCID: 0000-0002-4113-7981

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

Revisado y aprobado por el Jurado Evaluador

M, Sc. Diestra Balta Jesús
PRESIDENTE

DNI: 70553964
ID ORCID: 0000-0003-2462-2229

M, Sc. Villanueva Carlos José
SECRETARIO

DNI: 32733772
ID ORCID: 0000-0002-5056-0001

M, Sc. Alva Muñoz Eterio
INTEGRANTE

DNI: 32406295
ID ORCID: 0000-0002-4113-7981

ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en la reunión en la sala de sesiones del DABMB de dando cumplimiento a la Resolución N° 084-2023-UNS-CFC, siendo las 11 horas del día 07 de febrero del 2023

Se reunió el Jurado Evaluador presidido por el M.Sc. Jesús Diestra Balta, teniendo como miembros a M.Sc. José Villanueva Carlos (Secretario), en calidad de accesitario en reemplazo del M.Sc. Joseph Campos Ruiz ausente por motivos personales, y M.Sc. Eterio Alva Muñoz (Integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA, realizado por la tesista Bach. Valencia Sánchez, Elsa Xiomara, quien expuso el trabajo intitulado:

“Efecto del ácido naftalenacético y bencilaminopurina en el crecimiento de hojas, brotes y tallo por multiplicación vegetativa de *Stevia rebaudiana* utilizando un biorreactor de inmersión por gravedad”.

Terminada la sustentación la tesista respondió a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como BUENO asignándole un calificativo de Dieciocho puntos. Según artículo 111° del Reglamento General de Grados y Títulos vigente (Resolución N° 580-2022-CU-R-UNS)

Siendo las 11:00 am del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad


.....
Nombre: M Sc. Jesús Diestra Balta

..
Presidente


.....
Nombre: M,Sc. José Villanueva Carlos

..
Secretario


.....
Nombre: M.Sc. Eterio Alva Muñoz
Integrante

Distribución: Integrantes JE (03), tesistas () y archivo FC (02).

DEDICATORIA

A Dios por ser mi guía constante para mantener mis pasos por el camino correcto, por haberme brindado salud y protección.

A mi padre, Edgardo Valencia Rodríguez, por ser una persona trabajadora, perseverante y admirable, que siempre luchó para brindarnos lo mejor como familia; y a mi madre Gladis Sánchez Cruz, por darme siempre su apoyo, consejos e incentivo para seguir adelante con mis objetivos.

A mis hermanas, Nadir Valencia, porque siempre fuiste un ejemplo a seguir para mí y a Antonella Valencia, por su cariño y porque a través de esto, sepas que con esfuerzo y dedicación toda meta se puede cumplir.

Elsa Xiomara Valencia Sánchez

AGRADECIMIENTO

Agradezco de manera especial al Dr. Julio Chico Ruiz, porque en su momento me brindo constante apoyo, por haberme guiado con su paciencia, y su rectitud como docente, y sus valiosos aportes para esta investigación.

A mi asesor, Eterio Alva Muñoz, por haber aceptado darme la oportunidad de trabajar junto a él, por su amabilidad al darme las facilidades que necesitaba para realizar este proyecto.

A mis diversos docentes, por haber compartido conmigo sus experiencias y conocimientos a lo largo de mi carrera profesional, que fue base fundamental para poder hoy en día estar ejerciendo esta hermosa profesión.

A Sergio Yupanqui, por influir positivamente en mí y porque a pesar de la distancia, fuiste el refuerzo necesario para cumplir cada meta trazada.

A Lunita, por las alegrías brindadas.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTO.....	IV
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	XII
I. INTRODUCCION.....	13
1.1. FORMULACIÓN DE OBJETIVOS.....	19
1.1.1. Objetivo General:.....	19
1.1.2. Objetivos específicos:.....	19
1.2. HIPÓTESIS.....	19
1.3. JUSTIFICACION E IMPORTANCIA.....	20
II. MARCO TEÓRICO.....	21
2.1. Propagación <i>in vitro</i> :.....	21
2.2. Diferencias entre medio de cultivo sólido y líquido:.....	22
2.3. Propagación de Estevia:.....	23
2.3.1. Propagación sexual:.....	23
2.3.2. Propagación asexual:.....	23
2.4. Sistema de inmersión BIG:.....	24
2.4.1. Comparación entre un biorreactor de inmersión por gravedad y un cultivo <i>in vitro</i> convencional:.....	26
2.4.2. Ventajas de un biorreactor de inmersión por gravedad:.....	27
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1. Localización del ensayo.....	29
3.2. Selección de plantas madres:.....	29
3.3. Esterilización de materiales:.....	29
3.4. Desinfección superficial y preparación del material vegetal.....	30
3.5. Preparación de los explantes <i>ex vitro</i> :.....	31
3.6. Preparación de 210 ml de medio MS sólido:.....	31
3.7. Siembra y establecimiento aséptico de explantes:.....	32
3.8. Diseño del biorreactor de inmersión por gravedad:.....	33
3.9. Preparación de 750 ml de medio MS líquido.....	34
3.10. Preparación de medio Ms sólido con tratamientos:.....	35
3.11. Etapa de obtención de plántulas libres de contaminación y transferencia:.....	36
3.12. Etapa de seguimiento:.....	37

3.13. Diseño experimental:	38
3.14. Variable Respuesta:	39
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	40
4.1. Evaluación del índice de sobrevivencia de explantes.....	40
4.2. Análisis de tratamientos con ANA y BAP.....	41
4.3. Evaluación de longitud de tallo de explantes de <i>Stevia rebaudiana</i> en BIG (biorreactor de inmersión por gravedad).....	41
4.4. Evaluación de número de brotes de explantes de <i>Stevia rebaudiana</i> en BIG (biorreactor de inmersión por gravedad).....	51
4.5. Evaluación de número de hojas de explantes de <i>Stevia rebaudiana</i> en BIG (biorreactor de inmersión por gravedad).....	60
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	69
5.1. CONCLUSIONES	69
5.2. RECOMENDACIONES	70
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS Y VIRTUALES.....	71
VII. ANEXOS.....	76

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Tratamientos con diferentes concentraciones de ANA y BAP.....	38
Tabla 2: Datos de los explantes libres de contaminación en el pre-cultivo	41
Tabla 3: Datos de medición de longitud de tallo en biorreactor de inmersión por gravedad	42
Tabla 4: Datos estadísticos descriptivos de la longitud del tallo (cm) de <i>Stevia rebaudiana</i> para cada tratamiento utilizando un biorreactor de inmersión por gravedad (BIG).....	43
Tabla 5: Datos de medición de longitud de tallo del metodo convencional en MS sólido	43
Tabla 6: Datos estadísticos descriptivos de la longitud del tallo (cm) de <i>Stevia rebaudiana</i> para cada tratamiento utilizando el método convencional	44
Tabla 7: ANOVA factorial de los datos del crecimiento de <i>Stevia rebaudiana</i> en función de la longitud del tallo (cm) utilizando diversos métodos de operación (BIG y convencional).....	45
Tabla 8: Análisis Post-Hoc - Tukey para las medias de longitud de tallo por tratamiento en BIG (bioreactor de inmersión por gravedad).....	46
Tabla 9: Agrupacion de datos utilizando el método de Tukey a un nivel de confianza de 95% para longitud de tallo en BIG	46
Tabla 10: Análisis Post-Hoc - Tukey para las medias de longitud del tallo por tratamiento convencional	47
Tabla 11: Agrupación de los datos utilizando el método Tukey a un nivel de confianza de 95% para longitud del tallo por método convencional.....	47
Tabla 12: Datos de números de brotes obtenidos mediante el uso del biorreactor de inmersión por gravedad.....	51
Tabla 13: Datos estadísticos descriptivos para el número de brotes de <i>Stevia rebaudiana</i> utilizando un biorreactor de inmersión por gravedad (BIG)	52
Tabla 14: Datos de números de brotes obtenidos mediante el método de micropropagación convencional.....	52
Tabla 15: Datos estadísticos descriptivos para el número de brotes de <i>Stevia rebaudiana</i> mediante el metodo de micropropagación convencional	53

Tabla 16: ANOVA factorial de los datos del crecimiento de <i>Stevia rebaudiana</i> en función del número de brotes utilizando diversos métodos de operación (BIG y convencional).....	54
Tabla 17: Análisis Post-Hoc - Tukey para las medias de numero de brotes mediante el uso de un bioreactor de inmersión por gravedad.....	55
Tabla 18: Agrupación de los datos utilizando el método Tukey a un nivel de confianza de 95% mediante un bioreactor de inmersión por gravedad (BIG).....	55
Tabla 19: Análisis Post-Hoc - Tukey para las medias de numero de brotes mediante el método convencional.....	56
Tabla 20: Agrupación de los datos utilizando el método Tukey a un nivel de confianza de 95% mediante el método convencional.....	57
Tabla 21: Datos de números de hojas obtenidos mediante el uso del biorreactor de inmersión por gravedad.....	60
Tabla 22: Datos estadísticos descriptivos para el número de hojas de <i>Stevia rebaudiana</i> mediante el uso de un biorreactor de inmersión por gravedad (BIG).....	61
Tabla 23: Datos de números de hojas obtenidos mediante el cultivo convencional con MS sólido.....	62
Tabla 24: Datos estadísticos descriptivos para el número de hojas de <i>Stevia rebaudiana</i> mediante el método convencional de MS sólido.....	63
Tabla 25: ANOVA factorial de los datos del crecimiento de <i>Stevia rebaudiana</i> en función del número de hojas utilizando diversos métodos de operación (BIG y convencional).....	64
Tabla 26: Análisis Post-Hoc - Tukey para las medias de número de hojas mediante el uso de un biorreactor de inmersión de gravedad.....	65
Tabla 27: Agrupación de los datos utilizando el método Tukey a un nivel de confianza de 95% mediante un biorreactor de inmersión por gravedad (BIG).....	65
Tabla 28: Análisis Post-Hoc - Tukey para las medias de número de hojas mediante el método convencional.....	66
Tabla 29: Agrupación de los datos utilizando el método Tukey a un nivel de confianza de 95% mediante el método convencional.....	66
Tabla 30: Macronutrientes del medio Murashige y Skoog.....	76
Tabla 31: Micronutrientes del medio Murashige y Skoog.....	76

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Sistema de inmersión por gravedad.....	25
Figura 2: Materiales esterilizados.....	29
Figura 3: Soluciones para desinfección.....	30
Figura 4: Ramas de <i>Stevia rebaudiana</i>	30
Figura 5: Pesado de sacarosa.....	30
Figura 6: Medio MS puro.....	31
Figura 7: Segmentos nodales sembrados in vitro en MS sólido.....	32
Figura 8: Conducto de aire y filtros de membrana hidrofóbicos.....	33
Figura 9: Sistema de inmersión por gravedad.....	34
Figura 10: Reactivos de ANA y BAP.....	35
Figura 11: Fitohormonas preparadas.....	34
Figura 12: Fitohormonas en medio MS.....	35
Figura 13: Segmentos nodales en BIG.....	36
Figura 14: Segmentos nodales en cultivo convencional.....	37
Figura 15: Gráfica de Interacción para longitud del tallo (cm) en respuesta al método utilizado.....	48
Figura 16: Gráfica de interacción para longitud de tallo (cm) por tratamiento utilizado.....	49
Figura 17: Gráfica de efectos principales para longitud del tallo.....	50
Figura 18: Gráfica de interacción para número de brotes en respuesta al método utilizado.....	58
Figura 19: Gráfica de interacción para número de brotes por tratamiento utilizado.....	58
Figura 20: Gráfica de efectos principales para número de brotes.....	59
Figura 21: Gráfica de interacción para número de hojas en respuesta al método usado.....	67
Figura 22: Gráfica de interacción para número de hojas por tratamiento utilizado.....	68
Figura 23: Gráfica de efectos principales para número de hojas.....	68
Figura 24: Filtros hidrofóbicos.....	75
Figura 25: Válvula selenoide.....	77
Figura 26: Esterilización de frascos del biorreactor de inmersión por gravedad.....	77
Figura 27: Plántulas desarrolladas en BIG.....	76
Figura 28: Plántulas a los 30 días de desarrollo.....	78

Figura 29: Algunas plántulas obtenidas en el tratamiento 1 (ANA 0.1 mg/l y BAP 1.0 mg/l) en BIG.....	79
Figura 30: Plántulas obtenidas en el tratamiento 7 (Sin hormonas) del BIG.....	79
Figura 31: Medición de plántulas de T1 para determinación longitud de tallo.....	80
Figura 32: Plántulas representativas del tratamiento 1, que demostraron una buena longitud de tallo, número de brotes y hojas.....	80
Figura 33: Segmentos nodales sembrados en MS sólido con tratamiento 2 (ANA 1.0 mg/l y BAP 0.1 mg/l).....	81
Figura 34: Desinfección de segmentos nodales antes de ser sembrados en cultivos <i>in vitro</i> de MS sólido.....	82
Figura 35: Plántulas obtenidas mediante el método convencional, del tratamiento 1 (ANA 0.1 mg/l y BAP 1.0 mg/l).....	82
Figura 36: Plántulas obtenidas mediante el método convencional, del tratamiento 7 (sin hormonas).....	82
Figura 37: Contaminación de explante en el método convencional de MS sólido	83
Figura 38: Medición de longitud de tallo en plántulas obtenidas mediante el método convencional de MS sólido.....	83

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue el crecimiento de hojas, brotes y tallo de *Stevia rebaudiana* bajo el efecto del ácido naftalenacético y bencilaminopurina utilizando un biorreactor de inmersión por gravedad, el cual contuvo el medio de cultivo Murashigue & Skoog (MS) líquido. Se empleó un diseño experimental completamente al azar con las combinaciones de 0.1 y 1.0 mg/l de las fitohormonas, se contó con 6 tratamientos y un blanco, 15 repeticiones y 105 unidades experimentales. Los resultados se determinaron a los 30 días de evaluación del crecimiento de las plántulas, en donde el tratamiento 1 (ANA 0.1 mg/l y BAP 1.0 mg/l), fue identificado como el mejor. Adicional a ello, se realizó una comparación con los resultados de una micropropagación *in vitro* convencional, siendo el biorreactor de inmersión por gravedad un mejor método de multiplicación vegetativa, obteniendo los resultados del BIG (4.7 cm de longitud de tallo, 7 brotes y 8 hojas); mientras que en el método convencional (4.1 cm de longitud de tallo, 5 brotes y 7 hojas). Esto representa una nueva alternativa para el mejoramiento en la multiplicación vegetativa *in vitro* de la planta *Stevia rebaudiana* mediante el uso de un biorreactor de inmersión por gravedad, siendo de utilidad para los productos de esta importante especie, y para futuras investigaciones que busquen el desarrollo en la productividad de esta planta.

Palabras Claves: *Stevia rebaudiana*, *in vitro*, fitohormonas.

ABSTRACT

The objective of this research was the growth of *Stevia rebaudiana* leaves, shoots and stem under the effect of naphthaleneacetic acid and benzylaminopurine using a gravity immersion bioreactor, which contained the liquid Murashigue & Skoog (MS) culture medium. A completely randomized experimental design was used with the combination of 0.1 and 1.0 mg/l of the phytohormones, there were 6 treatments and a blank, 15 repetitions and 105 experimental units. The results were determined after 30 days of evaluating the growth of the seedlings, where treatment 1 (ANA 0.1 mg/l and BAP 1.0 mg/l) was identified as the best. In addition to this, a comparison was made with the results of a conventional in vitro micropropagation, being the Gravity Immersion Bioreactor a better method of vegetative multiplication, obtaining the results of the BIG (4.7 cm stem length, 7 buds and 8 leaves); while in the conventional method (4.1 cm stem length, 5 buds and 7 leaves). This represents a new alternative for the improvement in the in vitro vegetative multiplication of the *Stevia rebaudiana* plant through the use of a gravity immersion bioreactor, being useful for the products of this important species, and for future research that seeks the development in the productivity of this plant.

Keywords: *Stevia rebaudiana*, in vitro, phytohormones.

I. INTRODUCCIÓN

Stevia rebaudiana pertenece a la familia Asterácea, es una planta herbácea perenne de tallo erecto y subleñoso, pubescente que durante su desarrollo inicial no posee ramificaciones, tornándose multicaule después del primer ciclo vegetativo, llegando a producir hasta 20 tallos en tres a cuatro años; puede alcanzar hasta 90 cm de altura en su hábitat natural y en los trópicos puede llegar a tener alturas superiores a 100 cm. Posee una raíz pivotante, filiforme, y no profundiza, distribuyéndose cerca de la superficie. La *S. rebaudiana* tiene hojas elípticas, ovales o lanceoladas y algo pubescentes; presentan disposición opuesta en sus estados juveniles, y alternas cuando las plantas llegan a su madurez fisiológica, previa a la floración. La flor es hermafrodita, pequeña y blanquecina; su corola es tubular, pentalobulada, en capítulos pequeños terminales o axilares (Clinton, 1982).

Posee propiedades medicinales ya que puede desarrollar efectos beneficiosos sobre la diabetes de tipo II, gracias a sus compuestos llamados glicósidos con propiedades edulcorantes sin calorías la cual es unas 30 veces mayor que el azúcar. Sus principales principios activos que son los esteviosidos y rebaudiosidos se encuentran contenidos en altos porcentajes en las hojas, siendo estas las principales partes de la planta tomadas para producir el edulcorante (Ramirez, 2005). Los esteviosidos que están contenidas en las hojas, es una sustancia formada por una mezcla de hasta seis glucósidos diterpénicos las cuales son las responsables del sabor dulce de estas hojas y son 100 a 400 veces más dulce que la sacarosa y gracias a sus características tanto fisicoquímicas como toxicológicas permite que se pueda incluir en la dieta humana como edulcorante dietético natural sin ningún tipo de efecto, así también puede ser incluida en la dieta de personas con diabetes de tipo II sin los efectos que podría causar el azúcar normal (Osorio *et al.*, 2007). Los estudios científicos futuros sobre esta planta serán de gran ayuda para la agroindustria que ya ha empezado a incorporar a la estevia como endulzante de bebidas y otros (Salvador *et al.*, 2014).

Otra de las ventajas adicionales son que no eleva los niveles de glucosa en la sangre, no aporta calorías al ser metabolizado, es antiácido, cardiotónico, no produce caries al no ser fermentado por las bacterias orales, y se distingue de los edulcorantes artificiales por no tener sabor metálico y no ser cancerígeno (Tadhani, 2007).

En Perú y exclusivamente en Paraguay y otros países en desarrollo como Bolivia y Ecuador se ha logrado tomar conciencia de la oportunidad que la *Stevia* representa y eso implica mejorar la promoción y capacitación de buenas prácticas de cultivo y también análisis químicos y nutricionales de esta planta. Para esto se promueve actividades empresariales direccionadas a una gestión ambiental y uso de tecnologías limpias (Puentes, 2014).

El cultivo *in vitro* de plantas es una técnica que exige un control específico del ambiente, tanto físico como químico, en el que se sitúa al explante, órgano o tejido vegetal que se desee cultivar. Conviene, por tanto, conocer cuáles son los principales factores que lo conforman y que deberán ser controlados (Castillo, 2004). En los últimos años, el cultivo *in vitro* ha presentado un desarrollo exponencial (Pierik, 1988). La tasa a la cual los cultivos *in vitro* crecen y producen yemas durante la micropropagación pueden estar influidas por la naturaleza física del medio (George, 1993).

A diferencia de las técnicas tradicionales de cultivo, esta técnica permite la propagación de grandes volúmenes de plantas en menor tiempo y espacio. Por otro lado, la técnica es de gran utilidad para la obtención de plantas libres de patógenos y contaminaciones; plantas homocigotas, en la producción de plantas en peligro de extinción, en estudios de ingeniería genética, etc. (Castillo, 2004). El proceso que utiliza técnicas de cultivo *in vitro*, es en las que se selecciona un explante, se desinfecta, se aísla en un recipiente estéril y, artificialmente, se le otorga condiciones para el correcto desarrollo. (Paredes *et al.*, 2009).

La micropropagación, clonación *in vitro* o multiplicación vegetativa de plantas es una de las aplicaciones biotecnológicas más desarrollada en los últimos años. En la actualidad constituye una de las herramientas más utilizadas. Por esta vía, es posible obtener un gran número de individuos libres de plagas y enfermedades en menor tiempo y empleando espacios reducidos, lo cual servirá para su conservación y sistematización del cultivo en su comercialización y la posibilidad de producir plantas durante todo el año (Spinoso *et al.*, 2014). Este proceso utiliza técnicas de cultivo *in vitro* y se da cuando una planta se desarrolla a partir de una célula, un tejido, un órgano o alguna parte de una planta de interés. Todas las partes de una planta bajo condiciones adecuadas para el crecimiento, como luz, temperatura, humedad, nutrientes entre otros, pueden dar origen a una nueva planta completa, ya que las células de tejidos maduros de

la planta conservan una característica llamada totipotencialidad con la cual una planta adulta puede desdiferenciarse y retomar la actividad meristemática para multiplicarse y dar origen a los órganos vegetativos (Luna, 2016).

Para realizar la micropropagación se seleccionan plantas madres que deben cumplir con ciertas condiciones de calidad, lo que permite obtener clones adecuados. La multiplicación vegetativa es un sistema de multiplicación asexual de plantas que, a diferencia de la propagación convencional en viveros comerciales, se realiza en condiciones de laboratorio, donde se aplican condiciones de asepsia controladas a fin de evitar la reproducción de enfermedades. Como la multiplicación es rápida y a gran escala, se obtienen beneficios en ahorro de tiempo y de recursos. En efecto, 1 m^2 de plantas en el laboratorio puede representar 1 ha en el campo, la tasa de crecimiento es exponencial y el material obtenido es uniforme (Paredes *et al.*, 2009).

La multiplicación vegetativa por segmentos nodales, estacas o esquejes es una técnica en la que se usan segmentos del tallo de la planta con las yemas axilares los cuales en condiciones adecuadas de crecimiento pueden producir nuevas plantas idénticas a la planta madre. Este es una técnica muy usada para propagar arbustos ornamentales y otros cultivos arbustivos y leñosos (Basial, 2001).

El método de los segmentos nodales tiene la ventaja de generar poca variación genética en las muestras, ya que en ningún momento se forma tejido calloso. Se inicia escindiendo segmentos de tallo con su correspondiente yema axilar. En el cultivo las yemas crecen y se alargan produciendo nuevos segmentos nodales susceptibles de ser a su vez escindidos. En un momento determinado los segmentos nodales producidos pueden dar origen a tallos y raíces ya sea *in vitro* o en el suelo, mediante una alteración de la composición hormonal del medio (Basial, 2001).

Las fitohormonas o también conocidas como reguladores de crecimiento, son producidos por las mismas plantas a muy bajas concentraciones y producen efectos fisiológicos definidos. Existen cinco familias de fitohormonas las cuales son las más conocidas y utilizadas comercialmente como auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico, todos los grupos actúan de manera coordinada para regular el crecimiento en las diferentes partes de la planta (Aguilar *et al.*, 2006).

Las auxinas fueron las primeras fitohormonas en ser descubiertas, se encuentran en toda la planta, aunque principalmente se producen en las regiones de crecimiento es decir en

los ápices, esto se asocia con la elongación del tallo, formación de raíces adventicias, inducción de floración, diferenciación vascular. Normalmente se usan compuestos como el ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) y el 2,4-ácido Diclorofenoxiacético (2,4-D). El ácido naftalenacético es un compuesto orgánico que es muy utilizada en propagación vegetativa de plantas a partir de esquejes y segmentos nodales. Tiene diversas funciones relacionadas con la elongación y el enraizamiento y una de las ventajas es que no es sensible a la luz como el AIB (Aguilar *et al.*, 2006).

Las citoquininas son hormonas que estimulan la división celular en tejidos meristemáticos como ápices radiculares, yemas del tallo, nódulos de raíces leguminosas y semillas de germinación. Otro de los efectos que posee este grupo es de retrasar la senescencia en las hojas para que estas se mantengan por mucho más tiempo en su lugar. Este grupo de hormonas vegetales se encuentra compuesto por 6-Bencilaminopurina (BAP), N-isopentenilaminopurina (2ip) y zeatina. Siendo la hormona BAP un regulador de crecimiento y elongación de tallos y raíces e induce la formación de órganos (Baldetti, 2002).

El sistema de inmersión temporal está compuesto por dos frascos de cultivo de vidrio, uno para el crecimiento de los segmentos nodales y el otro como reservorio de medio de cultivo. Estos frascos de cultivo se conectan entre sí por una manguera de silicona de seis milímetros de diámetro, mediante conectores de vidrio que atraviesan la tapa del frasco. El medio de cultivo circula de un frasco de cultivo a otro en dependencia de la apertura o cierre de electroválvulas de tres vías, las cuales se conectan a un temporizador programable para determinar el tiempo y la frecuencia de la inmersión. La entrada de los frascos de cultivo posee filtros hidrofóbicos, para garantizar la esterilidad del aire. Con una presión del aire de 2,0 atm proveniente de un compresor, regulada por un manómetro. Con un tiempo de inmersión de 10 min con una frecuencia cada 6 horas (4 inmersiones por día) (Cabrera *et al.*, 2008).

Con el empleo del sistema de inmersión se han obtenido los más altos valores para el coeficiente de multiplicación, con diferencias significativas respecto al sistema de cultivo con el medio de cultivo líquido estático con renovación pasiva de la atmósfera interna en donde obtuvieron aproximadamente el 65 % de plántulas sanas y libres de patógenos (Cabrera *et al.*, 2008).

En una investigación diseñaron e instalaron un sistema de biorreactores para la micropropagación a gran escala de *Vanilla planifolia* Jacks ex Andrews, una orquídea de importancia económica. Se comparó la eficiencia del protocolo de cultivo *in vitro* empleando el método convencional en medio sólido con el sistema de inmersión temporal en medio líquido. Los resultados mostraron que el cultivo en biorreactores permitió alcanzar en 30 días de cultivo una tasa más elevada de multiplicación (12 brotes/explante) mientras que en medio semisólido la tasa de multiplicación fue menor (7 brotes/explante), indicando que el sistema de cultivo en biorreactores es una excelente alternativa para la propagación *in vitro* de diversas especies (Spinoso *et al.*, 2014).

Los Biorreactores permiten controlar mejor la producción que cuando se usan los métodos tradicionales en aspectos como variación en calidad y rendimiento. Otra ventaja es que reducen la duración del ciclo productivo. El uso de Biorreactores en el cultivo de tejidos tiene como objetivos principales obtener productividad alta, rendimiento alto y concentraciones altas de producto (Debnath, 2011).

Otros estudios realizados en caña de azúcar (*Sacharum spp.*) mostraron una tasa de multiplicación de $8,13 \pm 0,6$ explantes cuando se cultivó en SIT, comparada con $4,0 \pm 0,8$ versus el cultivo en medio semisólido (Lorenzo *et al.*, 1998).

Algunos biorreactores se incuban a una temperatura de 25 – 30°C, con un fotoperiodo de 11 o 12 horas diarias bajo luz blanca fluorescente, que junto con el medio seleccionado de concentraciones BAP (2,1 mg L⁻¹) - ANA (0,3 mgL⁻¹) adicionados al medio de Murashige y Skoog, dan a conocer un índice de multiplicación mayor, dando lugar a una tasa de multiplicación de 11 brotes; mientras que por otro lado, suplementando el medio de Murashige y Skoog con BAP (1 mg L⁻¹) - ANA (0,25 mgL⁻¹), con luz constante y un medio con la combinación de concentraciones BAP (2 mg L⁻¹) - ANA (2 mgL⁻¹), en un periodo de 1 mes, obtuvieron una tasa de multiplicación de 6.5, resaltando que las unidades propagativas (hijuelos) obtenidas tenían en promedio 2 cm de largo (Llanos, 2015).

Se demostró para el crecimiento de los segmentos nodales en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.), mediante el estudio de dos sistemas de cultivo semiautomatizados, el control semicontinuo del nivel de medio de cultivo y la inmersión temporal, que los segmentos nodales desarrolladas en el SIT presentaron

coeficientes de multiplicación superior debido a las condiciones de cultivo creadas en este sistema de cultivo (Perez, 2001).

Actualmente en el país existen distintos cultivos a los que se les denomina plantas medicinales, pero la falta de interés de empresas que puedan promover el desarrollo agroindustrial hace que estos se vean limitados ya que no existe un respaldo económico. Debido a que existe un gran interés en implementar tecnologías limpias sin residuos en la agroindustria, los alimentos deben ser lo más seguros posible tanto desde el punto de vista de higiene como de salud y al mismo tiempo deben tener la máxima calidad ya que existe un rechazo a los aditivos químicos de proceso sintético los cuales son añadidos a distintos alimentos y bebidas. Por lo tanto, en los últimos años se está prestando mucho más interés al uso de plantas como la estevia, esta es una planta que requiere pocas cantidades de agua para su producción que cualquier otro ingrediente edulcorante. Frente a esta realidad, nos planteamos solucionar este problema, utilizando el cultivo in vitro de tejidos vegetales y buscando el efecto de dosis de las fitohormonas en un medio de cultivo adecuado para esta especie vegetal. (Condori, 2013)

Con respecto a lo descrito planteamos el siguiente problema ¿Cuál es el efecto del ácido naftalenacético y bencilaminopurina en el crecimiento de hojas, brotes y tallo de *Stevia rebaudiana* utilizando un biorreactor de inmersión por gravedad?

1.1. FORMULACIÓN DE OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo General:

- Determinar el efecto del ácido naftalenacético y bencilaminopurina en el crecimiento de hojas, brotes y tallo por multiplicación vegetativa de *Stevia rebaudiana* utilizando un biorreactor de inmersión por gravedad.

1.1.2. Objetivos específicos:

- Determinar la concentración del ácido naftalenacético en el medio de cultivo MS, para el crecimiento de hojas, brotes y tallo de la planta *Stevia rebaudiana*.
- Determinar la concentración del bencilaminopurina en el medio de cultivo MS, para el crecimiento de hojas, brotes y tallo de la planta *Stevia rebaudiana*.
- Determinar las concentraciones del ácido naftalenacético y bencilaminopurina en el medio de cultivo MS, para el crecimiento de hojas, brotes y tallo de la planta *Stevia rebaudiana*.
- Realizar una comparación estadística de los datos obtenidos del sistema de inmersión por gravedad en MS líquido y un cultivo *in vitro* convencional en MS sólido.

1.2. HIPÓTESIS

La adición de ácido naftalenacético y bencilaminopurina en concentraciones de (0.1 y 1.0 mg/l) influirá positivamente en el crecimiento de hojas, brotes y tallo por multiplicación vegetativa de *Stevia rebaudiana* utilizando un biorreactor de inmersión por gravedad.

1.3. JUSTIFICACION E IMPORTANCIA

El efecto de dosis de Ácido Naftalenacético (ANA) y Bencilaminopurina (BAP) en la producción *in vitro* de Estevia (*Stevia rebaudiana B.*) a partir de segmentos nodales, se realizó con la finalidad de obtener una dosis adecuada y plántulas de buen vigor, brindando apoyo a su desarrollo, crecimiento, aumento de la producción y la productividad, estimando que en el futuro esta planta está destinada a reemplazar al azúcar de sacarosa o azúcar de caña por los efectos perjudiciales que tiene para la salud humana.

La *Stevia rebaudiana* es propagada naturalmente por semillas, pero tiene baja germinación y una pérdida acelerada de la viabilidad, es por eso que no es un método recomendable. Además, por ser una planta alógama, tiene mucha variabilidad genética y fenotípica, lo que tiene como consecuencia una menor calidad de las hojas en donde se encuentra el esteviosido, por ello la micropropagación es una alternativa para contra-restar estas desventajas (Osorio *et al.*, 2007).

El cultivo de tejidos es uno de los métodos que nos permite obtener plantaciones más uniformes, y una rápida multiplicación clonal, economizando el costo debido a que las plántulas que se obtienen son libres y sanas de enfermedades (Paredes *et al.*, 2009).

El uso de un sistema de inmersión por gravedad permitirá controlar las condiciones de los cultivos *in vitro*, proporcionándonos el manejo del contacto entre el aire y plántula, evitando la desecación y vitrificación de los explantes generando en poco tiempo una mayor cantidad de material vegetativo, que mantenga su calidad, mediante un sistema automatizado (Debnath, 2011).

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Propagación *in vitro*:

El cultivo *in vitro* de plantas se realiza dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial diseñado para estas. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características básicas e importantes: la asepsia y el control de los factores que afectan el crecimiento.

Es un método de propagación de plantas de aplicación profesional ya que se lleva a cabo en un laboratorio, en condiciones libres de contaminantes y en lugares especiales. Este método consiste en tomar una parte de la hoja, embrión, o una pequeña porción de tallo (desde 0.2 a 1 milímetro) o cualquier parte de la planta y mantenerla en un recipiente de vidrio estéril sobre un medio acuoso nutritivo. En España existen 28 laboratorios dedicados a esta actividad como negocio. La base principal es que se realiza en condiciones controladas y con utensilios, cámara de manipulación totalmente estéril (Castillo, 2004).

Para este proceso en condiciones de laboratorio se realiza una simplificación de los factores reales de manera que se escogen aquellos que se puedan controlar ya que es muy complicado reproducir todos los factores que forman el ambiente natural de las plantas. A esto se le suma la complejidad de suministrarle a la planta todos los nutrientes que obtenía del sistema completo. Al realizarse este proceso solo con una parte de la planta, este recibe el término de explante ya sean órganos o tejidos vegetales (Sharry *et al.*, 2015).

La mayoría de métodos de propagación de plantas *in vitro* son una extensión de la propagación vegetativa tradicional, pero con la diferencia de que presentan ventajas sobre los métodos tradicionales, así como el uso de espacios reducidos para una gran cantidad de plantas libres de bacterias y hongos.

La micropropagación es uno de los métodos más generalizados del cultivo *in vitro*. A partir de un explante de planta madre se logra obtener una descendencia uniforme, es decir, genéticamente idénticas a las cuales se les puede denominar clones. El tipo de explante que más ha sido usado son las yemas vegetativas.

Los frascos que contienen los explantes se ubican en estanterías con luz artificial dentro de una cámara de crecimiento, en el cual se regula la cantidad de horas de luz y la temperatura en valores que pueden oscilar entre los 21 y 23°C. por otra parte el medio de cultivo debe componerse de sales minerales, vitaminas que regulen el crecimiento, azúcar, agua y agar estos compuestos varían dependiendo de la especie a cultivar (Castillo, 2004).

2.2. Diferencias entre medio de cultivo sólido y líquido:

- El cultivo en medio sólido requiere de la adición de un componente gelificante como es el agar agar, el cual es altamente utilizado para cultivos a nivel de laboratorio, este componente permite mantener al explante estático y de esta manera permite la transferencia de nutrientes, aunque es muy utilizado este tipo de medio representa algunas desventajas como la baja tasa de multiplicación en algunas especies, el cambio constante de medio, así como el previo lavado de raíces al trasladar el explante del sustrato (Sharry *et al.*,2015).
- El cultivo en medio líquido, permite obtener mejores resultados a comparación del cultivo semisólido, ya que permite un mayor contacto del medio con el explante y a las menores gradientes de difusión entre el medio y el explante, esto facilita la absorción de los nutrientes. Una desventaja es que, si se mantiene al explante a una inmersión continua del medio, este podría estresarse.

Características de una planta en condiciones de laboratorio (*in vitro*) respecto a una planta en condiciones naturales (*in vivo*) (Castillo, 2004):

- *In vitro*
 - No realiza fotosíntesis
 - Crecimiento en condiciones controladas
 - Crecimiento en condiciones de asepsia
 - Alta humedad relativa
 - Estomas no funcionales
 - Ausencia de pelos radiculares
 - Ausencia de cera en la cutícula

- *In vivo*
 - Realiza fotosíntesis
 - Crecimiento en condiciones no controladas
 - Exposición a los patógenos y gérmenes del ambiente
 - Humedad relativa variable
 - Estomas funcionales
 - Presencia de pelos radiculares
 - Presencia de cera en la cutícula

2.3. Propagación de Estevia:

2.3.1. Propagación sexual:

Stevia rebaudiana se reproduce sexualmente por aquenios, obteniéndose alta heterogeneidad en las poblaciones resultantes, debido principalmente a la polinización cruzada; gran parte de sus aquenios son estériles, livianos y de fácil dispersión por el viento.

La propagación por aquenios es útil para la mejora genética pero no para cultivos de forma comercial, ya que es muy difícil la recolección de semillas esto debido a su floración no uniforme lo cual afecta a la maduración de esta. Las semillas deben mantenerse en baja temperatura y humedad relativa y de preferencia en la oscuridad. A pesar de esto los porcentajes de germinación son bajos desde el 1 al 38% (Martínez, 2015).

2.3.2. Propagación asexual:

Debido a la alta heterogeneidad de las plantas obtenidas a través de semillas, la propagación agámica (sin semilla) es la mejor, ya que conserva las características de la planta madre. Ésta puede ser por hijuelos, estacas y por cultivo de tejidos.

- **Retoños y Matas:** se pueden separar hijuelos. Estos pueden ser llevados al terreno definitivo directamente. El número de hijuelos por planta es poco 6 numeroso, por lo que se hace útil para cultivos de pequeñas superficies y la selección y multiplicación de plantas madres

- **Estacas:** este método es útil para cultivos de escala comercial. De plantas adultas se separan estacas de tallos que contengan al menos dos o tres nudos, que se hacen enraizar en vivero durante el otoño e invierno distanciadas unos 10-15 cm entre sí.
- **Micropropagación:** La obtención de plantines por este método es el más conveniente para la obtención de clones de alta producción (Martínez, 2015).

2.4. Sistema de inmersión BIG:

Los sistemas de inmersión por gravedad son sistemas semiautomatizados, en la propagación *in vitro*, se basa en el contacto intermitente del medio de cultivo líquido con los explantes de interés por cortos periodos de tiempo y la consecuente renovación de la atmósfera gaseosa para evitar que se produzca la hiperhidricidad de los tejidos y la acumulación de gases tóxicos. En el sistema de inmersión temporal se logra un aumento de la eficiencia biológica y productiva del material propagado; debido entre otros aspectos al incremento de los coeficientes de multiplicación y la obtención de plantas de mayor calidad en comparación con el empleo del medio de cultivo en estado líquido o semisólido, así como la reducción de los costos de producción producidos en estos sistemas con respecto a los métodos convencionales. Existen distintos tipos de biorreactores de inmersión temporal como el recipiente de inmersión temporal automatizado (RITA), el biorreactor de inmersión temporal (BIT) y el biorreactor de inmersión por gravedad (BIG) (Avila, 2018).

- El sistema de inmersión por gravedad es el cultivo de células, tejidos u órganos expuestos temporalmente a medio de cultivo líquido en biorreactores semiautomatizados bajo condiciones axénicas y controladas. La tecnología de biorreactores y técnicas de micropropagación de alta frecuencia abren las puertas para lograr un mayor escalado en el proceso de micropropagación. El sistema de micropropagación mediante esta técnica permite la semi-automatización del proceso y evita el uso de agentes gelificantes que encarece el proceso convencional, reduce los costos ocasionados por la mano de obra y aumenta la eficiencia biológica del cultivo *in vitro* de *Stevia rebaudiana* (Avila, 2018).

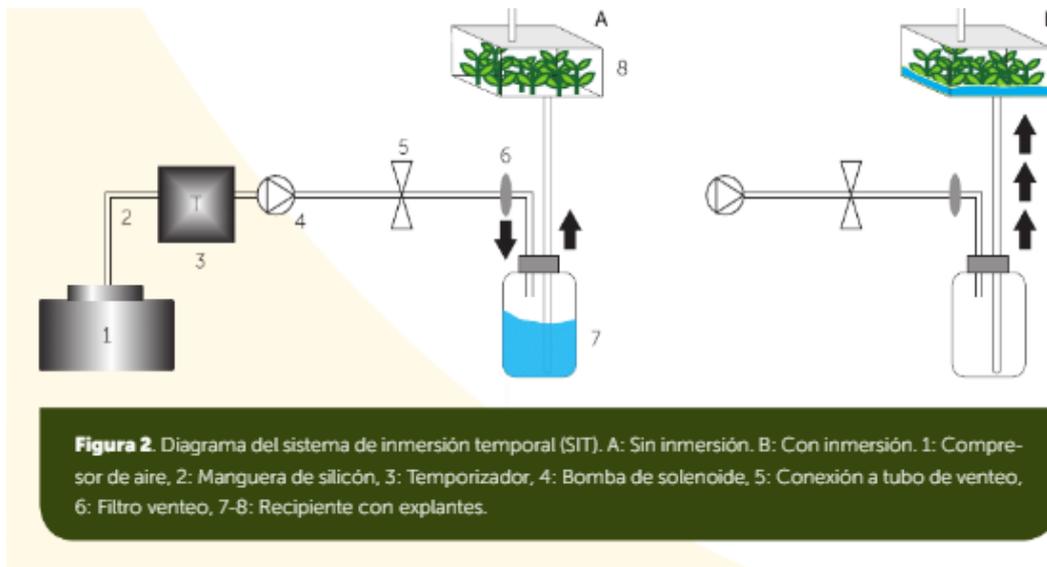


Figura 1: Sistema de inmersión por gravedad

- Explicación del proceso:

- A. Diseño de biorreactor de inmersión por gravedad; el frasco inferior contiene el medio líquido MS con fitohormonas ANA y BAP y el frasco superior, contiene los segmentos nodales de *Stevia rebaudiana*, donde aún no se realiza el proceso de inmersión de explantes.
- B. Funcionamiento del biorreactor; al darse el tiempo de inmersión, programado en el timer digital, la válvula solenoide se abre, dejando pasar el aire de la compresora, y entrando a los filtros Hidrofóbicos, que lo purifican, para así impulsar el medio líquido, del frasco inferior al superior, pasando el tiempo de inmersión, el medio líquido retorna al frasco inferior por gravedad, luego de haber nutrido los segmentos nodales. Este proceso se repetirá durante 30 días.

2.4.1. Comparación entre un biorreactor de inmersión por gravedad y un cultivo *in vitro* convencional:

La inquietud por encontrar nuevas tecnologías, o herramientas tecnológicas, que permitan superar las limitaciones que presenta la micropropagación convencional ha implicado el desarrollo de métodos alternativos, como es el sistema de inmersión por gravedad, que incorpora las ventajas del uso del medio líquido y diferentes grados de automatización al proceso de propagación *in vitro*, el cual tiene como objetivo de reducir los costos de producción de plantas.

El sistema de inmersión por gravedad surge a partir de la aplicación de un flujo de aire a un frasco el cual hacia subir el medio de cultivo que luego de bañar los explantes, descendía por gravedad (Zuñiga *et al.*, 2009).

Las mayores diferencias entre el cultivo *in vitro* convencional y el SIT en biorreactores se producen en la etapa de multiplicación:

- El medio nutritivo que utiliza el BIG es líquido en vez de sólido (agar), el contacto del medio con el tejido se realiza de manera intermitente (temporal) y no permanente, y se utiliza un mayor número de explantes en cada contenedor. Un recipiente que contiene las plántulas está conectado con otro que contiene la solución nutritiva; a su vez, el recipiente del medio líquido se conecta con una manguera de presión de aire. El traslado del medio líquido al otro recipiente se produce mediante el aumento de la presión de aire interna, así, el medio se moviliza hacia el contenedor superior y regresa a su mismo recipiente, por gravedad, luego de que se cumple el tiempo de inmersión (Zuñiga *et al.*, 2009).
- Este sistema presenta importantes diferencias respecto del método convencional:
 - Al trabajar en medios líquidos temporales se puede mantener una gran cantidad de plántulas en un mismo volumen.
 - El contacto intermitente del medio con los explantes reduce el nivel de toxinas presentes, ya que se mantienen limpias de sus propios exudados que pueden ser perjudiciales para su crecimiento.

- El mecanismo permite renovar y/o modificar la atmósfera interna de los contenedores y eventualmente, controlar ciertos aspectos de su desarrollo (preaclimatación). Este método muestra un impacto importante en los métodos tradicionales de micropropagación, ya que se ha logrado una mayor tasa de multiplicación y aclimatación, así como mayores niveles de supervivencia en condiciones de campo.
- Por otra parte, en un sistema de cultivo *in vitro* tradicional, las horas bajo cámara de flujo son limitantes en la producción y constituyen un aspecto crítico. Cuando se utiliza el sistema de inmersión temporal, las labores que se realizan bajo la cámara de flujo se llevan a cabo más rápida y ágilmente, por lo que se requieren menos horas bajo tal condición y, si se suma el aumento en la tasa de multiplicación, se pueden lograr entre tres y cinco producciones más en una temporada, respecto del sistema convencional, dependiendo de la especie y variedad a multiplicar (Zuñiga *et al.*, 2009).
- Esta herramienta no reemplaza a la micropropagación convencional, sino que debe ser entendida y aplicada como una técnica complementaria. Los costos de implementación del SIT en un laboratorio de propagación *in vitro* convencional equipado son relativamente bajos y la recuperación de la inversión es alta si se consideran las ventajas que presenta la producción de plantas bajo esta técnica (Zuñiga *et al.*, 2009).

2.4.2. Ventajas de un biorreactor de inmersión por gravedad:

El sistema de inmersión temporal por gravedad en biorreactores constituye una herramienta tecnológica interesante, principalmente para el sector dedicado a la multiplicación de plantas, ya que su implementación permitiría mejorar la eficiencia del proceso de propagación *in vitro* de distintas especies, con los siguientes méritos respecto de la técnica convencional (Zuñiga *et al.*, 2009):

- Aumento importante en las tasas de multiplicación.
- Mejoramiento en el porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia de las plantas en la etapa de aclimatación.
- Aumento en los niveles de mecanización de algunas etapas de la micropropagación.

- Reducción en el uso de la mano de obra.
- Reducción en los costos de reactivos e insumos por planta final.
- Menor costo por planta.

Las dificultades o facilidades que presenta una determinada especie o variedad frente al proceso *in vitro* convencional o al BIG debieran ser similares. No obstante, el menor costo/planta que resulta de la implementación de este sistema, podría permitir trabajar con especies de difícil propagación (por ejemplo, por la aclimatación) cuyos coeficientes de multiplicación no son rentables bajo el sistema convencional, pero sí podrían serlo con esta nueva técnica (Zuñiga *et al.*, 2009).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización del ensayo

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación y el Laboratorio de Biotecnología Agrícola, de la Universidad Nacional del Santa, en la ciudad de Chimbote, Ancash, Perú.

3.2. Selección de plantas madres:

Las plantas madres fueron provenientes del invernadero de la Universidad Nacional Agraria La Molina, con aspectos favorables para la propagación.

Estas plantas fueron las donantes de los segmentos nodales, las cuales fueron aclimatadas por dos semanas en el invernadero de la Facultad de Ciencias Agrarias en condiciones controladas hasta la micropropagación.

3.3. Esterilización de materiales:

Los materiales de vidrio que se utilizaron para la investigación como: matraces, fiolas, vasos precipitados, placas petri y entre otros, fueron esterilizados en la estufa a una temperatura de 160 °C por una hora.



Figura 2: Materiales esterilizados

3.4. Desinfección superficial y preparación del material vegetal

- Se deshojaron las ramas y se lavaron con agua destilada esterilizada por 10 min.
- Se desinfectaron las ramas con alcohol al 70% durante 30 segundos, manteniéndolas en un matraz con agitación constante. Luego se escurrió completamente.
- Se sumergieron las ramas desinfectadas durante 15 min. en una solución desinfectante de NaClO al 1.2% en un vaso de precipitación manteniendo en agitación constante.
- Por último, se realizaron tres enjuagues con agua destilada esterilizada.



Figura 3: Soluciones para desinfección



Figura 4: Ramas de *Stevia rebaudiana*

3.5. Preparación de los explantes *ex vitro*:

- A nivel de la cámara de flujo laminar, las ramas desinfectadas fueron divididas sobre placas petri con bisturí N° 15, en segmentos nodales, conteniendo por lo menos una yema axilar.
- Estos segmentos nodales midieron aproximadamente 1.5 a 2 cm de longitud y de 2 a 3 mm de grosor.

3.6. Preparación de 210 ml de medio MS sólido:

- En un matraz de 500 ml se añadió 210 ml de agua destilada, agitándolo con un agitador magnético y se agregó el medio basal, descrito por Murashige y Skoog (1962), añadiéndolo lentamente por las paredes de la probeta, ya que si se agrega rápido al medio puede precipitar.
- Se le adicionó luego 6.3 g de sacarosa, el cual se disolvió totalmente hasta quedar homogéneo.
- Se midió el pH del medio y se ajustó a 5.7 ± 0.1 con HCl o NaOH 0.5 o 1.0N.
- Se calentó en una cocina eléctrica a 100°C , para evitar los grumos, hasta que el medio se tornó transparente y antes de que el medio llegó al punto de ebullición, se retiró de la cocina eléctrica y se añadió 4.2 g de agar, homogeneizando.
- Se añadió 2 ml de medio MS aproximadamente a 105 viales, tapándolos con papel aluminio y se autoclavó a 1.5 atm o 15 PSI de presión (120°C) durante 30 minutos. Finalmente se retiró y se dejó enfriar a temperatura ambiente.



Figura 5: Pesado de sacarosa



Figura 6: Medio MS puro

3.7. Siembra y establecimiento aséptico de explantes:

- La siembra aséptica de explantes se efectuaron en el cuarto de siembra dentro de la cámara de flujo laminar.
- Se encendió la luz y el motor de la cámara de flujo laminar. Se limpió el área de adentro hacia fuera con un algodón humedecido en solución de etanol, con la siguiente secuencia: techo, pared frontal, pared lateral, mesa. Ya con los brazos dentro de la cámara, nos lavamos las manos con alcohol de 70%.
- Se utilizó ropa esterilizada (gorro, guantes, mascarilla y mandil) y con los instrumentos bien esterilizados utilizando pinzas, se procedió a la siembra aséptica de 1 segmento nodal por vial, en donde se tuvo aproximadamente 105 muestras.
- Al colocar los explantes, en los viales, estos se acercaron a los mecheros de alcohol para evitar contaminaciones.
- Cada segmento nodal se ubicó en los frascos en forma horizontal, colocándolos en un cuarto de crecimiento, en el cual permanecieron a una temperatura de 21 °C, con un fotoperiodo de 16 horas luz, utilizando tubos fluorescentes del tipo blanco frío.
- Luego de ello se esperó 4 semanas para el crecimiento de las plántulas.



Figura 7: Segmentos nodales sembrados in vitro en MS sólido

3.8. Diseño del biorreactor de inmersión por gravedad:

- El sistema constó de dos recipientes cilíndricos de vidrio de aproximadamente 1 litro de capacidad y ambos tenían una entrada ancha en donde se encajaron las tapas para mantenerlos sellados.
- Se realizaron orificios en cada frasco de aproximadamente 5 mm para la entrada de tubos del mismo diámetro. cada frasco tuvo dos tubos de los cuales en el primer frasco estuvieron en los laterales de la base y en el otro frasco el orificio estuvo en la tapa y en una parte lateral de la base.
- Se empleó una manguera de plástico para la unión de los tubos con los frascos.
- Uno de los frascos se suministró con aire controlado por un aparato llamado “timer” el cual se encargó de las frecuencias programadas, en este caso 3 min cada 12 horas.
- Para la entrada y salida del medio nutritivo de un recipiente a otro se utilizó una válvula solenoide, el cual fue controlado por el timer antes mencionado, para que el aire logre producir la presión. En ambos extremos, donde se encuentran las válvulas fueron colocados filtros de membrana hidrofóbicos para garantizar la asepsia y evitar contaminaciones del aire de ingreso.



Figura 8: Conducto de aire y filtros de membrana hidrofóbicos



Figura 9: Sistema de inmersión por gravedad

3.9. Preparación de 750 ml de medio MS líquido

- En un matraz de 1L se agregó 500 ml de agua destilada, se agitó con un agitador magnético y se agregó 30 gr de medio basal MS, se añadió lentamente por las paredes para evitar precipitaciones.
- A toda la mezcla se le añadió sacarosa de manera directa, realizándose así para los 7 tratamientos con diferentes concentraciones.
- El pH se ajustó a 5.7 ± 0.1 HCl o NaOH 0.5 o 1.0 N. el volumen se ajustó a 750 ml.
- Una vez mezclado homogéneamente el medio basal Murashige y Skoog con sacarosa, con la ayuda de una micropipeta se agregó las dosis correspondientes de ANA (Ácido naftalenacético) y BAP (Bencilaminopurina) en diferentes concentraciones y dejando un blanco de MS puro sin hormonas (tabla 1).
- Los medios fueron tapados con papel aluminio y autoclavados a 1.5 atm o 15 PSI de presión (120°C) durante 20 minutos. después de transcurrido el tiempo fueron trasladados a los frascos de los biorreactores.



Figura 10: Reactivos de ANA y BAP

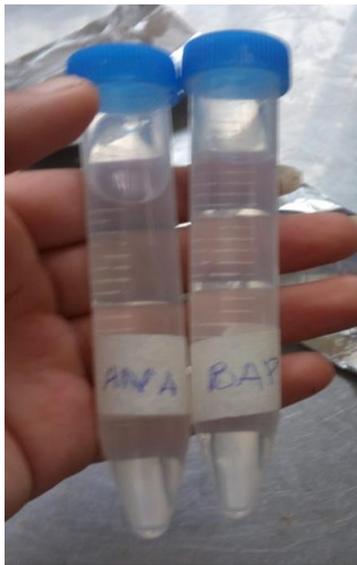


Figura 11: Fitohormonas preparadas



Figura 12: Fitohormonas en medio MS

3.10. Preparación de medio Ms sólido con tratamientos:

- Se realizó la preparación de 35 ml de medio MS sólido, para cada tratamiento empleado, añadiendo 20 ml de agua destilada en 7 matraces de 100 ml.
- Se añadió sacarosa 1.05 g para cada matraz, homogeneizándolo, hasta que se tornen transparentes, seguido de ello se le agregó 0.2155 g de medio basal MS.

- Se midió el pH de los medios y se ajustó a 5.7 ± 0.1 con HCl o NaOH 0.5 o 1.0N.
- Se calentó en una cocina eléctrica a 100°C , para que no se forme grumos, y antes que el medio llegue al punto de ebullición, se retiró de la cocina eléctrica y se añadió 0.7 g de agar, homogeneizando.
- Con una Micropipeta se agregó las dosis correspondientes de BAP y ANA en diferentes concentraciones para cada matraz de medio Ms (tabla 1).
- Seguido de ello, tapando los matraces con papel aluminio, se autoclavó a 1.5 atm o 15 PSI de presión (120°C) durante 30 minutos. Finalmente se retiró y se dejó enfriar a temperatura ambiente, para luego proceder a la siembra de explantes, para su comparación en crecimiento con los biorreactores de inmersión por gravedad.

3.11. Etapa de obtención de plántulas libres de contaminación y transferencia:

- A los 30 días después de la siembra en medio MS sólido, los explantes alcanzaron suficiente ramificación y se procedió al repicado en el medio basal MS líquido con tratamientos en los biorreactores (tabla 1) y del mismo modo en los viales del método convencional con MS sólido.
- Las plántulas desarrolladas en el medio sólido sin tratamientos fueron sacadas y colocadas en una placa petri, los cuales fueron divididos con los bisturís N° 11 y 12 nuevamente en segmentos nodales.
- La siembra aséptica de los explantes se efectuó en la cámara de flujo laminar.
- Se colocaron 15 explantes de segmentos nodales por frasco de tratamiento.
- Al colocar los explantes en los frascos, se cuidó que estos se mantuvieran cerca a los mecheros para evitar contaminaciones.
- Cada segmento nodal se ubicó en los frascos en forma horizontal, y se colocó en un cuarto de crecimiento en el cual permanecieron a una temperatura de 21°C con un fotoperiodo de 16 horas luz, utilizando tubos fluorescentes del tipo blanco frío.



Figura 13: Segmentos nodales en BIG



Figura 14: Segmentos nodales en cultivo convencional

3.12. Etapa de seguimiento:

- Cada semana se realizó la observación del crecimiento de los segmentos nodales expuestos a los tratamientos, en donde se observaron número de hojas, brotes y longitud de tallo.

3.13. Diseño experimental:

Se empleó un experimento factorial simétrico en un diseño completamente al azar (DCA). El diseño es netamente experimental de estímulo creciente con post-prueba; y está constituido para evaluar el efecto de la presencia de las fitohormonas ANA y BAP (como variable independiente), en el crecimiento de número de hojas, brotes y longitud de tallo a través de la multiplicación vegetativa de la planta *Stevia rebaudiana* (variable dependiente) mediante el uso de un biorreactor de inmersión por gravedad (Variable Interviniente), para ello se realizaron 6 tratamientos, de 0.1 y 1.0 mg/l en diversas combinaciones en un medio basal MS líquido y un tratamiento N° 7 como blanco que estuvo conformado por medio MS puro sin hormonas de crecimiento, adicionalmente se realizó también cultivos en medios sólidos con los mismos tratamientos del medio líquido de los biorreactores, para la comparación de crecimientos. Los números de explantes fueron 15 por tratamiento, conformando un total de 105 muestras. De lo contrario el número de repeticiones se seleccionará con base en la cantidad de material disponible y no con base al diseño experimental, sin embargo, el número de repeticiones seleccionado es válido para minimizar el efecto del error experimental.

Con los resultados obtenidos se empleó un análisis de varianza (ANOVA), con una probabilidad de error de 0.05 %; así mismo, se aplicó la prueba múltiple de rangos (TUKEY) para lograr determinar las diferencias significativas entre los tratamientos, utilizando el programa MINITAB versión 9.

Tabla 1: Tratamientos con diferentes concentraciones de ANA y BAP

Tratamientos	ANA mg/L	BAP mg/L
1	0.1	1
2	1	0.1
3	0.1	-
4	-	1
5	0.1	0.1
6	1	1
7	blanco	blanco

3.14. Variable Respuesta:

- **Número de Brotes y Número de hojas:** Se realizó el seguimiento de manera visual, en donde se efectuó el conteo cada brote y hoja por plántula desarrollada.
- **Longitud de Tallo (cm):** Se realizó la medición de la longitud de tallo a través de una regla de cm, para una mayor precisión de la elongación.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Evaluación del índice de sobrevivencia de explantes

Del pre-cultivo de los segmentos nodales de la planta madre *Stevia rebaudiana*, se obtuvieron plántulas crecidas y desarrolladas durante los 30 días de evaluación, con el objetivo de adquirir segmentos nodales limpios y libres de contaminación, para un correcto análisis de las variables dependientes (longitud de tallo, N° de brotes y N° de hojas), frente a la variación de las concentraciones de ANA y BAP, ya que, según Debergh y Zimmerman (1991) la contaminación microbiana viene siendo uno de los problemas más graves en la micropropagación de especies vegetales a nivel mundial, produciendo cuantiosas pérdidas de material, tanto en los trabajos de investigación como en la micropropagación comercial. Puede darse a través de microorganismos que colonizan la superficie o el interior del explante (endófitos) o microorganismos introducidos durante la manipulación en el laboratorio.

Los segmentos en crecimiento producto del pre-cultivo, fueron analizados según su índice de supervivencia; los análisis estadísticos medidos son expresados en valores nominales porcentuales según la tabla 2.

Los explantes que no presentaron oxidación y estuvieron libres de crecimiento fúngico o bacteriano, fueron inoculados asépticamente en los medios de cultivo, esto debido a que las oxidaciones presentes en los explantes, son un fenómeno de ennegrecimiento que ocurre por acción de enzimas tipo polifenoloxidasas y tirosinasas, que se liberan o sintetizan cuando los tejidos sufren heridas y actúan oxidándolos a quinonas que son fitotóxicas, sustancias que a su vez pueden afectar las proteínas y, en consecuencia, la inhibición del crecimiento y la viabilidad de los explantes (Read y Economou, 1987), por ello ya sea en los biorreactores de inmersión temporal o el método de micropropagación convencional en MS sólido, solo se trasladaron las plántulas sanas en totalidad para la determinación de las correctas combinaciones de las fitohormonas según los tratamientos especificados en la tabla 1.

Tabla 2: Datos de los explantes libres de contaminación en el pre-cultivo

Planta	Explantes introducidos	Vivos	oxidados	Contam.	% de oxidados	% contam.	% de vivos
<i>Stevia Rebaudiana</i>	105	77	12	16	7.5%	10%	82.5%

4.2. Análisis de tratamientos con ANA y BAP

La evaluación y análisis estadístico fue realizado utilizando la tabla N° 3 de datos expresados de la medición de longitud de tallo, en la cual nos muestra resultados numéricos representativos obtenidos durante la experimentación del crecimiento de *Stevia rebaudiana* en función de su longitud de tallo (cm), N° de brotes y N° de hojas. Los resultados fueron obtenidos bajo el método de biorreactor de inmersión por gravedad (BIG) y tratamientos de micropropagación convencional, empleado de forma adicional para una comparativa. Los datos estadísticos fueron analizados y discutidos en tres secciones, a fin de determinar la mejor combinación de concentraciones de ANA y BAP para cada tratamiento, al igual que el mejor método de operación para el crecimiento óptimo del explante.

4.3. Evaluación de longitud de tallo de explantes de *Stevia rebaudiana* en BIG (Biorreactor de inmersión por gravedad)

Las longitudes de tallos evaluados de las plántulas obtenidas de *Stevia rebaudiana*, fueron medidas luego de los 30 días de crecimiento, con el apoyo de una regla volumétrica para una mayor precisión en la obtención de los resultados.

Tabla 3: Datos de medición de longitud de tallo en biorreactor de inmersión por gravedad

TRATAMIENTOS	LONGITUD EN CADA NUMERO DE EXPLANTE (CM)															PROMEDIO
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
T1 (0.1/1)	4.2	4.4	4.1	4.2	4.3	4.5	3.8	3.7	4.2	4.3	3.9	4.3	4.5	4.7	4.2	4.220
T2 (1.0/0.1)	1.9	1.8	1.6	1.5	1.7	2.9	3.2	3.1	2.6	2.7	3.1	2.9	3.0	2.6	2.8	2.493
T3 (0.1/-)	1.4	1.7	2.3	1.4	2.2	2.4	1.3	1.9	2.3	1.6	1.4	2.1	2.5	2.2	1.6	1.887
T4 (-/1.0)	2.1	1.9	1.7	1.9	2.4	3.2	1.8	2.2	2.4	1.8	1.6	2.1	1.5	1.2	2.4	2.013
T5 (0.1/0.1)	2.5	2.4	2.1	3.1	1.9	2.4	3.3	2.2	2.3	2.9	2.5	2.2	2.6	2.1	3.4	2.527
T6 (1.0/1.0)	3.5	3.1	3.5	4.2	3.2	3.7	3.7	3.5	4.0	4.0	3.3	2.4	3.2	3.7	3.6	3.507
T7 (sin fitohormonas)	0.9	1.5	1.0	1.6	2.0	1.1	1.3	1.3	2.1	1.5	1.0	1.2	1.5	1.5	2.2	1.447

Los datos estadísticos presentados en esta sección, representan la incidencia significativa de los tratamientos, en función de la longitud en *cm* de *Stevia rebaudiana*. En la Tabla 4, se muestran los datos descriptivos para cada tratamiento según la media, así como los datos de longitud mínima y máxima del tallo medidas a los 30 días de crecimiento en BIG (Biorreactor de inmersión por gravedad). El tratamiento 1 (ANA 0.1 mg/L – BAP 1.0 mg/L), expuso un máximo de longitud de tallo de 4.7 cm, siendo también el tratamiento que presentó mayor crecimiento en media equivalente a 4.22 cm, tomando en consideración sus 15 repeticiones. No obstante, el ensayo de menor crecimiento fue el tratamiento 7, presentando una media ponderada de 1.44 cm de longitud del tallo y una elongación máxima de 2.2 cm. Los tratamientos con presencia de ANA y BAP bajo diferentes concentraciones (Tratamiento 1 hasta tratamiento 6), fueron claramente superiores en longitud del tallo, respecto al tratamiento 7, el cual no tuvo adición de ANA y BAP. De esta manera, se puede deducir experimentalmente que la adición de ANA y BAP, presentó una influencia positiva en el crecimiento de *Stevia rebaudiana*, Según Agrobiotecnología (2011), la importancia de los resultados de longitud de tallo radica en que a mayor longitud de los explantes existe más vigorosidad, por lo que favorece para la continuación de las siguientes etapas de la micropropagación *in vitro*, asegurando que un explante que posee mayor longitud va a proliferar y a sobrevivir a diferencia de uno que muestre poco desarrollo del tallo.

Tabla 4: Datos estadísticos descriptivos de la longitud del tallo (cm) de *Stevia rebaudiana* para cada tratamiento utilizando un biorreactor de inmersión por gravedad (BIG).

Variable	Tratamientos	Media	Desv.Est.	Mínimo	Máximo
Longitud del Tallo	T1	4,2200	0,2678	3,7000	4,7000
	T2	2,493	0,611	1,500	3,200
	T3	1,887	0,421	1,300	2,500
	T4	2,013	0,479	1,200	3,200
	T5	2,527	0,454	1,900	3,400
	T6	3,507	0,440	2,400	4,200
	T7	1,447	0,402	0,900	2,200

De igual modo, los datos mostrados en la Tabla 5, representan los datos obtenidos de la longitud de tallo de las plántulas crecidas en medio MS sólido, las cuales estuvieron contenidas, un segmento nodal por vial, por ello es que a través de este método se llegaron a obtener algunas plántulas contaminadas, los cuales fueron descartadas y no consideradas para la medición de longitud de tallo.

Tabla 5: Datos de medición de longitud de tallo del método convencional en MS sólido

TRATAMIENTOS	LONGITUD EN CADA NUMERO DE EXPLANTE (CM)															PROMEDIO
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
ANA / BAP																
T1 (0.1/1)	2.8	4.1	3.3	2.6	2.7	2.5	-	2.6	-	1.5	2.3	1.0	2.9	-	2.8	2.592
T2 (1.0/0.1)	2.1	2.0	2.3	2.0	1.9	2.0	2.0	2.0	1.5	2.0	2.3	2.1	2.5	2.0	2.5	2.080
T3 (0.1/-)	1.0	1.5	1.5	-	1.5	2.5	1.9	-	1.5	1.2	2.2	1.5	1.4	1.0	-	1.558
T4 (-/1.0)	0.8	2.4	1.9	1.6	1.5	2.2	1.4	1.3	1.9	1.8	1.4	1.5	0.9	-	2.2	1.629
T5 (0.1/0.1)	3.3	2.1	1.5	0.9	1.2	2.3	-	-	0.8	1.8	2.4	2.1	0.6	2.6	2.4	1.846
T6 (1.0/1.0)	-	3.0	3.2	3.3	-	1.3	1.5	-	1.4	-	2.1	3.1	3.1	2.7	2.1	2.436
T7 (sin fitohormonas)	0.8	1.2	2	-	1.1	-	0.9	1	-	0.8	0.9	0.8	1.1	-	1	1.055

En la tabla 7 se representan los datos estadísticos descriptivos de la longitud de *Stevia rebaudiana*, de manera similar que los datos expresados en la Tabla 4, el tratamiento 1 en medio convencional, con ANA 0.1 mg/L y BAP 1.0 mg/L, presentó un mayor promedio con 2.59 cm y 4.1 cm como máxima elongación, siendo inferior en comparación al BIG. Por otro lado; similar al primer caso, el tratamiento 7, sin presencia de concentraciones de hormonas, fue el que menor crecimiento de plántulas obtuvo, con una media equivalente a 1.05 cm y una elongación de 2.0 cm, teniendo en consideración que la mínima elongación en el tratamiento 1 (ANA 0.1 mg/L y BAP 1.0 mg/L) es de 1 cm, mientras que en el BIG es de 3.7 cm siendo considerablemente notorio la diferencia en cuando a longitudes, esto puede deberse a que la auxina ANA sirve para la actividad de crecimiento (por división o alargamiento celular) y en particular en hojas jóvenes y en semillas en desarrollo, la aplicación de auxinas a una planta, induce a que se sintetizen auxinas naturales en el tejido aplicado, teniendo en consideración que una aplicación de auxina a alta dosis puede estimular la síntesis de etileno y causar efectos negativos de crecimiento hasta la muerte de tejido (Nomberto, 2001), por ello en esta investigación se consideraron concentraciones bajas de la auxina ANA.

Tabla 6: Datos estadísticos descriptivos de la longitud del tallo (cm) de *Stevia rebaudiana* para cada tratamiento utilizando el método convencional

Variable	Tratamientos	Media	Desv.Est.	Mínimo	Máximo
Longitud del Tallo	T1	2,592	0,786	1,000	4,100
	T2	2,0800	0,2484	1,5000	2,5000
	T3	1,558	0,448	1,000	2,500
	T4	1,629	0,471	0,800	2,400
	T5	1,846	0,802	0,600	3,300
	T6	2,436	0,779	1,300	3,300
	T7	1,055	0,342	0,800	2,000

Para comprobar los descrito anteriormente, se hizo uso del análisis de varianza ANOVA, para determinar la significancia estadística de los siete tratamientos, así como del método utilizado para el crecimiento de *Stevia rebaudiana* (BIG y método convencional).

En la tabla 7, se muestran los análisis de varianza (ANOVA) de dos factores en función de cada tratamiento con ANA y BAP, el modo de operación y una interacción de ambos, a un nivel de significancia del 5%, $\alpha = 0.05$.

El valor p generado resultó estar presente dentro del umbral de significancia estadística, (Valor p = 0.000 < 0.05). Esto puede significar que las medias de los tratamientos a diferentes concentraciones de ANA y BAP, el modo de operación y la interacción de ambos factores (tratamientos y métodos), han generado diferencias estadísticas significativas en el crecimiento de *Stevia rebaudiana*, dicho, en otros términos, cada tratamiento, así como el uso de un BIG o método convencional, presentará resultados distintos en función de la longitud de tallo.

Tabla 7: ANOVA factorial de los datos del crecimiento de *Stevia Rebaudiana* en función de la longitud del tallo (cm) utilizando diversos métodos de operación (BIG y convencional)

Fuente	GL	SC	MC	Valor	Valor p
		Ajust.	Ajust.	F	
Tratamientos	6	84,13	14,0218	27,91	0,000
Método	1	52,70	52,7002	104,88	0,000
Tratamientos*Método	6	20,07	3,3447	6,66	0,000
Error	196	98,49	0,5025		
Total	209	255,38			

De acuerdo con los datos del ANOVA, es importante considerar la significancia estadística entre los tratamientos en dependencia del método utilizado. De la misma manera, es también relevante realizar comparaciones múltiples entre las medias de los tratamientos evaluados, para entender con exactitud la variabilidad por grupos y sus tasas de error. Para este fin, se realizó un análisis de comparación múltiple empleando el método Post Hoc – Tukey, para crear intervalos de confianza en parejas para todas las diferencias entre las medias de los grupos en estudio.

En la tabla 8, se muestra la prueba de Tukey en respuesta a la longitud del tallo por cada tratamiento a los 30 días de crecimiento en BIG. Los valores en rojo indican un valor estadístico diferente a la media en estudio, los valores en negro representan valores similares. Las medias de los valores de longitud del tallo, que expresan mayor nivel de

confianza ($\mu_{\text{tratamiento}} \approx 1$), representan mayor igualdad estadística (Ejm. $\mu_{\text{Tratamiento 2}} = 2.493 \approx \mu_{\text{Tratamiento 5}} = 2.527$). Así mismo, en la tabla 9, se muestran los valores agrupados utilizando el método de Tukey, las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes, estos datos son una representación simplificada de la Tabla 8. En otras investigaciones se trabajó con ácido gibérelico, para la elongación del tallo, sin encontrar diferencias significativas entre sus tratamientos y los parámetros analizados, concluyendo que esta hormona no ejerce ningún efecto, pudiéndose micropropagar *S. rebaudiana* por segmentos nodales sin la presencia de este fitrorregulador (Lopez *et al.*, 2017), sin embargo, con el uso de la fitohormona ANA, si se logró obtener diferencias netamente significativas entre los tratamientos empleados, predominando el tratamiento 1 con 0.1 mg/l de esta auxina.

Tabla 8: Análisis Post-Hoc - Tukey para las medias de longitud de tallo por tratamiento en BIG (biorreactor de inmersión por gravedad)

Tratamientos	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
T1		0.00012	0.00012	0.00012	0.00012	0.00077	0.00012
T2	0.00012		0.00648	0.06260	0.99999	0.00012	0.00012
T3	0.00012	0.00648		0.98715	0.00333	0.00012	0.11399
T4	0.00012	0.06260	0.98715		0.03624	0.00012	0.01400
T5	0.00012	0.99999	0.00333	0.03624		0.00012	0.00012
T6	0.00077	0.00012	0.00012	0.00012	0.00012		0.00012
T7	0.00012	0.00012	0.11399	0.01400	0.00012	0.00012	

Tabla 9: Agrupación de datos utilizando el método de Tukey a un nivel de confianza de 95% para longitud de tallo en BIG

Tratamientos	N	Media	Agrupación
T1	15	4.2200	A
T6	15	3.507	B
T5	15	2.527	C
T2	15	2.493	C D
T4	15	2.013	D E
T3	15	1.887	E F
T7	15	1.447	F

En la tabla 10, se muestra la prueba de Tukey en respuesta a la longitud del tallo en crecimiento por método convencional de *Stevia rebaudiana*. Al igual que en el caso anterior, se muestra un análisis comparativo de medias, presentando en este caso, una mayor igualdad entre los tratamientos evaluados. Se puede argumentar de esta manera, que el uso de un biorreactor de inmersión temporal en función de la concentración de hormonas en los tratamientos, presentó mejores cualidades para el crecimiento del explante, que utilizando el método convencional. Según George (1993), menciona que concentraciones muy altas de citoquininas pueden causar una cantidad de brotes pequeños, que usualmente no se alargan y que en algunas especies presentan una forma inusual llegando a ser hiperhídricos.

La tabla 11, muestra los datos agrupados utilizando el método de Tukey a una confianza de 95%, los valores son una representación simplificada de la Tabla 10.

Tabla 10: Análisis Post-Hoc - Tukey para las medias de longitud del tallo por tratamiento convencional

Tratamientos	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
T1		0,2766	0,0009	0,0015	0,0324	0,9954	0,0001
T2	0,2766		0,2552	0,3759	0,9391	0,7229	0,0007
T3	0,0009	0,2552		0,9999	0,8806	0,0097	0,3839
T4	0,0015	0,3759	0,9999		0,9599	0,0161	0,1973
T5	0,0324	0,9391	0,8806	0,9599		0,1867	0,0231
T6	0,9954	0,7229	0,0097	0,0161	0,1867		0,0001
T7	0,0001	0,0007	0,3839	0,1973	0,0231	0,0001	

Tabla 11: Agrupación de los datos utilizando el método Tukey a un nivel de confianza de 95% para longitud del tallo por método convencional

Tratamientos	N	Media	Agrupación			
T1	12	2,592	A			
T6	11	2,436	A	B		
T2	15	2,080	A	B	C	
T5	13	1,846		B	C	
T4	14	1,629			C	D
T3	12	1,558			C	D
T7	11	1,055				D

En la figura 15,

se observa la interacción de las medias entre los dos tipos de métodos aplicados (BIG y convencional) en los 7 tratamientos empleados, donde la media del tratamiento T1 (ANA 0.1 mg/l y BAP 1.0 mg/l) 4.22 cm empleando el BIG es superior a la media del método convencional (2.59 cm) con la misma concentración de fitohormonas en el T1, presentando una mejor elongación del tallo, y confirmando que el empleo de fitohormonas en ambos métodos es realmente necesario, debido a la influencia en el crecimiento, sin embargo en el empleo del método convencional se evidenció que no todas las plántulas presentaron crecimiento debido a que existieron contaminaciones, y por ende una disminución en la supervivencia.

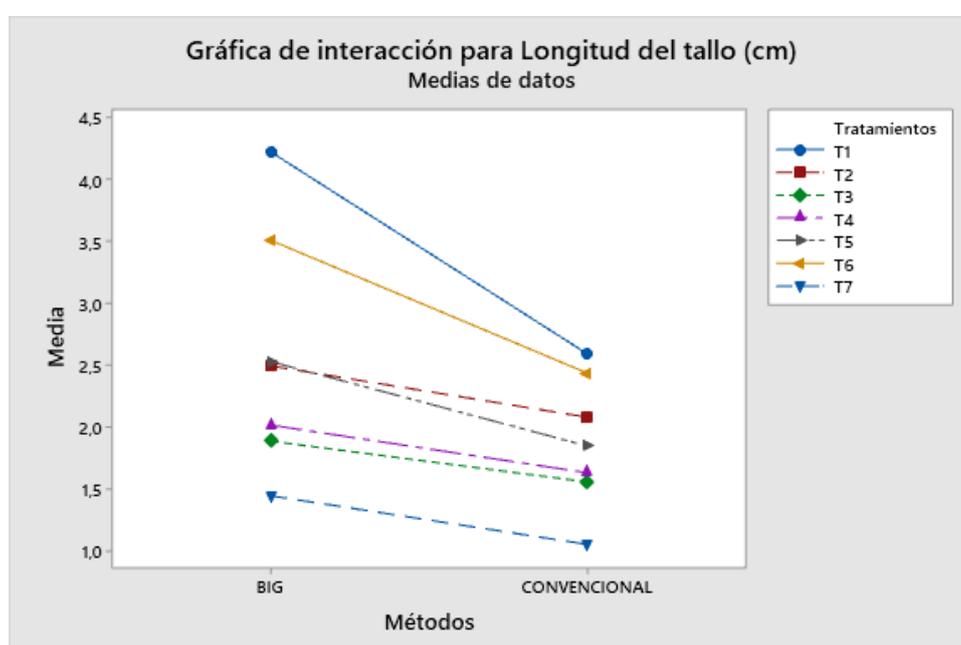


Figura 15: Gráfica de interacción para longitud del tallo (cm) en respuesta al método utilizado

En la figura 16, se logra identificar las diferencias en cuando las medias de los tratamientos empleados en ambos métodos, donde el método convencional se muestra en la gráfica de manera inferior al crecimiento de tallo del método BIG, los siete tratamientos empleados son representados de acuerdo a las medias obtenidas de cada uno, mostrando que luego del tratamiento T7 (sin fitohormonas) el tratamiento T3 (0.1 mg/ l ANA y 0 mg/l BAP) es el que presenta menor elongación de tallo con una media de 1.88 cm en método BIG y 1.24 cm en método convencional.

Según Minaya (2015), en una investigación realizada de micropropagación de *Stevia rebaudiana* se trabajaron con concentraciones altas de BAP, en donde el promedio más bajo lo obtuvo el T3 (8 mg/L BAP) con un promedio de 1.05 cm y el tratamiento TO (testigo) obtuvo mayor promedio de altura de vitroplanta con un promedio de 3.42 cm pero con menor número de brotes, indicando que los resultados del presente estudio muestran un decaimiento en cuanto a la altura de la vitroplanta a medida que se incrementa la concentración de BAP, esto es debido a una acción indirecta por parte de la citoquinina, ya que esta inhibe la dominancia apical, crecimiento y diferenciación de las células, y en el caso de tallos retarda el alargamiento, y siendo un retardador del crecimiento vegetal como el etileno debido a que este produce cambios en el crecimiento de la planta al reducir la tasa de elongación (Lluna, 2006).

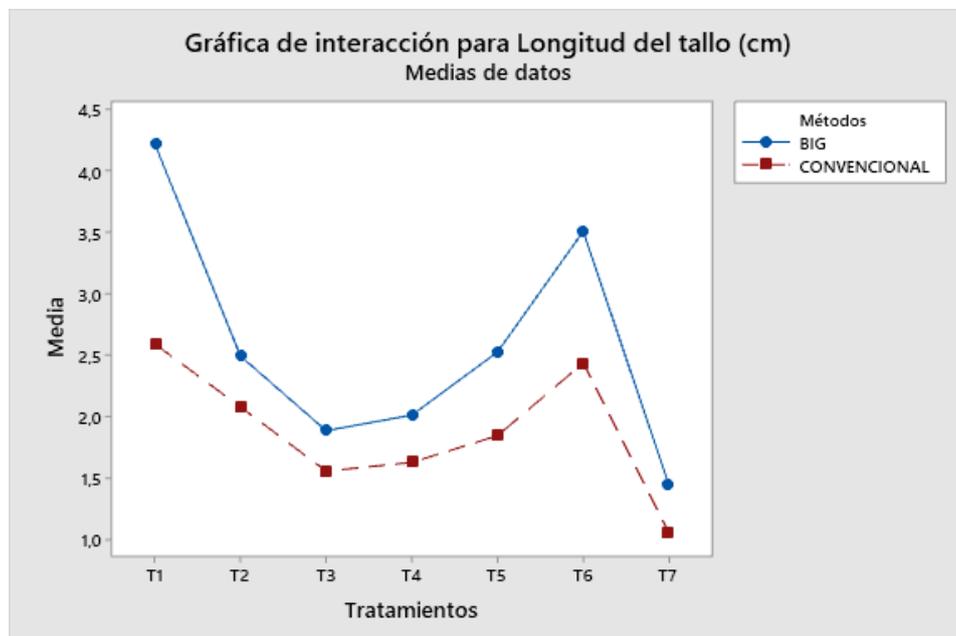


Figura 16: Gráfica de interacción para longitud de tallo (cm) por tratamiento utilizado

Mediante los datos obtenidos pudimos realizar una gráfica de efectos principales, con la finalidad de mostrar las medias de los tratamientos en comparación con las variables aplicadas, para obtener una respuesta representativa de ello. En la primera curva se observan los tratamientos y la mejor obtención de crecimientos, luego de su aplicación, mientras que en la segunda curva se puede apreciar la superioridad del método BIG en comparación con lo convencional, esto puede deberse a que el contacto directo y renovado de los segmentos nodales con el medio de cultivo durante cada inmersión

provoca una asimilación más eficiente de elementos nutritivos. Con este tipo de sistema de cultivo se logra que los segmentos nodales se mantengan cubiertos por una fina película de medio de cultivo, lo cual impide la desecación y además posibilita una baja resistencia a la difusión de gases, con el tiempo y la frecuencia de inmersión empleados, se puede renovar completamente, favoreciendo un balance armónico de gases como oxígeno y dióxido de carbono, y limitando la acumulación de gases nocivos como el etileno en el interior del recipiente de cultivo, estos aspectos favorecen el crecimiento de los brotes en otras especies de plantas (Berthouly & Etienne, 2005).

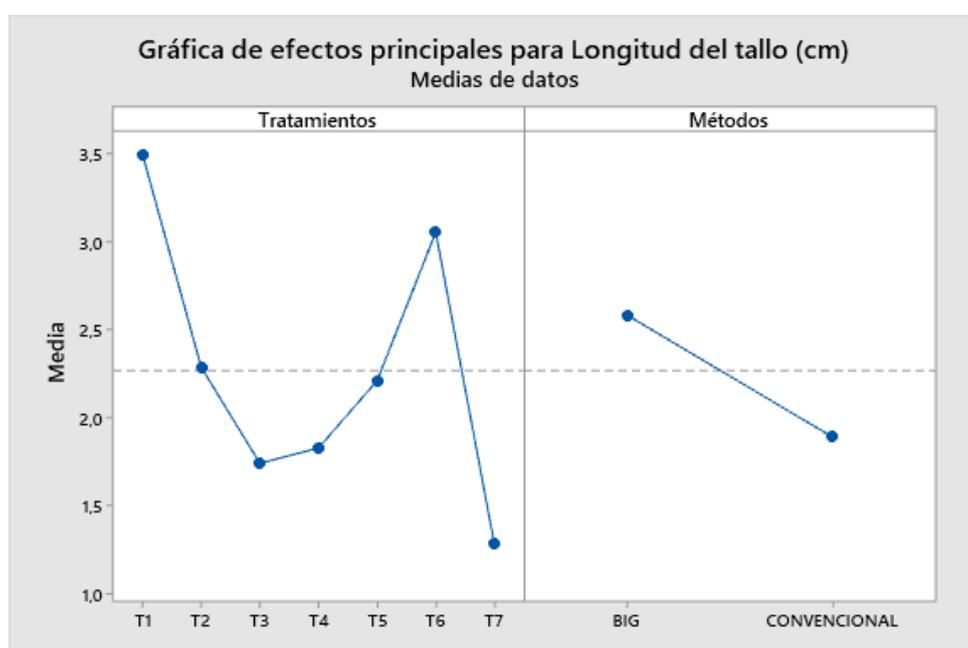


Figura 17: Gráfica de efectos principales para longitud del tallo

4.4. Evaluación de número de brotes de explantes de *Stevia rebaudiana* en BIG (biorreactor de inmersión por gravedad)

Los resultados obtenidos con respecto a la variable en estudio, de números de brotes se representaron en la tabla 12, esta toma de datos final, se realizó mediante la visualización de los brotes presentes en las plántulas luego de 30 días de cultivo en el sistema de biorreactor de inmersión por gravedad (BIG).

Tabla 12: Datos de números de brotes obtenidos mediante el uso del biorreactor de inmersión por gravedad

TRATAMIENTOS	BROTOS EN CADA NUMERO DE EXPLANTE (CM)															PROMEDIO
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
T1 (0.1/1)	6	4	5	6	6	7	4	5	5	4	5	5	4	7	6	5.267
T2 (1.0/0.1)	4	5	3	4	5	4	4	4	3	4	3	4	4	4	4	3.933
T3 (0.1/-)	2	5	2	3	3	3	2	2	3	2	3	1	1	2	1	2.333
T4 (-/1.0)	3	4	2	3	2	3	2	4	2	3	1	3	1	2	4	2.600
T5 (0.1/0.1)	2	3	3	3	4	2	4	3	4	4	2	3	4	4	3	3.200
T6 (1.0/1.0)	5	4	5	6	4	4	4	4	3	4	4	5	5	3	4	4.267
T7 (sin fitohormonas)	1	1	1	2	2	2	1	2	3	1	2	1	3	2	3	1.800

Se empleó el cálculo de desviación estándar para poder determinar la dispersión de los datos en cuanto a un número máximo o mínimo de brotes, en función al promedio de cada tratamiento empleado, obteniendo así el promedio más alto de 5.26 en el tratamiento 1 (ANA 0.1 mg/l y BAP 1.0 mg/l), con 7 números de brotes y un promedio mínimo de 2.33 en el tratamiento 3, con 4 brotes, sin tener en consideración el tratamiento 7 (blanco) con 3 brotes, en donde no hubo aplicación de fitohormonas, por ende resultado ser el de menor número de brotes obtenidos entre los tratamientos.

Por su parte, Ziv (1995), informaron que el uso de 0.5 mg l⁻¹ de BAP induce un alto número de brotes luego de tres semanas de cultivo, sin embargo, también se observaron la presencia de estructuras callosas en la parte inferior de las plántulas formadas, lo que pudiera potencialmente influenciar la estabilidad genética en el proceso y su adaptación

ex vitro. Es por esta razón que en este trabajo se utilizó concentraciones bajas de BAP (de 0.1 mg/l a 1 mg/l) de esta forma no se obtuvieron estructuras callosas en las bases.

Tabla 13: Datos estadísticos descriptivos para el número de brotes de *Stevia rebaudiana* utilizando un biorreactor de inmersión por gravedad (BIG)

Variable	Tratamientos	Media	Desv.Est.	Mínimo	Máximo
Número de brotes	T1	5,267	1,033	4,000	7,000
	T2	3,933	0,594	3,000	5,000
	T3	2,333	1,047	1,000	4,000
	T4	2,600	0,986	1,000	5,000
	T5	3,200	0,775	2,000	4,000
	T6	4,267	0,799	3,000	6,000
	T7	1,800	0,775	1,000	3,000

Para realizar una comparativa adecuada, también se empleó la estadística descriptiva según los datos representados en la tabla 14, para los brotes obtenidos bajo el método de micropropagación convencional, en MS sólido, cada plántula con viabilidad y desarrollo fue colocado sobre una placa petri, para realizar el análisis y conteo de los brotes observados, descartando los viales contaminados en algunos tratamientos dados, los cuales no fueron considerados para la evaluación estadística.

Tabla 14: Datos de números de brotes obtenidos mediante el método de micropropagación convencional

TRATAMIENTOS	BROTOS EN CADA NUMERO DE EXPLANTE (CM)															PROMEDIO
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
ANA / BAP																
T1 (0.1/1)	3	4	5	4	2	1	-	2	-	2	2	2	3	-	2	2.667
T2 (1.0/0.1)	3	3	2	2	3	3	3	3	2	2	3	3	2	1	2	2.467
T3 (0.1/-)	3	2	3	-	2	2	1	-	2	2	1	2	2	1	-	1.917
T4 (-/1.0)	1	1	1	2	1	3	1	2	2	2	4	3	1	-	2	1.857
T5 (0.1/0.1)	4	2	2	1	3	2	-	-	2	2	2	2	1	3	3	2.231
T6 (1.0/1.0)	-	2	4	2	-	3	2	-	3	-	3	2	1	1	3	2.364
T7 (sin fitohormonas)	2	1	1	-	2	-	1	1	-	1	2	1	1	-	2	1.364

Según la tabla 15, en los datos estadísticos del método convencional, se logró observar que el número de brotes de las plántulas en el medio sólido fueron menores en comparación al del método BIG, en donde se obtuvo un máximo de 5 brotes con una media de 2.66 en el tratamiento 1 (ANA 0.1 mg/l y BAP 1.0 mg/l), así mismo; el mínimo brote por plántula fue de 1 un., mientras que en el método BIG fue de 4 brotes. En el tratamiento 3 se presentó un máximo de 3 brotes con una media de 1.91; cabe resaltar, que el número de brote va en función de la elongación del tallo, es decir que mientras mayor sea la longitud del tallo, mayor será la posibilidad de obtener más brotes por plántula.

En muchos experimentos provenientes de fuentes de plantas, compuestos químicos de un medio y las condiciones ambientales, se realizaron comparaciones con un medio semi-sólido y un medio líquido de inmersión temporal, lo que mostro que el segundo fue el mejor para su utilización. (Teisson *et al.*, 1996)

Tabla 15: Datos estadísticos descriptivos para el número de brotes de *Stevia rebaudiana* mediante el método de micropropagación convencional

Variable	Tratamientos	Media	Desv.Est.	Mínimo	Máximo
Número de brotes	T1	2,667	1,155	1,000	5,000
	T2	2,467	0,640	1,000	3,000
	T3	1,917	0,669	1,000	3,000
	T4	1,857	0,949	1,000	4,000
	T5	2,231	0,832	1,000	4,000
	T6	2,364	0,924	1,000	4,000
	T7	1,364	0,505	1,000	2,000

Los datos obtenidos de número de brotes tanto para el método BIG como para el método convencional fueron utilizados para la realización de un análisis de varianza ANOVA para dos factores en función de cada tratamiento con ANA y BAP, el modo de operación y una interacción de ambos, a un nivel de significancia del 5%, $\alpha = 0.05$.

El valor P, se mostró menor al nivel de significancia ($p= 0.000 < \alpha = 0.05$), lo cual manifiesta que existe diferencia significativa entre los tratamientos empleados y los métodos de operación para los números de brotes, los cuales fueron evaluados y contabilizados por cada plántula desarrollada bajo ambos métodos.

Estos resultados se pudieron haber debido a que Las citocinina 6- Bencilaminopurina (6-BAP), es un agente inductor y regulador del crecimiento, la concentración más utilizada es de 0.1 a 2.0 mg/l. En forma natural se encuentra en los tejidos vegetales jóvenes, promueve la morfogénesis en explantes y específicamente en yemas axilares promueve la proliferación de brotes (CIREN, 1988).

Tabla 16: ANOVA factorial de los datos del crecimiento de *Stevia rebaudiana* en función del número de brotes utilizando diversos métodos de operación (BIG y convencional)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamientos	6	106,60	17,7667	24,28	0,000
Métodos	1	70,71	70,7098	96,65	0,000
Tratamientos*Métodos	6	26,40	4,3998	6,01	0,000
Error	179	130,96	0,7316		
Total	192	347,71			

Luego de haber aplicado un análisis de varianza para ver la significancia estadística entre las variables y los métodos empleados, se realizaron comparaciones múltiples entre las medias obtenidas en cada tratamiento, las cuales fueron comparadas entre sí, empleando el método Pos Hoc- Tukey, con el cual se evaluó la variabilidad entre los grupos, para crear los niveles de confianza para todas las diferencias entre las medias de las variables en estudio. Las medias de los tratamientos que expresan mayor nivel de confianza ($\mu_{\text{tratamiento}} \approx 1$), representan mayor igualdad estadística (Ejm. $\mu_{\text{Tratamiento 2}} = 2.467 \approx \mu_{\text{Tratamiento 5}} = 2.231$). Los datos expresados en rojo, son los que presentan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, mientras que los datos en negro presentan similitud entre ellos. Según Mesa, *et al.*, (2002), manifiesta que las citoquininas son fundamentalmente reguladores de crecimientos para la formación de brotes. Entre ellas la 6- bencilaminopurina (6-BAP) es, en general, la citoquinina más efectiva y la más empleada en la inducción de yemas axilares.

Tabla 17: Análisis Post-Hoc - Tukey para las medias de número de brotes mediante el uso de un biorreactor de inmersión por gravedad

Tratamientos	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
T1		0.0013	0.0001	0.0001	0.0001	0.0351	0.0001
T2	0.0013		0.0002	0.0013	0.2533	0.9416	0.0001
T3	0.0001	0.0002		0.9804	0.1038	0.0001	0.6343
T4	0.0001	0.0013	0.9804		0.4957	0.0001	0.1665
T5	0.0001	0.2533	0.1038	0.4957		0.0192	0.0007
T6	0.0351	0.9416	0.0001	0.0001	0.0192		0.0001
T7	0.0001	0.0001	0.6343	0.1665	0.0007	0.0001	

En la Tabla 18, los valores agrupados mediante el método tukey, determinan el nivel de significancia que existe entre los diferentes tratamientos, asociándolos mediante una letra, en donde los valores que comparten una letra son significativamente iguales, al realizar una comparación entre medias, tal es el caso con el tratamiento 2 y tratamiento 5, y entre otros valores observados.

Tabla 18: Agrupación de los datos utilizando el método Tukey a un nivel de confianza de 95% mediante un biorreactor de inmersión por gravedad (BIG)

Tratamientos	N	Media	Agrupación
T1	15	5.267	A
T6	15	4.267	B
T2	15	3.933	B C
T5	15	3.200	C D
T4	15	2.600	D E
T3	15	2.333	D E
T7	15	1.800	E

Al aplicar el análisis Tukey para los resultados de número de brotes en el método convencional, es que pudimos apreciar que, al asociarse los tratamientos entre sí, no existió tanta diferencia significativa entre la comparación de las medias de los tratamientos aplicados, observando que existen diferencias entre los tratamientos 1, 2 y 7, esto debido a la falta de adición de fitohormonas de crecimiento en el T7, además de

que la adición de BAP puede aumentar la formación de brotes *in vitro* si se aplica a cultivos de tejido vegetal en la etapa de multiplicación (Lluna, 2006).

Tabla 19: Análisis Post-Hoc - Tukey para las medias de número de brotes mediante el método convencional

Tratamientos	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
T1		0,9961	0,3066	0,1861	0,8480	0,9761	0,0062
T2	0,9961		0,6172	0,4446	0,9892	0,9999	0,0215
T3	0,3066	0,6172		1,0000	0,9648	0,8578	0,6907
T4	0,1861	0,4446	1,0000		0,9061	0,7404	0,7630
T5	0,8480	0,9892	0,9648	0,9061		0,9997	0,1605
T6	0,9761	0,9999	0,8578	0,7404	0,9997		0,0860
T7	0,0062	0,0215	0,6907	0,7630	0,1605	0,0860	

En representación de la tabla 19, se realizó una agrupación de las medias con la finalidad de tener una mejor visualización de las diferencias significativas en los números de brotes, en donde se logra ver que efectivamente existe similitud desde el tratamiento 3 hasta el tratamiento 6, manifestándonos que no existen niveles de diferencias altas entre las diversas concentraciones de ANA y BAP, en cuanto al método convencional.

Según McAlister y col. (2005), el contacto intermitente de los explantes con el medio de cultivo tiene gran importancia, para la asimilación de los nutrientes por los explantes, es por ello que un medio semisólido puede llegar a limitar una buena absorción de las fitohormonas.

Tabla 20: Agrupación de los datos utilizando el método Tukey a un nivel de confianza de 95% mediante el método convencional

Tratamientos	N	Media	Agrupación	
T1	12	2,66667	A	
T2	15	2,46667	A	
T6	11	2,36364	A	B
T5	13	2,23077	A	B
T3	12	1,91667	A	B
T4	14	1,85714	A	B
T7	11	1,36364		B

En la imagen 18, se representan los diversos métodos aplicados en la investigación, es decir el método del uso de un biorreactor de inmersión por gravedad (BIG) y el método de la micropropagación convencional usando MS semisólido, evaluados a los 30 días luego de su cultivo in vitro, obteniendo una multiplicación vegetativa superior en el uso del BIG para una mejor proliferación, resaltando que el tratamiento 1 presento una media de 5.267 a comparación del medio MS solido con 2.666 como promedio, así mismo; en la imagen 19 se observa la representación de la comparativa de los 7 tratamientos empleados en diversas combinaciones, confirmando que el medio líquido empleado en un BIG, es mejor que el medio MS semisólido. Por otro lado, podemos decir que La presencia de brotes en el tratamiento 1, está relacionado con la citocinina 6-BAP y la auxina ANA, se observó que la combinación de estos fitorreguladores induce la formación de brotes en los explantes de “stevia”, de acuerdo a Ramesh et al., (2016) si los niveles de 6- BAP son bajos, habrá mayor formación de brotes puesto que la alta dosis de 6-BAP resulta en una menor cantidad de los mismos.

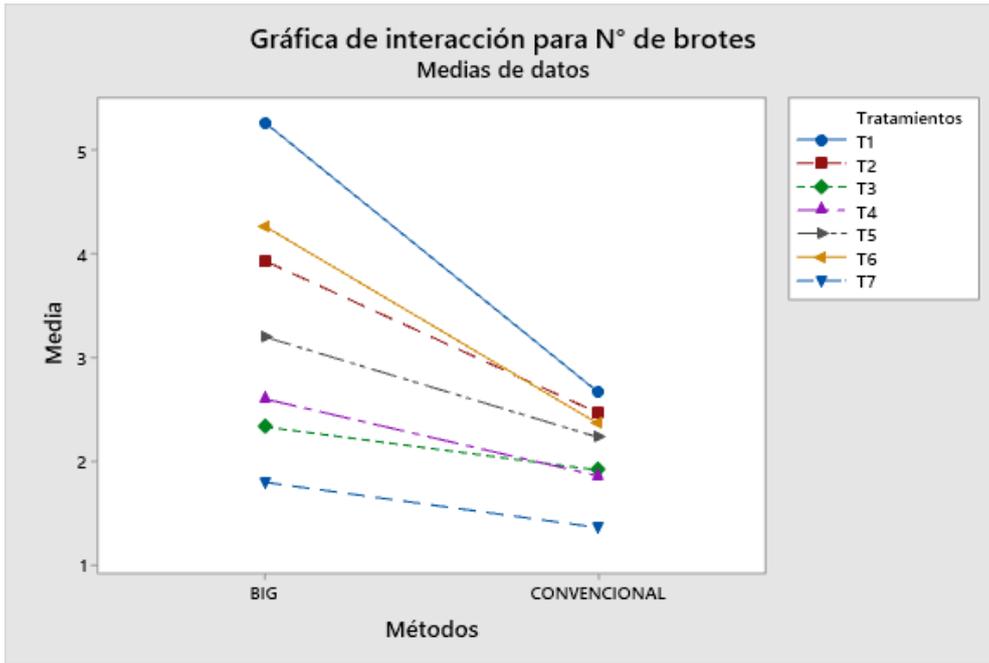


Figura 18: Gráfica de interacción para número de brotes en respuesta al método utilizado

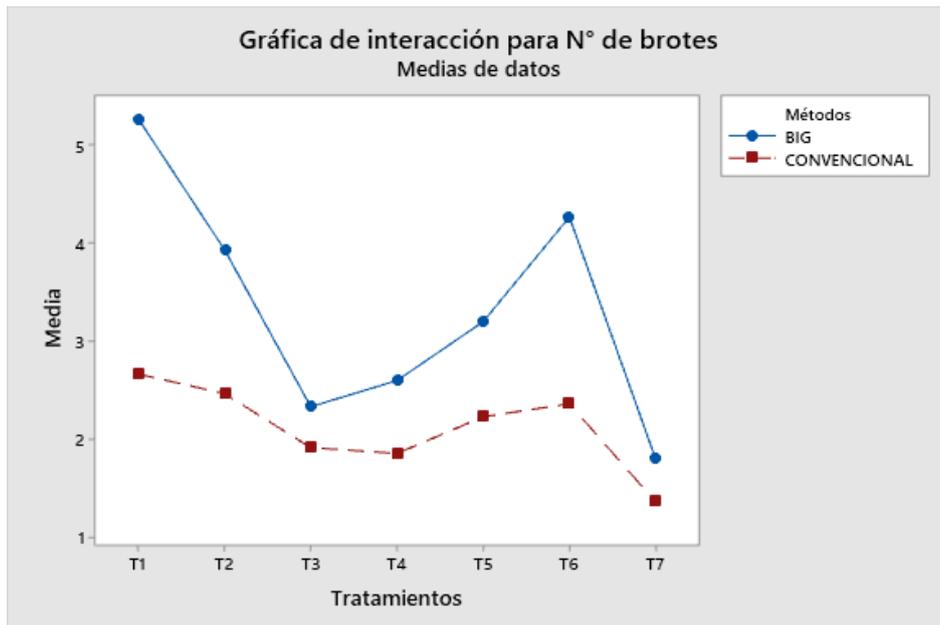


Figura 19: Gráfica de interacción para número de brotes por tratamiento utilizado

En esta grafica de efectos principales se puede visualizar de una mejor manera la comparativa realizada entre ambos métodos, de acuerdo a los tratamientos empleados, en donde el BIG se muestra de forma superior en cuando a la curva de comparación.

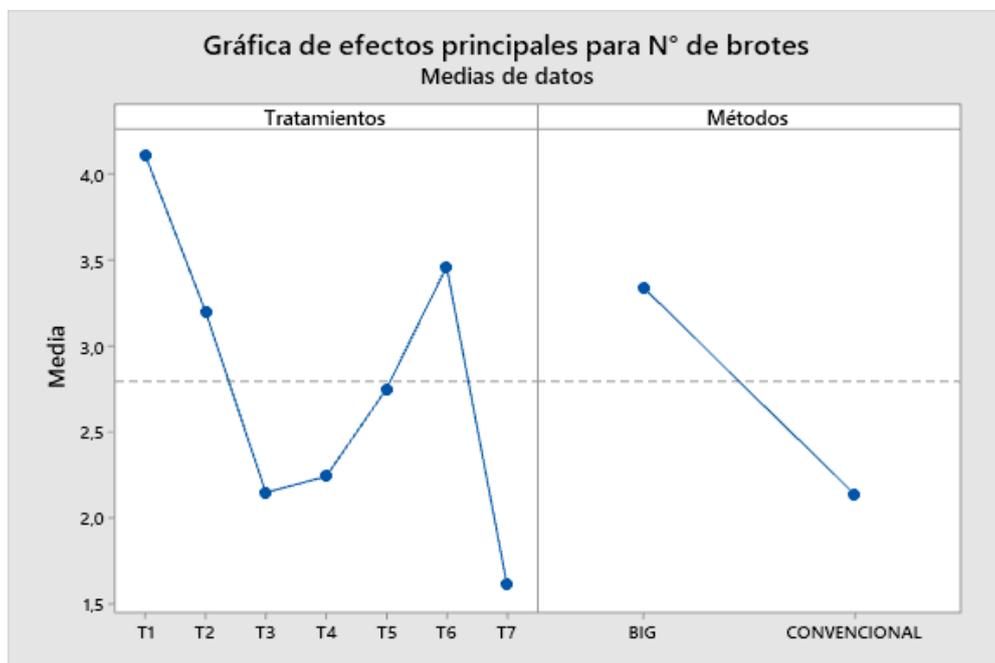


Figura 20: Gráfica de efectos principales para número de brotes

4.5. Evaluación de número de hojas de explantes de *Stevia rebaudiana* en BIG (Biorreactor de inmersión por gravedad)

La evaluación se realizó luego de 30 días de cultivo, en donde las plántulas desarrolladas se mantuvieron a una temperatura de 21°C con un fotoperiodo de 16 horas luz, el crecimiento de las hojas por cada explante se lograron observar a partir de la segunda semana y media de inmersión en el biorreactor, las hojas crecidas tuvieron su origen a partir de cada brote presente en las plántulas crecidas de los segmentos nodales.

Tabla 21: Datos de números de hojas obtenidos mediante el uso del biorreactor de inmersión por gravedad

TRATAMIENTOS	HOJAS EN CADA NUMERO DE EXPLANTE															PROMEDIO
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
T1 (0.1/1)	5	6	8	7	5	8	7	5	7	5	6	7	6	8	7	6.467
T2 (1.0/0.1)	4	5	5	4	4	4	4	3	5	4	6	7	5	4	4	4.533
T3 (0.1/-)	2	3	5	4	4	4	3	4	4	2	4	4	4	4	2	3.533
T4 (-/1.0)	1	2	4	6	5	5	4	5	3	4	2	4	3	4	5	3.800
T5 (0.1/0.1)	4	3	4	5	5	3	5	5	3	5	4	4	3	4	4	4.067
T6 (1.0/1.0)	5	4	5	5	5	4	4	5	5	5	5	6	6	4	4	4.800
T7 (sin fitohormonas)	2	2	3	4	5	4	2	3	4	2	4	2	4	3	5	3.267

Se aplicó la estadística descriptiva para los datos obtenidos de los números de hoja por cada plántula crecida en *Stevia rebaudiana*, los cuales representan la influencia que tuvieron los tratamientos en esta variable, en la tabla 22, se muestran los promedios de cada tratamiento según las concentraciones de fitohormonas ANA y BAP en cada uno de ellos, así también; se halló la desviación estándar, con los datos de números de hojas, para cuantificar la variación existente en función a la media, de esa manera se pudo identificar un dato máximo y un dato mínimo con respecto a los números de hojas de las plántulas de cada tratamiento, en donde el tratamiento 1 (ANA 0.1 mg/L – BAP 1.0 mg/L), presenta superioridad con un máximo de 8 brotes y un mínimo de 5 brotes por plántula, teniendo una media de 6.467, por otro lado se debe tener en consideración que el tratamiento 2, alcanzó un máximo de 7 brotes y un mínimo de 3, sin embargo; presenta una media de 4.533, siendo en este aspecto superior el tratamiento 6 con 4.800 como media, y los números de hojas que oscilan entre 6 y 4 unidades, por plántula. Por otro lado, se ha documentado que a mayor tiempo de contacto, entre los microesquejes y el medio de cultivo, aumenta el suministro de nutrientes y reguladores de crecimiento a los explantes (Santos-Pino *et al.*, 2011), lo que puede maximizar su desarrollo (Preil, 2005). Además, con cada inmersión, el ambiente del recipiente de cultivo se renueva con el fin de eliminar compuestos volátiles, tales como etileno (Roels *et al.*, 2006), y promover la recirculación de dióxido de carbono necesaria para la fotosíntesis, mejorando aún más el metabolismo autotrófico del carbono en las hojas (Aragón *et al.*, 2014).

Tabla 22: Datos estadísticos descriptivos para el número de hojas de *Stevia rebaudiana* mediante el uso de un biorreactor de inmersión por gravedad (BIG)

Variable	Tratamientos	Media	Desv.Est.	Mínimo	Máximo
N° de hojas	T1	6.467	1.125	5.000	8.000
	T2	4.533	0.990	3.000	7.000
	T3	3.533	0.915	2.000	5.000
	T4	3.800	1.373	1.000	6.000
	T5	4.067	0.799	3.000	5.000
	T6	4.800	0.676	4.000	6.000
	T7	3.267	1.100	2.000	5.000

Para poder realizar la comparativa del desarrollo de hojas de la plántula *Stevia rebaudiana*, a través de diversos métodos de cultivo, se realizó el conteo de hojas presentes por cada plántula, para poder obtener los datos de números de hojas, esenciales para el análisis estadístico, algunos viales cultivados presentaron contaminaciones, lo cual se pudo haber debido a la poca hermeticidad de los recipientes en donde fueron contenidos los explantes, ya que las bacterias son los contaminantes in vitro más comunes y ocasionan serios problemas, además de ser difíciles de detectar y eliminar (Orlikowska *et. al.*, 2017). Por lo general no se manifiestan en los primeros subcultivos, ya que la alta presión osmótica, el pH y ciertas hormonas de los medios de cultivo pueden inhibir su crecimiento. Debido a estos factores inhibitorios, muchos microorganismos requieren un período de adaptación a las nuevas condiciones antes de manifestar su presencia, lo que ocurre por lo general en la fase de multiplicación (Hernández & González, 2010).

Tabla 23: Datos de números de hojas obtenidos mediante el cultivo convencional con MS sólido

TRATAMIENTOS	HOJAS EN CADA NUMERO DE EXPLANTE															PROMEDIO
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
ANA / BAP																
T1 (0.1/1)	4	3	7	5	4	4	-	3	-	5	3	2	5	-	5	4.167
T2 (1.0/0.1)	4	3	2	3	3	4	4	3	5	3	3	3	4	3	3	3.333
T3 (0.1/-)	3	4	4	-	2	2	1	-	2	1	2	1	4	2	-	2.333
T4 (-/1.0)	3	2	2	3	3	2	2	3	2	2	1	1	4	3	-	2.357
T5 (0.1/0.1)	5	3	4	2	4	4	-	-	2	2	3	3	2	2	5	3.154
T6 (1.0/1.0)	-	4	5	3	-	4	3	-	3	-	3	4	2	2	4	3.364
T7 (sin fitohormonas)	2	1	2	-	2	-	2	2	-	2	2	1	1	-	3	1.818

En la tabla 24, se logra observar los promedios hallados de cada tratamiento, a raíz de los datos obtenidos en la tabla 23, a los cuales se les aplico la estadística descriptiva con la finalidad de que al igual que con el método BIG, se logre determinar el máximo y el mínimo de hojas crecidas por explante, presentando también un mayor número de

hojas el tratamiento 1 (ANA 0.1mg/l – BAP 1.0 mg/l) con una media de 4.167, presentando 7 hojas y un mínimo de 2 hojas por plántula, en todos los tratamientos la presencia mínima de hojas fue de 1 hoja, siendo el caso del tratamiento 3 con una media de 2.333 y el tratamiento 4 con 2.500, los cuales presentaron similitud con un máximo de 4 hojas y un mínimo de 1 hoja, Según Sandoval 2019, los explantes sin la presencia de fitorreguladores puesto a prueba, responden solamente a los macro y micro nutrientes que contiene el medio de cultivo, así como también a las hormonas vegetales que posee naturalmente.

Tabla 24: Datos estadísticos descriptivos para el número de hojas de *Stevia Rebaudiana* mediante el método convencional de MS sólido

Variable	Tratamientos	Media	Desv.Est.	Mínimo	Máximo
Nº de hojas	T1	4,167	1,337	2,000	7,000
	T2	3,333	0,724	2,000	5,000
	T3	2,333	1,155	1,000	4,000
	T4	2,500	0,941	1,000	4,000
	T5	3,154	1,144	2,000	5,000
	T6	3,364	0,924	2,000	5,000
	T7	1,818	0,603	1,000	3,000

A los datos obtenidos se le aplicó el análisis de varianza ANOVA, con el objetivo de determinar la significancia estadística de los siete tratamientos, y la comparativa de los métodos utilizados para su multiplicación vegetativa de *Stevia rebaudiana* (BIG y método convencional).

En la tabla 25, se muestran las fuentes empleadas para la interacción de las varianzas (ANOVA), esto con respecto a los tratamientos con ANA y BAP, a los métodos empleados y a la interacción que existe entre ellos. En las fuentes de tratamiento y métodos, el nivel de significancia fue del 5%, es decir, que el valor p obtenido resultó ser menor a $\alpha = 0.05$, esto quiere decir que los datos obtenidos en cuanto al número de hojas si van a tener una diferencia honestamente significativa, es decir que existió una influencia de los tratamientos y de los métodos empleados en la variable respuesta, debido a que estas fuentes llegan a ser independientes a cuanto su respuesta, a comparación de la fuente de interacción de tratamientos y métodos en donde el valor p

resultado ser mayor a $\alpha = 0.05$, con un resultado de 0.279, en donde según las condiciones experimentales evaluadas en este estudio, entre la interacción de las variables de tratamientos y métodos usados (Biorreactor de inmersión por gravedad y convencional) se obtiene una respuesta estadística similar en cuanto al desarrollo de número de hojas de *Stevia rebaudiana*.

Tabla 25: ANOVA factorial de los datos del crecimiento de *Stevia Rebaudiana* en función del número de hojas utilizando diversos métodos de operación (BIG y convencional)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamientos	6	133,331	22,222	21,75	0,000
Método	1	93,183	93,183	91,19	0,000
Tratamientos*Método	6	7,712	1,285	1,26	0,279
Error	179	182,907	1,022		
Total	192	422,891			

En la tabla 26, se realizó un análisis Post-Hoc-Tukey, con la finalidad de realizar comparaciones múltiples entre las medias de todos los tratamientos empleados en este estudio, mediante el método de uso del biorreactor de inmersión por gravedad, en el crecimiento de los números de hojas de las plántulas de Estevia, esto con el objetivo de poder identificar de una manera más visual los niveles de similitud o la variabilidad existente entre los tratamientos.

Se debe identificar que los valores en rojo representan a las diferencias estadísticas que existe entre las medias, mientras que; los valores de negro representan similitud entre ellas, por otro lado; los valores de los resultados de los análisis realizados que se acercan a 1 ($\mu_{\text{tratamiento 3}} \approx 1$), son los que presentan mayor igualdad estadística, (Ejm. $\mu_{\text{Tratamiento 3}} = 3.533 \approx \mu_{\text{Tratamiento 4}} = 3.800$).

En la tabla 27, se observa una representación del cuadro de análisis de Post-Hoc-Tukey, en donde se emplea letras para la comparativa entre los tratamientos, las medias que contienen solo una letra, es porque son significativamente diferentes, mientras que los que se encuentran agrupadas de 2 a 3 letras es porque contienen una igualdad entre

ellas, es decir que entre esos tratamientos se obtuvo casi los mismos números de hojas en el desarrollo de las plántulas en el biorreactor de inmersión por gravedad.

Tabla 26: Análisis Post-Hoc - Tukey para las medias de número de hojas mediante el uso de un biorreactor de inmersión por gravedad

Tratamientos	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
T1		0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0005	0.0001
T2	0.0001		0.1129	0.4404	0.8710	0.9914	0.0164
T3	0.0001	0.1129		0.9914	0.7829	0.0164	0.9914
T4	0.0001	0.4404	0.9914		0.9914	0.1129	0.7829
T5	0.0001	0.8710	0.7829	0.9914		0.4404	0.3331
T6	0.0005	0.9914	0.0164	0.1129	0.4404		0.0016
T7	0.0001	0.0164	0.9914	0.7829	0.3331	0.0016	

Tabla 27: Agrupación de los datos utilizando el método Tukey a un nivel de confianza de 95% mediante un biorreactor de inmersión por gravedad (BIG)

Tratamientos	N	Media	Agrupación
T1	15	6.467	A
T6	15	4.800	B
T2	15	4.533	B C
T5	15	4.067	B C D
T4	15	3.800	B C D
T3	15	3.533	C D
T7	15	3.267	D

A los datos obtenidos de los números de hojas contados de cada plántula, que se desarrollaron mediante el método de micropropagación convencional, se les aplicaron también la prueba de Post-Hoc-Tukey, para que de igual forma que los resultados obtenidos en el BIG, puedan realizarse comparaciones entre los promedios de cada tratamiento empleado. En la tabla 28, su logra apreciar la comparación de medias realizadas, en donde la mayoría de la interacción entre los tratamientos se muestran con

similitud estadística, los cuales están cercanos al valor de 1, así mismo; los tratamientos que presentaron diferencias estadísticamente significativas, en comparación con las del método BIG, no fueron todos los tratamientos en interacción con el tratamiento 1, se presentó excepciones como el tratamiento 2, el tratamiento 5 y el tratamiento 6, en donde se puede persuadir claramente el beneficio del uso de fitohormonas en el desarrollo de plántulas de *Stevia rebaudiana*.

Para realizar una representación más sencilla y visual del cuadro de análisis Tukey para número de hojas, se realizó una agrupación de ello, mediante el uso de letras para la identificación de las similitudes y las diferencias entre las medias de estudio.

Tabla 28: Análisis Post-Hoc - Tukey para las medias de número de hojas mediante el método convencional

Tratamientos	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
T1		0,3337	0,0006	0,0012	0,1628	0,4713	0,0001
T2	0,3337		0,1456	0,2854	0,9992	1,0000	0,0048
T3	0,0006	0,1456		0,9996	0,3928	0,1852	0,8789
T4	0,0012	0,2854	0,9996		0,6200	0,3382	0,6235
T5	0,1628	0,9992	0,3928	0,6200		0,9987	0,0263
T6	0,4713	1,0000	0,1852	0,3382	0,9987		0,0089
T7	0,0001	0,0048	0,8789	0,6235	0,0263	0,0089	

Tabla 29: Agrupación de los datos utilizando el método Tukey a un nivel de confianza de 95% mediante el método convencional.

Tratamientos	N	Media	Agrupación	
T1	12	4,16667	A	
T6	11	3,36364	A	B
T2	15	3,33333	A	B
T5	13	3,15385	A	B
T4	14	2,50000	B C	
T3	12	2,33333	B C	
T7	11	1,81818	C	

En la figura 21, se representa la interacción entre los métodos operacionales utilizados en la multiplicación vegetativa de *Stevia rebaudiana*, en este caso, para el desarrollo de las hojas en las plántulas crecidas, para esta variable dependiente, los biorreactores de inmersión por gravedad resultaron ser el método ideal para la micropropagación, esto debido a la viabilidad de todas las plántulas presentes, y a la hermeticidad que posee el equipo, se logra ver que las medias obtenidas en el método convencional son menores a las del sistema BIG. Algunos investigadores señalan que, desde el punto de vista comercial, la micropropagación convencional ha dejado de ser un proceso económicamente eficiente; además, coinciden en que la causa fundamental es debida al uso de agentes gelificantes como soportes de los explantes y el elevado número de operaciones manuales, que implican un costo elevado de mano de obra. (Quiala *et al.* 2012).

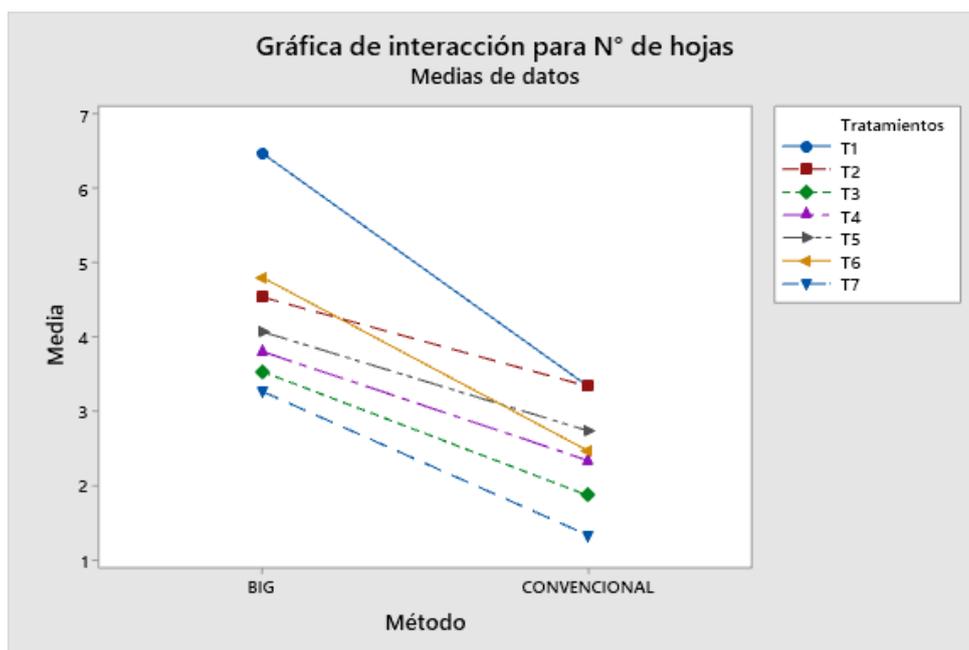


Figura 21: Gráfica de interacción para número de hojas en respuesta al método usado

En la figura 22, se logra observar que, para la obtención de un mayor número de hojas, el tratamiento 1, fue el más apropiado, seguido del tratamiento 6 y el tratamiento 3 que viene siendo el ultimo tratamiento aplicado que posee fitohormona, y presento una escasa obtención de hojas, esto puede deberse a que solo posee la fitohormona ANA, demostrando que estos logran trabajar en conjunto de manera satisfactoria. Se resalta también que todos los tratamientos desde el T1 (0.1 ANA y 1.0 BAP) al T7 (sin

hormonas), emiten una respuesta, en donde, según la gráfica realizada, se tiene una diferencia significativamente mayor al ser comparada con el tratamiento convencional, ya que la línea azul es claramente superior a la línea convencional representada en color rojo. Por otro lado, en la figura 23, se graficaron los efectos principales tomando en consideración todas las muestras experimentales de los tratamientos y de los métodos para el número de hojas, mostrando todos los tratamientos dependiendo del método que se ha utilizado, en donde los tratamientos se encuentran en dependencia de la variable de estudio, a diferencia de las otras graficas que llegan a ser más puntuales o específicas para lo que se requirió.

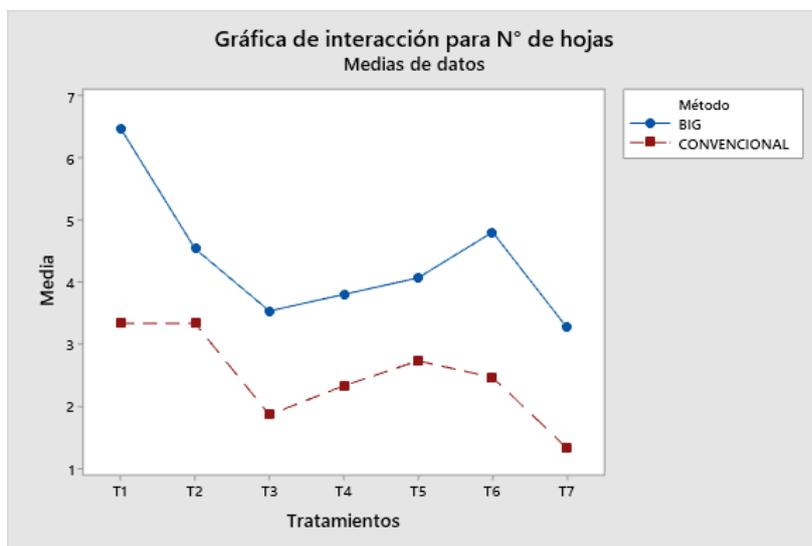


Figura 22: Gráfica de interacción para número de hojas por tratamiento utilizado

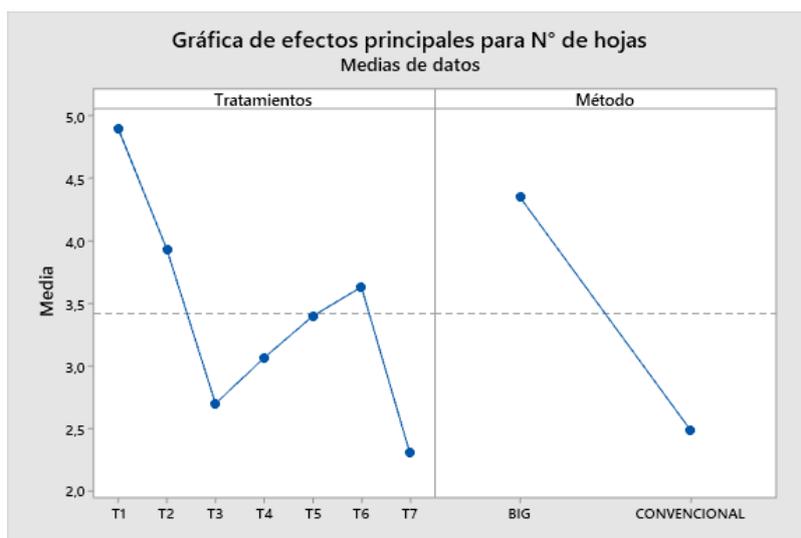


Figura 23: Gráfica de efectos principales para número de hojas

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Se logró determinar que la concentración del ácido naftalenacético en el medio de cultivo MS, para el crecimiento de hojas, brotes y tallo de la planta *Stevia rebaudiana*, es de 0.1 mg/l, teniendo con ello una mayor longitud de tallo en las plántulas obtenidas.
- Se determinó que la concentración del bencilaminopurina en el medio de cultivo MS para el crecimiento de hojas, brotes y tallo de la planta *Stevia rebaudiana* es de 1.0 mg/l ya que logró un mayor número de brotes y hojas en los explantes cultivados.
- Las concentraciones del ácido naftalenacético y bencilaminopurina en el medio de cultivo MS, con los que se generó un óptimo crecimiento de la planta *Stevia rebaudiana* en cuanto longitud de tallo, número de brotes y número de hojas, fue el tratamiento 1 (ANA 0.1 mg/l y BAP 1.0).
- Se identificó que los biorreactores de inmersión por gravedad son un mejor método de multiplicación vegetativa *in vitro* para *Stevia rebaudiana*, al realizar la comparación con el método convencional *in vitro* de MS sólido, debido a que los resultados del BIG para longitud de tallo tuvieron un media de 4.22 cm y una longitud máxima de 4.7 cm, para número de brotes una media de 5.26 y un máximo de 7 brotes, para número de hojas una media de 6.46 y un máximo de 8 hojas; mientras que en el método convencional se obtuvo para longitud de tallo una media de 2.59 cm y una longitud máxima de 4.1 cm, para número de brotes una media de 2.66 y un máximo de 5 brotes y para número de hojas una media de 4.16 y un máximo de 7 hojas.

5.2. RECOMENDACIONES

- Realizar correctamente la desinfección de los explantes y evaluar otros métodos a utilizar para evitar las contaminaciones en los cultivos.
- Al efectuar la selección de los explantes a ser cultivados se debe tener en consideración que las yemas de los segmentos nodales, logren observarse a simple vista, para poder obtener un buen desarrollo.
- Mantener las condiciones de incubación lo más uniformes posibles durante la etapa de multiplicación, debido a que esta influye de manera significativa sobre el desarrollo de los explantes.
- Realizar la comparación de la eficiencia de diferentes modelos de biorreactores de inmersión para la micropropagación, tales como el RITA (Recipiente de inmersión temporal automatizado, el BIT (Biorreactor de inmersión temporal), u otros.
- Realizar investigaciones para determinar que las plántulas micropropagadas de *Stevia rebaudiana*, no pierdan su capacidad para producir y acumular esteviosidos en las hojas.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS Y VIRTUALES

- Aguilar, C., Luz, M., Romero, M. (2006). Fitohormonas. *Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal. Departamento de biología. Universidad Nacional de Colombia.*, 39-48.
- Agrobiotecnología (2011). Micropropagación comercial. Recuperado de <http://www.fbmc.fcen.uba.ar/materias/agbt/teoricos/teoricas-archivo-word/3%20%20Cultivo%20de%20tejidos.doc/view>.
- Aragón, C., Sánchez, C., González-Olmedo, J., Escalona, M., Carvalho, L., & Amâncio, S. (2014). Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors and gelled medium during in vitro growth and acclimatization. *Biologia Plantarum*, 58(1), 29-38.
- Avila, D. (2018). Estandarización del sistema de inmersión temporal para la micropropagación in vitro de *Cattleya Schroederae*. *Tesis para optar por el título de microbiólogo industrial*. Universidad de Santander. Facultad de ciencias exactas, físicas y agropecuarias. Bucaramanga. 55p.
- Basail, M. (2001). Propagación de la yuca (*Manihot esculenta*, Crantz), en sistema de inmersión temporal. *Tesis para optar por el grado de Ingeniero Agrónomo. Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales*.
- Baldetti Herrera, L. (2002) Efecto del ácido naftalenacético (ANA) y Bencilaminopurina (BAB) sobre la regeneración de plántulas de tres clones de camote (*Ipomoea batata* L.), partiendo del cultivo de meristemas. Guatemala.
- Berthouly, M.; Etienne, H. (2005). Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. En: HvoslefEide, A. K. y Preil, W. (eds.). *Liquid Culture Systems or in vitro Plant Propagation*. Springer. pp. 59-73.
- Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología, INIA las Brujas, 382.
- Cabrera Jova, M., Gómez Kosky, R., Rodríguez Morales, S., López Torre, J., Rayas Cabrera, A., Basail Pérez, M., Rodríguez Rodríguez, G. (2008). Multiplicación in vitro de segmentos nodales del clon de ñame Blanco de Guinea (*Dioscorea cayenensis* - *D. rotundata*) en sistemas de cultivo semiautomatizado. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Universidad Nacional de Colombia, pp. 97-103.
- Ciren (1988). Manual de cultivo de la frambuesa *Rubus idaeus*. Centro de Información de Recursos Naturales (CIREN, CORFO) Edición N° 71, Santiago de Chile, Chile.
- Condori, L. (2013). Efecto de dosis de bencil a mino purina (bap) y el ácido naftalem acético (ana) en la producción in vitro de estevia (*Stevia rebaudiana* B.) en

acobamba. *Facultad de ciencias agrarias escuela académico profesional de agronomía*. 14-16

- Debergh, P. y Zimmerman, R. *Micropropagation Technology and Application*. ed. Editores académicos de Kluwer. 1991, 484 págs. 30
- Debnath, S. C. (2011). Bioreactors and molecular analysis in berry crop micropropagation – A review. *Can. J. Plant Sci.* 91: 147–157.
- George, E. F. (1993). Plant tissue culture techniques. In: *Plant propagation by tissue culture v.1: The Technology*. E.F. George (ed.). Exegetics Ltd., Edington., 3-36
- Hernández, Y., & González, M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento in vitro de frutas perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4), 15-23.
- Jimenez, G. (1998). Introducción y multiplicación in vitro del cultivo de ajo variedad Morado Barranquino. *Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión. Facultad de Ciencias Agropecuarias.*, 341-344.
- Litz, R., & Jarret, R. (1991). REGENERACION DE PLANTAS EN EL CULTIVO DE TEJIDOS: EMBRIOGENESIS SOMATICA Y ORGANOGENESIS. *Instituto de comidas y ciencias de Agricultura. Universidad de Florida.*, 144-157.
- Lorenzo, J.C.; González, B. L.; Escalona, M.; Teisson, C.; Espinosa, P.; Borroto, C. (1998). Sugarcane shoot for mation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell Tiss Org Cult* 54, 197-200.
- Lopez, E., Lopez, A., De la Cruz, A., (2017). Efecto del ácido giberélico en la propagación in vitro de *Stevia Rebaudiana* (Bertoni), “Stevia”. Laboratorio de Biotecnología del Instituto de la Papa y Cultivos Andinos, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo. *Arnaldoa* vol.24 no.2. Trujillo.
- Luna, C. (2016). Reproducción Asexual o Multiplicación vegetativa. *Silvicultura y Lab. Biotecnología aplicada y genómica funcional.*, 1-18
- Llanos, C. (2015). Micropropagación in vitro de piña, *Ananas comosus* (L.) merr var. MD2 (bromeliaceae) bajo un sistema de biorreactores de inmersión temporal. Tesis para optar el título profesional de Biólogo con mención en Botánica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. 64.
- Lluna Duval, R. (2006). Hormonas vegetales: crecimiento y desarrollo de la planta. *Horticultura*. 196. pp. 22-26. Disponible de <http://www.fagro.mx/bioestimuladores-decrecimiento.html>
- Martinez, M. (2015). *Stevia Rebaudiana* (Bert.) Bertoni-una revisión. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas – INCA. San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba, CP 32700.

- McAlister, B.; Finnie, J.; Watt, M. P.; Blakeway, F. (2005). Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA) for production of commercial Eucalyptus clones in Mondi Forests (SA). *Plant Cell Tiss Org Cult* 81, 347-358.
- Mesa, D. Roomero, A. Cruz, A. 2002. Estudio de diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) en la micropropagación in vitro de la leucaena leucocephalavc. Perú.
- Minaya, G. (2015). Efecto de diferentes concentraciones de benciloaminopurina (BAP) en el cultivo de Stevia (*Stevia Rebaudiana*) in vitro en la fase de multiplicación. Universidad Nacional Santiago Antunez de Mayolo. Huaraz, Perú. pag. 56.
- Nomberto, (2021). Efecto de las Auxinas y Citocininas en la inducción de callos y regeneración, in vitro. Oficina General de Promoción y Desarrollo de la Investigación (OGPRODEIN) – UNT.
- Orlikowska, T., Nowak, K., & Reed, B. (2017). Bacteria in the plant tissue culture environment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 128(3), 487-508.
- Osorio, C.; S. Rojas; C. D. Díaz; R. H. Alfonso & N. P. Barrera. (2007). STEVIA EL DULCE SABOR DE LA VIDA. Bogotá Community College. Administración comercial y mercadeo. Disponible en: <http://www.agrolalibertad.gob.pe/sites/default/files/manual%20stevia.pdf>
- Paredes Oscar, Becerra Viviana, Valentina Baasch. (2009). Resultados y Lecciones en Sistema de Inmersión Temporal en Especies Anuales, Frutales y Vides. Proyecto de Innovación en las Regiones Metropolitana, del Maule, del Biobío y de Los Ríos., 6-11
- Pérez, N. (2001). Producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en Sistemas de Inmersión Temporal. Tesis de Maestría. *Universidad Central de Las Villas, Instituto de Biotecnología de las Plantas*. Santa Clara, Cuba.
- Pierik, R.L.M. (1988). Handicaps for large scale commercial application of micropropagation. *Acta Horticulturae*, 230:63-71.
- Puentes, J. (2014) La stevia la planta de los diabéticos. *Revista Cultural*. Buenos Aires, Argentina
- Preil, W. (2005). General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for in vitro culture. In: HvoslefEide, A. K., & Preil, W. (Eds), *Liquid culture systems for in vitro plant propagation* (pp. 1-18).
- Quiala, E., Cañal, M. J., Meijon, M., Rodríguez, R., Chávez, M., Valledor, L., & Barbón, R. (2012). Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 109(2), 223-234.

- Ramesh K., Singh V. and Megeji N. W. (2006). Cultivation of stevia [*stevia rebaudiana* (bert.) bertonii]: a comprehensive review. *Advances in Agronomy*. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065211305890030>
- Ramírez, L.E. (2005). Informe agronómico sobre el cultivo de stevia rebaudiana, la hierba dulce. Asociación Camino al Progreso. Poligrafiado. 8p.
- Read, P. y Economou, A. Influencia de la planta madre en el éxito del cultivo de tejidos. *Acta Hort.*, 1987, vol. 212, pág. 111. 86.
- Rebeca Salvador,R., Medali Sotelo,H., Luz Paucar, M. (2014). Estudio de la Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) como edulcorante natural y su uso en beneficio de la salud. Facultad de 157-153.
- Roels, S., Noceda, C., Escalona, M., Sandoval, J., Cañal, M., Rodríguez, R., & Debergh, P. (2006). The effects of headspace renewal in a temporary immersion bioreactor on plantain (*Musa AAB*) shoot proliferation and quality. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84(2).
- Sandoval, E. (2019). Establecimiento in vitro de stevia rebaudiana b. a partir de ápices meristemáticos, utilizando medio nutritivo a diferentes combinaciones de 6-bencilaminopurina (6-bap) y ácido naftalenacético (ana). Santa Ana, El Salvador. Pag. 66.
- Santos-Pino, A., Cabrera-Jova, M., Gómez-Kosky, R., LópezTorres, J., Rayas-Cabrera, M., Basail-Pérez, M., MederoVega, V., & Beovides-García, Y. (2011). Multiplicación en sistema de inmersión temporal del clon de malanga “Viequera” (*Xanthosoma* spp.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2), 97-106.
- Sharry, S., Adema, M., Abedini, W. (2015). Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivos de tejidos *in vitro*. Universidad Nacional de la Plata. Primera edición. Buenos Aires. Argentina. 241p.
- Shock Clinton, C. (1982). Cultivo experimental de *stevia rebaudiana* en california. Instituto de Agronomía. Universidad de California, Prog No. 122.
- Spinoso-Castillo, J., Iglesias Andreu, L., Bello-Bello, J. (2004). establishment of a bioreactor system for vanilla (*vanilla planifolia* jacks ex andrews) micropropagación. nstituto de biotecnología y ecología aplicada (inbioteca), Universidad Veracruzana. Campus para la Cultura, las Artes y el Deporte, Xalapa, Veracruz México.
- Tadhani. (2007),. Caa-Jhee Awild shrub native to faraguay (*Stevia rebaudiana* Bert.) September. Typed Material. STICA, Paraguay.
- Teisson, I. (1996). simple apparatus to performan plant tissue culture by temporary immersion. centre de cooperation internationale en recherche agronomique pour le developpement biotrop lab. montpellier, france.

Ziv, M. (1995). The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. *Acta Horticulturae*, 393:25-38.

Zuñiga, M., Paredes, O., Henzi, X., Ascencio, S., Becerra, V., Baasch, V. (2009). Sistema de Inmersión Temporal en especies anuales, frutales y vides. Proyecto de innovación en las Regiones Metropolitana, del Maule, del Biobío y de los Ríos. Chile. 58pag.

VII. ANEXOS

ANEXO 1: Composición del medio MS

Tabla 30: Macronutrientes del medio Murashige y Skoog

Nombre	Fórmula	Cantidad (g) para 1L
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	1.65
Nitrato de potasio	KNO_3	1.90
Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.37
Fosfato ácido de potasio	KH_2PO_4	0.17
*cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.44

Tabla 31: Micronutrientes del medio Murashige y Skoog

Nombre	Fórmula	Cantidad (patrón) (mg) para 1L
Ácido bórico	H_3BO_3	6.2
Sulfato de manganeso	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
Yoduro de potasio	KI	0.83
Molibdato de sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
Cloruro de cobalto	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025

ANEXO 2: Materiales de biorreactor de inmersión por gravedad (BIG)



Figura 24: Filtros hidrofóbicos



Figura 25: Válvula selenoide



Figura 26: Esterilización de frascos del biorreactor de inmersión por gravedad

ANEXO 3: Plántulas obtenidas en el biorreactor de inmersión por gravedad



Figura 27: Plántulas desarrolladas en BIG



Figura 28: Plántulas a los 30 días de desarrollo



Figura 29: Algunas plántulas obtenidas en el Tratamiento 1 (ANA 0.1 mg/l y BAP 1.0 mg/l) en BIG



Figura 30: Plántulas obtenidas en el Tratamiento 7 (Sin hormonas) del BIG

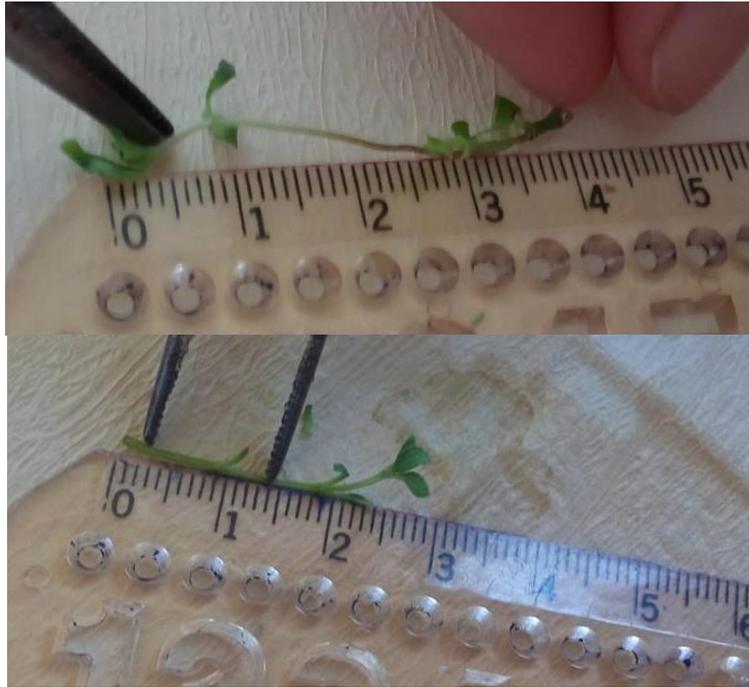


Figura 31: Medición de plántulas de T1 para determinación longitud de tallo



Figura 32: Plántulas representativas del Tratamiento 1, que demostraron una buena longitud de tallo, numero de brotes y hojas.

ANEXO 4: Plántulas obtenidas en el método convencional



Figura 33: Segmentos nodales sembrados en MS sólido con tratamiento 2 (ANA 1.0 mg/l y BAP 0.1 mg/l)

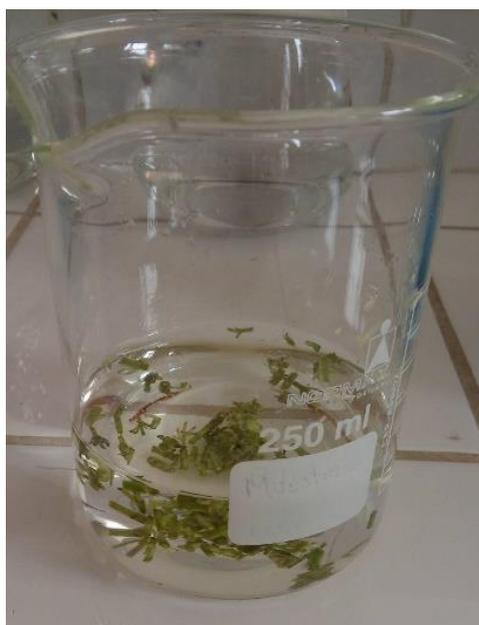


Figura 34: Desinfección de segmentos nodales antes de ser sembrados en cultivos in vitro de MS sólido

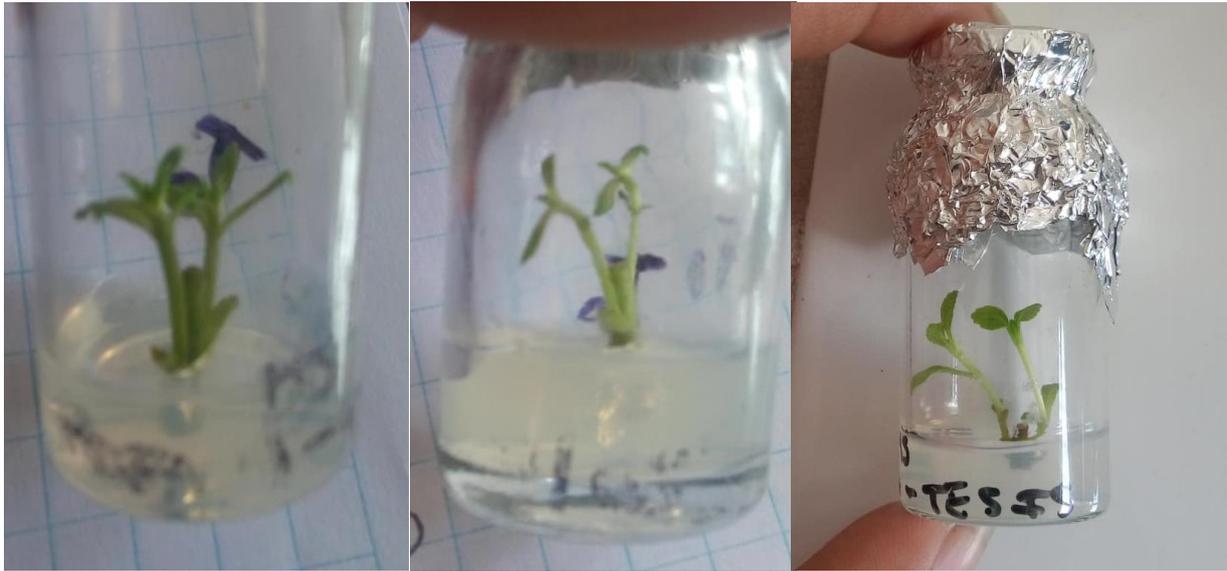


Figura 35: Plántulas obtenidas mediante el método convencional, del Tratamiento 1 (ANA 0.1 mg/l y BAP 1.0 mg/l)

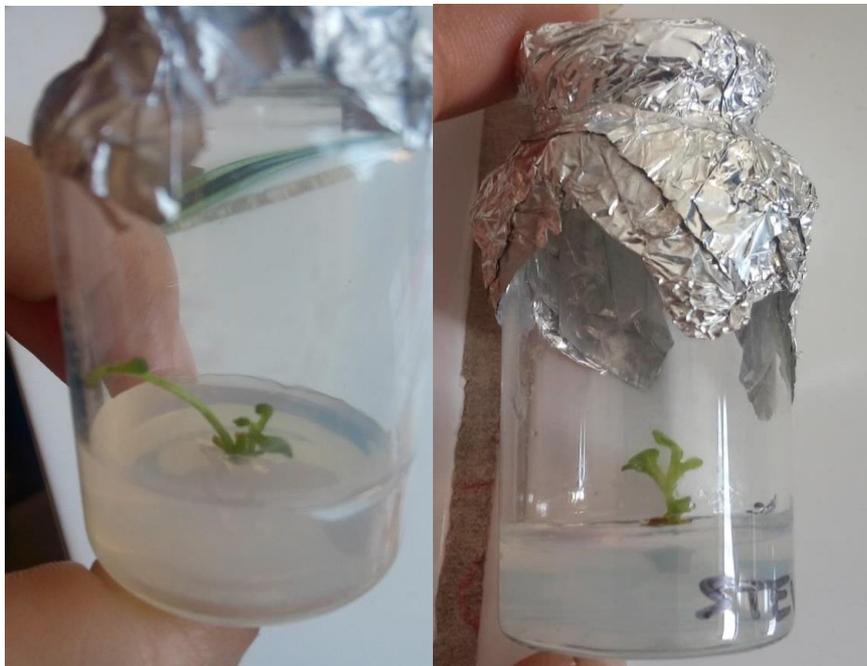


Figura 36: Plántulas obtenidas mediante el método convencional, del Tratamiento 7 (sin hormonas)

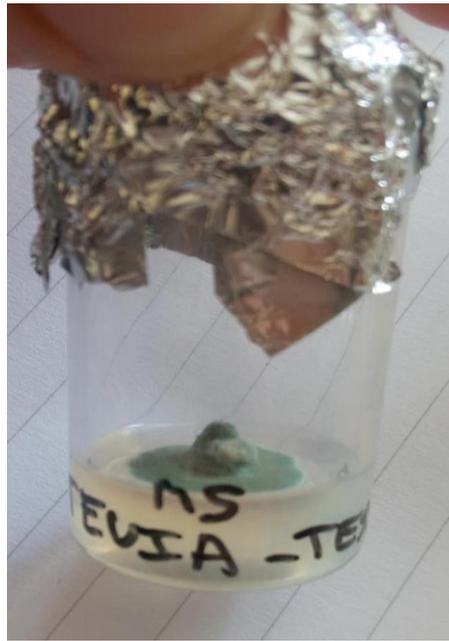


Figura 37: Contaminación de explante en el método convencional de MS sólido



Figura 38: Medición de longitud de tallo en plántulas obtenidas mediante el método convencional de MS sólido

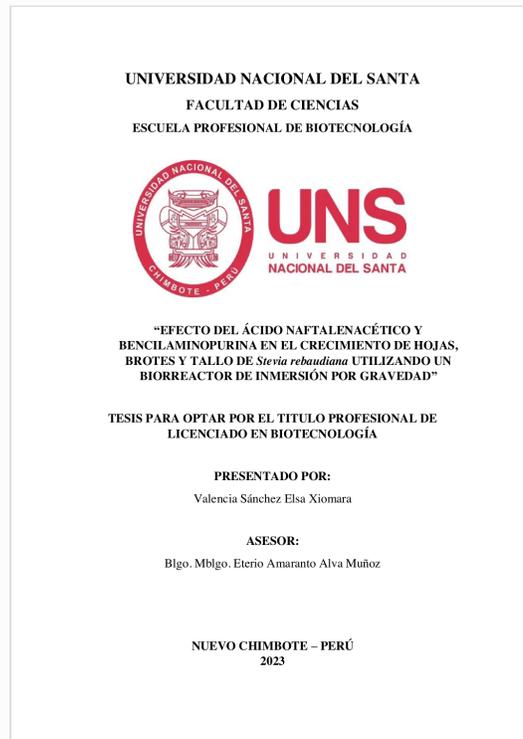


Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por **Turnitin**. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Reporte De Plagio Trabajo De Investigacion
Título del ejercicio: REPORTEES
Título de la entrega: REPORTE: Valencia Sánchez Elsa Xiomara
Nombre del archivo: TESIS_2023-UNS-VALENCIA_1.pdf
Tamaño del archivo: 2.09M
Total páginas: 83
Total de palabras: 19,856
Total de caracteres: 101,971
Fecha de entrega: 24-mar.-2023 11:40a. m. (UTC-0700)
Identificador de la entrega... 2045648651



REPORTE UNS

INFORME DE ORIGINALIDAD

31 %

INDICE DE SIMILITUD

31 %

FUENTES DE INTERNET

4 %

PUBLICACIONES

8 %

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1 vsip.info Fuente de Internet 4 %

2 repositorio.uns.edu.pe Fuente de Internet 3 %

3 repositorio.unasam.edu.pe Fuente de Internet 2 %

4 docplayer.es Fuente de Internet 2 %

5 pdfs.semanticscholar.org Fuente de Internet 1 %

6 core.ac.uk Fuente de Internet 1 %

7 issuu.com Fuente de Internet 1 %

8 repositorio.espe.edu.ec Fuente de Internet 1 %

9 repositorio.unh.edu.pe Fuente de Internet 1 %

10	bdigital.unal.edu.co Fuente de Internet	1 %
11	dspace.unitru.edu.pe Fuente de Internet	1 %
12	aprenderly.com Fuente de Internet	1 %
13	www.thefreelibrary.com Fuente de Internet	1 %
14	www.scielo.org.co Fuente de Internet	<1 %
15	sites.google.com Fuente de Internet	<1 %
16	dspace.unl.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
17	Saris Ulises Ramos-Gabriel, José Andrés Herrera- Corredor, José Guadalupe Gamboa-Alvarado, Emmanuel de Jesús Ramírez- Rivera et al. "Impact of fermented whey addition on resulting sensory characteristics and consumer preference of ripened cheeses", Emirates Journal of Food and Agriculture, 2019 Publicación	<1 %
18	repositorio.ug.edu.ec Fuente de Internet	<1 %

19	repositorio.uta.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
20	colposdigital.colpos.mx:8080 Fuente de Internet	<1 %
21	siaripre.blogspot.com Fuente de Internet	<1 %
22	e-educacion.com Fuente de Internet	<1 %
23	dspace.uclv.edu.cu Fuente de Internet	<1 %
24	1library.co Fuente de Internet	<1 %
25	Submitted to Universidad Nacional Mayor de San Marcos Trabajo del estudiante	<1 %
26	biblioteca.usac.edu.gt Fuente de Internet	<1 %
27	Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS Trabajo del estudiante	<1 %
28	repositorio.upec.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
29	Submitted to University of Glamorgan Trabajo del estudiante	<1 %
30	es.scribd.com	

Fuente de Internet

<1 %

31

www.slideshare.net

Fuente de Internet

<1 %

32

Submitted to Universidad Nacional del Centro del Peru

Trabajo del estudiante

<1 %

33

www.scribd.com

Fuente de Internet

<1 %

34

patents.google.com

Fuente de Internet

<1 %

35

tesis.ucsm.edu.pe

Fuente de Internet

<1 %

36

www.scielo.org.pe

Fuente de Internet

<1 %

37

Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga

Trabajo del estudiante

<1 %

38

www.clubensayos.com

Fuente de Internet

<1 %

39

www.omniascience.com

Fuente de Internet

<1 %

40

www.revfacagronluz.org.ve

Fuente de Internet

<1 %

41	dspace.unach.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
42	revista.ibp.co.cu Fuente de Internet	<1 %
43	georgiusm.files.wordpress.com Fuente de Internet	<1 %
44	worldwidescience.org Fuente de Internet	<1 %
45	Submitted to Universidad Anáhuac Poniente -- Investigaciones y Estudios Superiores, S.C. Trabajo del estudiante	<1 %
46	www.coursehero.com Fuente de Internet	<1 %
47	dspace.otalca.cl Fuente de Internet	<1 %
48	repositorio.udes.edu.co Fuente de Internet	<1 %
49	repositorio.unas.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
50	revistas.unal.edu.co Fuente de Internet	<1 %
51	agrozamgon.blogspot.com Fuente de Internet	<1 %
52	repositorio.lamolina.edu.pe	

Fuente de Internet

<1 %

53

ri.uaemex.mx

Fuente de Internet

<1 %

54

sedici.unlp.edu.ar

Fuente de Internet

<1 %

55

Submitted to Fundación Universitaria del Area Andina

Trabajo del estudiante

<1 %

56

onlinelibrary.wiley.com

Fuente de Internet

<1 %

57

redi.unjbg.edu.pe

Fuente de Internet

<1 %

58

revistas.unl.edu.ec

Fuente de Internet

<1 %

59

simientedisidente.com

Fuente de Internet

<1 %

60

Submitted to Universidad Politecnica Salesiana del Ecuador

Trabajo del estudiante

<1 %

61

repositorio.espam.edu.ec

Fuente de Internet

<1 %

62

repositorio.unjfsc.edu.pe

Fuente de Internet

<1 %

63	repositorio.unj.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
64	www.clayuca.org Fuente de Internet	<1 %
65	"Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites", Springer Science and Business Media LLC, 2021 Publicación	<1 %
66	Pablo-César Muñoz-Carril, Isabel Dans-Álvarez-de-Sotomayor, Eduardo-José Fuentes-Abeledo, María-Lidia Platas-Ferreiro. "Parents' perceptions of their children's smartphone use ()", Culture and Education, 2022 Publicación	<1 %
67	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
68	eprints.uanl.mx Fuente de Internet	<1 %
69	es.sterilizers-china.com Fuente de Internet	<1 %
70	hdl.handle.net Fuente de Internet	<1 %
71	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	<1 %

72	repositorio.una.edu.ni Fuente de Internet	<1 %
73	repositorio.upse.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
74	siiba.conadesuca.gob.mx Fuente de Internet	<1 %
75	tesis.ipn.mx Fuente de Internet	<1 %
76	www.biblio.colpos.mx:8080 Fuente de Internet	<1 %
77	bellasartes-ayacucho.com Fuente de Internet	<1 %
78	bvs.sld.cu Fuente de Internet	<1 %
79	dspace.ucuenca.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
80	dspace.ups.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
81	oa.upm.es Fuente de Internet	<1 %
82	podcasts.google.com Fuente de Internet	<1 %
83	repositorio.geotech.cu Fuente de Internet	<1 %

84	repositorio.uncp.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
85	repositorio.utn.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
86	scielo.sld.cu Fuente de Internet	<1 %
87	www.biologia.ucr.ac.cr Fuente de Internet	<1 %
88	Carlos Trujillo Moya. "Estudio de la Capacidad Organogénica en tomate y especies relacionadas: Localización de QTLs implicados y estudio de la influencia del Etileno", Universitat Politecnica de Valencia, 2013 Publicación	<1 %
89	Isidro Elias Suárez Padron, José Alberto Salgado. "Propagación in vitro de Stevia rebaudiana Bert. (Asteraceae-Eupatorieae) a través de organogénesis", Temas Agrarios, 2008 Publicación	<1 %
90	biblioteca.uajms.edu.bo Fuente de Internet	<1 %
91	biblioteca2.ucab.edu.ve Fuente de Internet	<1 %
92	doi.org Fuente de Internet	<1 %

93	moam.info Fuente de Internet	<1 %
94	repositorio.una.ac.cr Fuente de Internet	<1 %
95	repositorio.unc.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
96	repositorio.unesum.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
97	revistas.iiap.gov.pe Fuente de Internet	<1 %
98	revistas.uptc.edu.co Fuente de Internet	<1 %
99	www.bib.fcien.edu.uy Fuente de Internet	<1 %
100	www.repositorio.usac.edu.gt Fuente de Internet	<1 %
101	www.scielo.org.mx Fuente de Internet	<1 %
102	repositorio.utea.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
103	Flor Y. Solís-Zanotelli, Juan V. Hidalgo-Contreras, Obdulia Baltazar-Bernal. "CRECIMIENTO ex vitro DE PLÁNTULAS DE	<1 %

Lycaste aromatica (GRAHAM) LINDL.", Revista Fitotecnia Mexicana, 2022

Publicación

104	The Gentianaceae - Volume 2 Biotechnology and Applications, 2015. Publicación	<1 %
105	www.ecured.cu Fuente de Internet	<1 %
106	www.monografias.com Fuente de Internet	<1 %
107	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1 %
108	repositorio.urp.edu.pe Fuente de Internet	<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

Apagado

Excluir bibliografía

Activo