

## Propagación *in Vitro* de *Stevia rebaudiana* B. a Partir de Segmentos Nodales

Dinie Espinal de Rueda<sup>1</sup>, Wilma Delvalle<sup>2</sup>, Esteban Cifuentes<sup>3</sup>, Nelson C. Ramia<sup>3</sup>

**Resumen.** La *Stevia rebaudiana* B. es la única planta que se conoce que produce edulcorante natural no calórico denominado steviósido, el cual es 300 veces más dulce que el azúcar de caña. Este estudio fue realizado con el propósito de establecer un protocolo de producción *in vitro* del cultivo a partir de segmentos nodales, así como establecer un costo por planta propagada. En la etapa de establecimiento se evaluó la consistencia del medio (sólido o líquido), la concentración de macroelementos Murashige y Skoog (MS) (50 ó 100%), el tipo de citocinina (kinetina o 6- bencilaminopurina) y la cantidad de cada citocinina (0, 2, 4, ó 6  $\mu\text{M/L}$ ) en un medio basal de MS. El mayor tamaño de brotes resultó en el medio líquido MS con 50% de macroelementos y 6  $\mu\text{M}$  de bencilaminopurina (BAP). En la etapa de multiplicación este tratamiento fue sometido a tres cantidades de kinetina (2, 4 ó 6  $\mu\text{M}$ ) para inducir más brotes y crecimiento. Para esta etapa, el mejor resultado se obtuvo en el medio con 6  $\mu\text{M}$  de kinetina. Las pruebas para el enraizamiento *in vitro* de las vitroplantas se realizaron en un medio basal de MS con tres tipos de auxina: ácido indoleacético (AIA), ácido indolebutírico (AIB) o ácido naftaleneacético (ANA) y cinco concentraciones para cada tipo de auxina; la mayor cantidad y la mejor calidad de raíces se obtuvo utilizando 0.5 mg/L de ANA a los 15 días después de su inducción. Las plantas más altas y el mayor número de plantas aclimatadas se obtuvieron usando microtúneles en bolsa plásticas y con un substrato compuesto por Pro-Mix 'BX':arena (1:1). Bajo condiciones de laboratorio, a partir de un explante que se establezca en la Etapa I o de establecimiento se obtiene aproximadamente 8,000 vitroplantas listas para aclimatación, empleando una tasa de multiplicación de 6, a un costo promedio de \$ 1.69 por vitroplanta aclimatada.

**Palabras clave:** Aclimatación, cultivo de tejidos, edulcorante natural, hierba dulce, micropropagación, microtúneles

**Abstract.** *Stevia rebaudiana* B. is the only crop that produces a non-caloric natural sweetener known as stevioside, which is 300 times sweeter than sucrose. This study was conducted to establish an *in vitro* reproduction protocol from nodal segments and the cost per plant produced. Consistency of the media (solid or liquid), concentration of macro-elements Murashige and Skoog (MS) (50 or 100%), type of cytokinin (kinetin or 6-bencilaminopurine) and the amount of each cytokinin (0, 2, 4, or 6  $\mu\text{M/L}$ ) were evaluated during the establishment stage on a basal MS formulation. Larger shoots were obtained from the liquid MS medium containing 50% inorganic salts supplemented with bencilaminopurine (BAP) (6  $\mu\text{M}$ ). For shoot multiplication, this same treatment was evaluated using three levels of kinetin (2, 4 or 6  $\mu\text{M}$ ) to stimulate growth and new shoots. During this stage, best shoot formation was observed when using 6  $\mu\text{M}$  of kinetin in the medium. *In vitro* rooting evaluations were performed on a basal MS medium containing one of three auxins: Indole-Acetic Acid (IAA), Indole-Butiric Acid (IBA) or Naphthalene Acetic Acid (NAA), and one of five concentrations for each auxin. The highest number and best quality of roots were observed when using ANA (0.5 mg/L), 15 days after induction. During acclimation, the tallest plants and rate of survival were observed when using micro-tunnels as watering management systems, plastic bags as containers and Pro-Mix 'BX':sand (1:1) as substrate. Under laboratory conditions, and based on an average multiplication rate of 6, around 8,000 plants ready for acclimation can be produced from each established explant. The average cost is approximately \$1.69 per acclimated plant.

**Key words:** Acclimation, micro propagation, micro-tunnels, natural sweetener, sweet herb, tissue culture.

<sup>1</sup> Escuela Agrícola Panamericana, P.O. Box 93, Tegucigalpa, Honduras. [drueda@zamorano.edu](mailto:drueda@zamorano.edu)

<sup>2</sup> Ave. Pedro Juan Caballero, Entre Tuyutí y General Díaz, San Pedro del Paraná, Itapúa, Paraguay.

[Wdelvalle\\_py@yahoo.com](mailto:Wdelvalle_py@yahoo.com)

<sup>3</sup> Panorama Roses S.A., Ecuador. [ecifuentes@roses-ec](mailto:ecifuentes@roses-ec)

<sup>4</sup> 3 de julio 119 e Ibarra, Santo Domingo, Ecuador. [camiloramia@hotmail.com](mailto:camiloramia@hotmail.com)

## Introducción

La *Stevia rebaudiana* B. es una planta herbácea de la familia asteraceae y originaria del Paraguay. Es conocida como el único edulcorante natural no calórico y es aproximadamente 300 veces más dulce que la sacarosa (Ministerio de Agricultura y Ganadería, Paraguay 1994). Es propagada naturalmente por semilla, pero tiene baja germinación y una pérdida acelerada de la viabilidad. Además, por ser una planta alógama, tiene mucha variabilidad genética y fenotípica (Tamura *et al.*, 1989; Molinas, 1989). La micropropagación es una alternativa para contrarrestar estas desventajas.

El objetivo del estudio fue desarrollar un protocolo de producción de *Stevia rebaudiana in vitro* utilizando segmentos nodales y determinar los costos de producción.

## Materiales y Métodos

Se cosecharon ramas de brotación joven de plantas madres sanas mantenidas bajo condiciones de invernadero. En el laboratorio, las ramas fueron deshojadas y desinfectadas con alcohol al 70% durante 30 segundos. Luego se sumergieron, durante 15 min en agitación constante, en una solución desinfectante de NaOCl al 1.2% conteniendo tres gotas del agente mojanete monolaurato de polioxietileno sorbitano (Tween<sup>®</sup> 20) por cada 100 ml de solución desinfectante. En la cámara de flujo laminar se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril y las ramas se seccionaron en segmentos nodales de 1.5 cm de largo y de 2.0 a 3.0 mm de diámetro con por lo menos una yema axilar.

En la etapa I de establecimiento se evaluó la consistencia del medio (sólido o líquido), la concentración de macroelementos Murashige y Skoog (MS) en el medio de cultivo (50 ó 100%), el tipo de citocinina (kinetina o 6-bencilaminopurina) y la cantidad de cada citocinina (0, 2, 4 ó 6  $\mu\text{M/L}$ ) en un medio basal de MS. Se evaluaron 36 tratamientos, cada uno con tres réplicas y cada réplica tuvo 10 unidades experimentales. Después de 30 días de la siembra, las vitroplantas formadas de los explantes provenientes de los dos mejores tratamientos (1. Medio líquido con

50% de macroelementos MS y 6  $\mu\text{M}$  de kinetina; y 2. Medio líquido con 50% de macroelementos MS y 4  $\mu\text{M}$  de kinetina) fueron transplantados a un medio de cultivo etapa II de multiplicación para estimular la brotación.

Los medios evaluados en la etapa II de multiplicación consistieron en un medio líquido basal MS con 50% de macroelementos suplementado con tres concentraciones de kinetina (2, 4 ó 6  $\mu\text{M/L}$ ), para un total de seis tratamientos y 10 repeticiones por tratamiento. Una vez obtenido el mejor tratamiento en esta etapa, se realizaron tres subcultivos con 20-25 días entre cada uno.

Para la etapa III de enraizamiento *in vitro*, después del quinto subcultivo, las vitroplantas se colocaron en un medio basal MS con tres tipos de auxina (AIA, AIB o ANA) y cinco concentraciones para cada tipo de auxina (0, 0.5, 1.0, 1.5 ó 2.0 mg/L) para un total de 15 tratamientos. Cada tratamiento consistió en tres réplicas y cada réplica tuvo 10 unidades experimentales.

En todas las etapas de laboratorio se usó un fotoperiodo de luz:oscuridad de 16:8 horas y una temperatura de 26 C. La luz era de lámparas fluorescente Silvana, Daylight, F96T12/D/EX de 75 Watt.

Al finalizar la etapa de enraizamiento *in vitro*, y para proceder a la etapa IV de aclimatación, se trasplantaron al invernadero 1080 vitroplantas que fueron evaluadas en seis substratos, tres sistemas de manejo de humedad y dos tipos de contenedores, para un total de 36 tratamientos. Los seis substratos consistieron en:

- (1) Arena:compost:suelo (2:1:1)
- (2) Arena:bocashi:suelo (1:1:1)
- (3) Pro-Mix 'BX' sin arena
- (4) Pro-Mix 'BX':arena (3:1)
- (5) Pro-Mix 'BX':arena (1:1)
- (6) Pro-Mix 'BX':arena (1-3)

El Pro-Mix 'BX' es un medio de crecimiento de turba de sphagnum canadiense, fabricado por Hummert International, 4500 Earth City Express Way, Earth City, MO 63045, Estados Unidos.

Los tres sistemas de manejo de humedad fueron:

- (1) Cámaras plásticas de armazones de madera

formando un rectángulo de  $2.0 \times 1.2 \times 0.5$  m. Los armazones fueron cubiertos de plástico transparente en todas sus caras y ubicados bajo un invernadero cubierto con sarán que retiene el 60% de la luz solar. Las cámaras fueron lavadas y desinfectadas con cloro al 20% y alcohol al 70% antes de colocarlas sobre plataformas de metal a 30 cm de altura del suelo;

(2) Sistema de riego por nebulización con un régimen de riego de 20 seg cada 5 min desde las ocho de la mañana hasta las cuatro de la tarde; y

(3) Microtúneles construidos sobre camas de 7.0 m de largo y 1.4 m de ancho conteniendo un substrato de 75% de arena y 25% de casulla de arroz, y ubicadas bajo un sarán que retiene el 40% de la luz.

Para el armazón de los microtúneles se ubicaron a los lados de cada cama y a una distancia de 1.0 m uno del otro, ocho tubos de PVC (cloruro de polivinilo), de 25 cm de largo y 5.0 cm de ancho (Figura 1a). Sobre los tubos de base se pusieron ocho arcos de PVC de 3.8 cm de diámetro y 2.5 m de largo que constituyeron las estructuras principales de los microtúneles (Figura 1b). A 20 cm de distancia de la parte frontal de cada cama (Figura 1c) se colocaron tres estacas de aproximadamente 20 cm de largo, desde donde se ataron unas cuerdas plásticas que dejaron fijado cada arco con el siguiente a lo largo de la cama (Figura 1d). Estas cuerdas plásticas dejaron fijado cada arco con el siguiente a lo largo de la cama. Estas cuerdas plásticas se colocaron con el propósito de darle la fortaleza necesaria a los arcos para que pudieran sostener el peso del plástico colocado sobre toda la estructura.

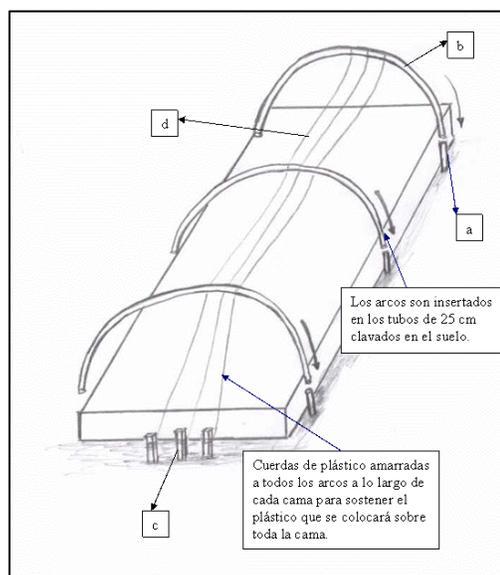
Para el sistema de microtúneles los tratamientos en bolsa fueron ubicados en un microtúnel y las bandejas en otro microtúnel. Los dos tipos de contenedores fueron:

(1) Bandejas multiceldas de poliestireno Pro-Trays<sup>TM</sup> de  $53.0 \times 26.6$  cm, con 50 celdas de 5.9 cm de profundidad, 2.9 cm de diámetro basal y 4.8 cm de diámetro en la parte superior de la celda (fabricadas por Hummert International, 4500 Earth City Express Way, Earth City, MO 63045, Estados Unidos), y

(2) Bolsas plásticas de  $12.7 \times 10.2$  cm.

Además, se aclimataron 180 vitro plantas utilizando micro invernaderos, evaluando los seis substratos del experimento anterior para un total de seis tratamientos, con tres réplicas por tratamiento y cada tratamiento constó de 10 unidades experimentales. Para la construcción de los micro invernaderos se utilizaron tablas de madera de  $56 \times 30$  cm, a las que se les perforaron tres agujeros en cada extremo, procurando no atravesar toda la tabla, con el fin de colocar arcos de alambre número 8. Después de haber introducido cada bandeja ya sembrada con el tratamiento respectivo, se cubrió el micro invernadero con una bolsa plástica que se amarró al frente con un alambre de cobre emplastado. Una vez sellados, los micro invernaderos se trasladaron a un invernadero con sarán que retiene el 60% de la luz. El riego se realizó una vez por semana con botellas aspersoras.

Para cada una de las etapas en el proceso de producción *in vitro* de *Stevia*, se determinaron los costos, separando los costos fijos y variables de las actividades de producción. Para el estudio económico se realizaron flujos de efectivo a 5 años, estimando el precio de venta según precios de venta de la competencia. Las variables que se midieron fueron los flujos netos y el Beneficio/Costo.



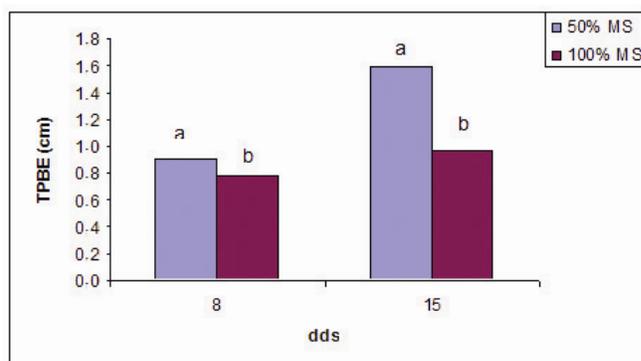
**Figura 1.** Diagrama del diseño de los microtúneles usados para la aclimatación de vitroplantas de *Stevia rebaudiana*.

## Resultados y Discusión

**Etapa de establecimiento.** La consistencia del medio de cultivo (líquido o sólido) no tuvo efecto significativo en el tamaño de los brotes de los explante; sin embargo, independientemente de las otras variables estudiadas, la concentración de macroelementos MS en el medio influyó en el tamaño de los brotes de los explante. El mayor el tamaño de los brotes por explante, a los 8 y 15 días después de la siembra (dds), se presentó en el medio líquido con 50% macroelementos MS, siendo estos de 0.90 y 1.59 cm, respectivamente (Figura 2).

La mejor respuesta se observó en los brotes cultivados con 6  $\mu\text{M}$  de kinetina en medio líquido con 50% de macroelementos MS, seguido del tratamiento en que se utilizaron 4  $\mu\text{M}$  de kinetina en medio líquido con 50% de macroelementos MS. Ambos tratamientos fueron seleccionados como fuente de material vegetativo para continuar las evaluaciones en la etapa de multiplicación. El menor tamaño de los brotes se observó al utilizar la mayor dosis de Bencilaminopurina, en medio sólido con 50% de macroelementos MS (Cuadro 1).

**Etapa de multiplicación.** La mayor cantidad de brotes por explante se obtuvo de las vitroplantas procedentes del medio de establecimiento (etapa I) líquido con 50% de macroelementos MS y 6  $\mu\text{M}$  de kinetina. De esta procedencia, el material que obtuvo la mayor cantidad de brotes por explante durante el cultivo en la etapa II (multiplicación), fue el suplementado con 6  $\mu\text{M}$  de kinetina. Las menores cantidades de brotes por explante se presentaron en las vitroplantas provenientes del medio de establecimiento líquido con 50% de macroelementos con 4  $\mu\text{M}$  de kinetina (Cuadro 2). El tamaño de los brotes por explante no fue influenciado por el tamaño inicial de las vitroplantas ni por el nivel de kinetina utilizado en el medio de multiplicación. Utilizando los mejores medios de cultivo en la etapa de establecimiento y multiplicación, se lograron tasas de multiplicación de 4 en el primer subcultivo, y de 6 y 8 en el segundo y tercer subcultivo, respectivamente.



**Figura 2.** Efecto de la concentración de macroelementos Murashige y Skoog (MS) en el tamaño promedio de los brotes por explante (TPBE) a los 8 y 15 días después de la siembra (dds) en medio líquido MS (50% MS= Medio básico Murashige y Skoog (MS) con 50% de concentración de macroelementos, 100% MS= Medio básico Murashige y Skoog (MS) con 100% de concentración de macroelementos

**Cuadro 1.** Efecto de la concentración de los macroelementos Murashige y Skoog (MS) en el medio, consistencia del medio de cultivo y tipo de citocinina en el tamaño de brotes por explante, a los 15 días después de la siembra, durante el establecimiento (etapa I) *in vitro* de *Stevia rebaudiana*. Los diez mejores tratamientos.

Macro-elementos MS (%)	Consistencia del medio	Citocinina		Tamaño del brote <sup>2</sup> (cm)
		Tipo <sup>1</sup>	Cantidad ( $\mu\text{M}$ )	
50	Líquido	Kin	6	2.50 <sub>a</sub>
50	Líquido	Kin	4	2.45 <sub>ab</sub>
100	Sólido	BAP	4	2.12 <sub>bc</sub>
50	Sólido	BAP	6	2.00 <sub>bc</sub>
100	Sólido	BAP	2	2.00 <sub>bc</sub>
50	Líquido	Testigo	0	2.00 <sub>bc</sub>
50	Líquido	Kin	2	2.00 <sub>bc</sub>
50	Sólido	Kin	2	1.86 <sub>bc</sub>
50	Sólido	Kin	4	1.75 <sub>bc</sub>
50	Líquido	BAP	4	1.71 <sub>bc</sub>

<sup>1</sup> Kin: Kinetina, BAP: Bencilaminopurina

<sup>2</sup> Promedios en la misma columna con letras diferentes tienen diferencias significativas según la Prueba SNK ( $P < 0.05$ ).

**Cuadro 2.** Efecto de la cantidad de kinetina en el número promedio de brotes por explante durante la multiplicación *in vitro* de *Stevia rebaudiana*, en explantes provenientes de la etapa I con 4 ó 6  $\mu\text{M}$  de kinetina.

Kinetina ( $\mu\text{M}$ )		Número promedio de brotes por explante <sup>2</sup>
Etapas I <sup>1</sup>	Etapas II	
6	6	2.50 <sub>a</sub>
	2	1.90 <sub>ab</sub>
	4	1.30 <sub>b</sub>
4	6	1.37 <sub>b</sub>
	2	1.30 <sub>b</sub>
	4	1.00 <sub>b</sub>

<sup>1</sup> 50% de concentración de macroelementos en medio líquido con 6  $\mu\text{M}$  kinetina y 50% de concentración de macroelementos en medio líquido con 4  $\mu\text{M}$  kinetina.

<sup>2</sup> Promedios en la columna con letras diferentes son significativamente diferentes según la Prueba SNK ( $P < 0.05$ ).

**Etapas de enraizamiento *in vitro*.** Al suplementar el medio de cultivo de la etapa III de enraizamiento *in vitro* con 0.5 mg/L de ANA se observó el menor número de días para la formación de raíces (15 días), y el mayor número de vitroplantas con raíces mayores de 10 mm de largo. Estos resultados se asemejan a los encontrados por Tamura *et al.*, (1984) que al utilizar 0.1 mg/L de ANA observó un óptimo enraizamiento *in vitro* de *S. rebaudiana*, y Lyakhovkin *et al.* (1993) que obtuvo los mismos resultados al utilizar ANA a concentraciones de 0.05 y 0.2 mg/L (Cuadro 3).

Al añadir 0.5 mg/L de ANA hubo 73% de enraizamiento y se formaron raíces mayores de 10 mm de longitud. Se observó una mayor formación de tejido callogénico y un pobre desarrollo radicular en aquellos tratamientos cuyos medios nutritivos se encontraban, ya sea ausentes de auxinas, o con altos niveles (2 mg/L) de auxina, independiente de la auxina utilizada. Otros autores como Ferreira y Handro (1987) establecieron un método de micropropagación para *Stevia rebaudiana* utilizando hojas jóvenes de plantas adultas cultivadas en un medio basal Linsmaier y Skoog (LS) y utilizando BA en lugar de kinetina para la etapa II de multiplicación y utilizando AIB en lugar de ANA para la etapa III de enraizamiento *in vitro*.

**Cuadro 3.** Efecto del tipo y nivel de auxina en el número de días a formación de raíces, en el número de plantas enraizadas y el tipo de enraizamiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana*.

Tipo de auxina <sup>1</sup>	Dosis (mg/L)	Días a formación de raíces <sup>2</sup>	Enraizamiento	
			Tipo <sup>3</sup>	%
ANA	0.5	15.00 <sub>a</sub>	4	73 <sub>ab</sub>
ANA	0.0	16.00 <sub>b</sub>	1	60 <sub>abcd</sub>
AIB	1.0	17.00 <sub>c</sub>	0	40 <sub>bcde</sub>
AIA	0.5	17.00 <sub>c</sub>	1	50 <sub>bcd</sub>
AIA	0.0	17.00 <sub>c</sub>	2	45 <sub>bcde</sub>
ANA	1.0	17.00 <sub>c</sub>	1	40 <sub>cde</sub>
AIA	1.0	17.50 <sub>c</sub>	1	90 <sub>a</sub>
AIB	0.0	17.50 <sub>c</sub>	0	50 <sub>bcd</sub>
AIA	1.5	17.66 <sub>c</sub>	0	40 <sub>cde</sub>
AIB	0.5	18.00 <sub>c</sub>	2	60 <sub>abc</sub>
AIB	1.5	18.33 <sub>d</sub>	2	50 <sub>bcd</sub>
ANA	1.5	18.33 <sub>d</sub>	1	30 <sub>def</sub>
ANA	2.0	19.00 <sub>d</sub>	2	30 <sub>def</sub>
AIA	2.0	19.22 <sub>d</sub>	1	30 <sub>def</sub>
AIB	2.0	19.30 <sub>d</sub>	0	35 <sub>cdef</sub>

<sup>1</sup> ANA= ácido naltalenacético; AIB= ácido indolbutírico; AIA= ácido indoleacético.

<sup>2</sup> Promedios en la misma columna con letras diferentes tienen diferencias significativas según la Prueba SNK ( $P < 0.05$ ).

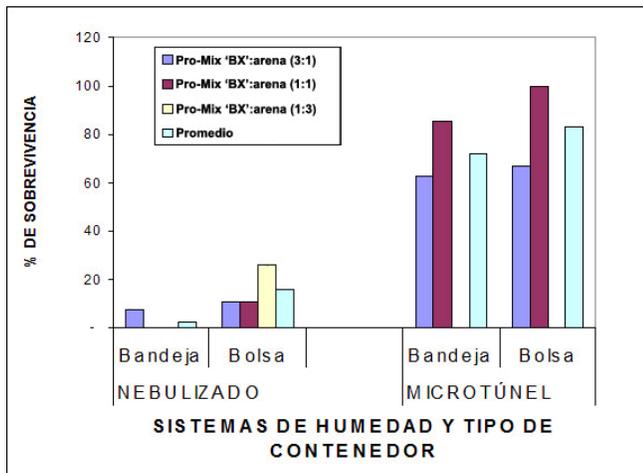
<sup>3</sup> Tipo de enraizamiento: 0 = sin enraizamiento; 1 = formación de callo; 2 = raíces de 1-3 mm de largo; 4 = raíces > de 10 mm de largo.

**Etapas de aclimatización.** Se encontraron diferencias en el porcentaje de sobrevivencia de las vitroplantas aclimatadas, para el sistema de manejo de humedad y el tipo de contenedor utilizado. La sobrevivencia fue superior en el sistema de microtúnel (Figura 3). En ambos sistemas de humedad el uso de bolsas plásticas superó el uso de bandejas multiceldas Pro-Trays<sup>TM</sup>. En el sistema de microtúnel hubo una sobrevivencia de 82.7 y 71.6% para bolsas plásticas y bandejas multiceldas, respectivamente. En el sistema nebulizado se obtuvo una sobrevivencia de 16 y 2.5% para bolsas plásticas y bandejas multiceldas Pro-Trays<sup>TM</sup>, respectivamente.

No se encontraron diferencias entre los sustratos evaluados. Sin embargo, en microtúnel, en bolsas y en bandejas múltiples, la mayor supervivencia (92.6%) fue en el sustrato compuesto por Pro-Mix ‘BX’:arena (1:1). La diferencia (aproximadamente 11% más) en la sobrevivencia al usar bolsas plásticas, en comparación con el uso de bandejas múltiples en microtúnel, aumentó al utilizar el sustrato Pro-Mix ‘BX’:arena (1:1). En este sustrato sobrevivieron todas las vitroplantas, siendo la mayor sobrevivencia en este estudio (Figura 3).

Usando cámaras plásticas, todas las vitroplantas murieron antes de la cuarta semana de aclimatación; según lo observado, esto pudo ser consecuencia de la baja humedad a la que las plantas estuvieron expuestas ya que las cámaras plásticas no permanecían herméticamente cerradas, lo que causaba que se escapara la humedad.

En la altura de las vitroplantas se encontró diferencia en el sistema de humedad utilizado en la etapa de aclimatación. Las vitroplantas más altas se obtuvieron en microtúnel (5.8 cm) comparado con nebulización (4.1 cm). Esto indica que el microtúnel proveyó el ambiente adecuado y óptimo de humedad para la adaptación gradual de las vitroplantas de *S. rebaudiana* al medio externo (Cuadro 4).



**Figura 3.** Efecto del sistema de manejo de humedad (nebulizado o microtúnel), composición del sustrato y tipo de contenedor (bandeja o bolsa) en la sobrevivencia de vitroplantas de *Stevia rebaudiana* durante la aclimatación.

**Cuadro 4.** Efecto del sistema de aclimatación sobre la altura de las vitroplantas, durante la etapa de aclimatación de *Stevia rebaudiana*.

Sistema y sustrato	Altura (cm)		
	Bandeja (b)	Bolsa (a)	Promedio
<b>Sistema microtúnel (a)</b>			
Pro-Mix ‘BX’:arena (3:1)	5.29	7.01	6.15
Pro-Mix ‘BX’:arena (1:1)	5.68	6.70	6.19
Pro-Mix ‘BX’:arena (1:3)	4.42	5.98	5.20
Promedio	5.13	6.56	5.85
<b>Sistema nebulizado (b)</b>			
Pro-Mix ‘BX’:arena (3:1)	4.35	4.40	4.38
Pro-Mix ‘BX’:arena (1:1)	0.00	4.00	4.00
Pro-Mix ‘BX’:arena (1:3)	0.00	3.95	3.95
Promedio	4.35	4.05	4.09

En ambos sistemas hubo alta mortalidad en los sustratos de compost, arena más suelo y en el sustrato compuesto de bocashi, arena y suelo. El resto de los sustratos tuvieron baja o nula sobrevivencia debido a: (a) intoxicaciones con altas concentraciones de fósforo y Potasio (Kidder y Rhue 1998) como es el caso del sustrato de bocashi con arena y suelo (1:1:1) o (b) una mala estructura física como es el caso del compost con arena y suelo (1:2:1), el cual tendió a compactarse rápidamente. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Lyakhovkin *et al*, (1993), los que indican que se obtiene una alta supervivencia en la aclimatación utilizando sustratos sueltos, especialmente en la mezcla de arena con suelo (1:1) o solamente en arena.

Las vitroplantas más altas en sistema de microtúnel, se obtuvieron con los sustratos compuestos de Pro-Mix ‘BX’:arena (1:1) (4.9 cm) y Pro-Mix ‘BX’:arena (1:3) (3.4 cm) a la cuarta semana de aclimatización, lo cual pudo deberse a un adecuado equilibrio entre la capacidad de retención y desalajo del agua de exceso de estos sustratos.



**Cuadro 7.** Costos totales de producción *in vitro* de 7776 unidades de *Stevia rebaudiana* con base en una tasa de multiplicación de seis y haciendo cinco subcultivos.

Descripción	Total
Desinfección	1.35
Lavado de cristalería	86.25
Secado	14.90
Preparación de platos Petri	257.25
Etapa I (establecimiento)	547.17
Etapa II (multiplicación)	585.33
Subcultivos 1 a 5	720.63
Etapa III (enraizamiento)	100.31
Etapa IV (invernadero)	10,799.43
Costo total	13,112.62

### Literatura Citada

Ferreira, C. y W. Handro. 1987. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* through leaf explants from adult plants. Institute of Biosciences. University of Sao Paulo (Bra.) May, 157-160.

Kidder, G; Rhue, R.D. 1998. Procedures used by the Extension Soil Testing Laboratory and Interpretation of Results. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville. p 3 – 33.

Lyakhovkin, A.G., D.L Tran, D.A Titov y P.A. Mai. 1993. Cultivation and utilization of Stevia. Agricultural Publishing House (Vietnam). p 5-43.

Ministerio de Agricultura y Ganadería; Subsecretaría de Estado de Agricultura, Paraguay. 1994. Producción de Ka'a he'e. Eds. Luis Alberto Alvarez, Roberto Casaccia y Gerardo López Z. 2ed. Paraguay, Ministerio de Agricultura y Ganadería. 48 p.

Molinas, S. 1989. Fortuna Stevia del Paraguay S.R.L.: Promoción, cultivo, industrialización y comercialización de la *Stevia rebaudiana* Bertoni (Ka'a he'e). Asunción, Paraguay. 24 p.

Tamura, Y., S. Nakamura, H. Fukui y M. Tabata. 1984. Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* B. by stem-tips culture. Plant Cell Reports 3:183-185.

Recibido para publicación el 16 de enero de 2007