

Micropropagation of *Stevia rebaudiana* in temporary immersion systems as an alternative horticultural production method

Micropropagación de *Stevia rebaudiana* en sistemas de inmersión temporal para incursionar en la producción hortícola

Catalina Rosales; Jaime Brenes; Karla Salas; Silvia Arce-Solano; Ana Abdelnour-Esquivel*

Instituto Tecnológico de Costa Rica, Centro de Investigación en Biotecnología. Avenida 14, Calle 15, Provincia de Cartago, Cartago, C. P. 30101, COSTA RICA.

*Corresponding author: aabdelnour@itcr.ac.cr, tel. (506) 2550-9029.

Abstract

Stevia rebaudiana, known as sweetleaf, produces a sweetener in its leaves due to the presence of steviol glycosides (stevioside and rebaudioside); however, its seed has germination problems, which is why various temporary immersion systems (TIS) have been studied for its production. The objectives of this study were to scale up the *in vitro* production of two *S. rebaudiana* cultivars using RITA®, BIT® and SETIS®, and to evaluate the production of biomass in the field. The studied cultivars were 'Morita II' and 'Silvestre'. The production stages of both cultivars were: *in vitro*, liquid medium (with three TIS: RITA®, BIT® and SETIS®), greenhouse and finally they were taken to the field. In each TIS, five different media were evaluated, varying in each one the concentrations of sucrose, calcium pantothenate and gibberellic acid. The treatments produced vigorous plants, a greater number of leaves and shoots, and a higher multiplication rate. Both cultivars had greater stem length in BIT. Under this same system 'Morita II' produced eight shoots per plant, while in SETIS only three. 'Silvestre' had two shoots per plant with the two TIS. In both cultivars, regardless of the TIS, greenhouse survival and foliage production in the field were very similar. Therefore, the selection of the material should be based on the content of steviol glycosides and the adaptation of the cultivar to the planting site. All TIS evaluated allowed scaling-up plant production, and both materials are promising for planting.

Keywords: BIT®, SETIS®, RITA®,

micropropagation, stevia.

Resumen

Stevia rebaudiana, conocida como hierba dulce, produce en sus hojas un edulcorante debido a la presencia de glicósidos de esteviol (esteviolósido y rebaudiósido); sin embargo, su semilla presenta problemas de germinación, por lo que se han estudiado diversos sistemas de inmersión temporal (SIT) para su producción. Los objetivos de este estudio fueron escalar la producción *in vitro* de dos cultivares de *S. rebaudiana* utilizando RITA®, BIT® y SETIS®, y evaluar la producción de biomasa en campo. Los cultivares estudiados fueron 'Morita II' y 'Silvestre'. Las etapas de producción de ambos cultivares fueron: *in vitro*, medio líquido (con tres SIT: RITA®, BIT® y SETIS®), invernadero y finalmente se llevaron a campo. En cada SIT se evaluaron cinco medios distintos, variando en cada uno las concentraciones de sacarosa, pantotenato de calcio y ácido giberélico. Los tratamientos produjeron plantas vigorosas, mayor número de hojas, brotes y tasa de multiplicación. Ambos cultivares tuvieron mayor longitud de tallo en BIT. Bajo este mismo sistema 'Morita II' produjo ocho brotes por planta, mientras que en SETIS solo tres. 'Silvestre' tuvo dos brotes por planta con los dos SIT. En ambos cultivares, sin importar el SIT, la sobrevivencia en invernadero y la producción de follaje en campo fueron muy similares. Por lo anterior, la selección del material deberá hacerse con base en el contenido de esteviolósidos y en la adaptación del cultivar al sitio de siembra. Todos los SIT evaluados permitieron el escalamiento de la producción de plantas, y ambos materiales son promisorios para la siembra.

Palabras claves: BIT®, SETIS®, RITA®,

micropropagación, stevia.

Please cite this article as follows (APA 6): Rosales, C., Brenes, J., Salas, K., Arce-Solano, S., & Abdelnour-Esquivel, A. (2018). Micropropagation of *Stevia rebaudiana* in temporary immersion systems as an alternative horticultural production method. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 24(1), 69-84. doi: 10.5154/r.rchsh.2017.08.028

Received: August 03, 2017/ Accepted: October 17, 2017.



Revista Chapingo
Serie Horticultura

www.chapingo.mx/revistas/horticultura

Introduction

Stevia rebaudiana, known as the sweet herb of the family Asteraceae, produces a natural sweetener in its leaves due to the presence of steviol glycosides (stevioside and rebaudioside) that account for 10 to 20 % of the leaf's dry weight (Shivanna, Mahadev, Khanum, & Kaul, 2013). In addition to being a calorie-free sweetener, the medicinal use of steviol glycosides as a hypoglycemic agent, antibiotic, antioxidant, renal protector and skin care product has been documented (Shivanna et al., 2013; Thiagarajan & Venkatachalam, 2012). In veterinary medicine, leaves are used in animal feeds to improve their development (Atteh et al., 2011).

Among the most used stevia cultivars are 'Morita II' and 'Silvestre', both with sweet characteristics. The former has about 10 to 12 % rebaudioside "A" and 2 to 4 % steviol glycosides, which gives the plant a softer and sweeter taste than other species. In 'Silvestre' the leaves have 12 % steviol glycoside yields (Thiagarajan & Venkatachalam, 2012).

There is a high worldwide demand for stevia raw material for use in the treatment of mainly obesity and diabetes. Therefore, it is necessary to have a methodology that allows increasing its multiplication rate for commercial production, since the planting density in the field is approximately 70,000 plants·ha⁻¹ (Casaccia & Álvarez, 2006). Although there are different ways to propagate the species, the process of reproduction by seed is not viable due to its low germination percentages and the high variability of the results (Alvarenga-Venutolo & Salazar-Aguilar, 2015; Goettemoeller & Ching, 1999).

Another method is asexual reproduction, which is effective, cheap and produces homogeneous material that preserves the characteristics of the mother plant (Vilchez & Albany, 2014). However, if mass propagation is required, the use of *in vitro* tissue culture is recommended, since it allows plants to be regenerated on a larger scale by embryogenesis or organogenesis, but the production cost is higher and requires intensive manual labor (Ziv, 2005).

On the other hand, liquid media reduce production costs by not using gelling agent in the multiplication protocols (Cabrera-Jova et al., 2008). In many species, greater propagule production has been reported with the use of liquid media, since in this system the explants are in direct contact with the culture medium, which makes the taking of nutrients more effective by the explant (Berthouly & Etienne, 2005; Preil, 2005; Watt, 2012).

Among the *in vitro* propagation techniques, temporary immersion systems (TIS) allow overcoming the

Introducción

Stevia rebaudiana, conocida como hierba dulce de la familia Asteraceae, produce en las hojas un edulcorante natural por la presencia de glicósidos de esteviol (esteviósido y rebaudiósido) que constituyen de 10 a 20 % del peso seco de la hoja (Shivanna, Mahadev, Khanum, & Kaul, 2013). Además de ser un edulcorante sin calorías, se ha documentado el uso medicinal de los esteviósidos como hipoglucémicos, antibióticos, antioxidantes, protector renal y para el cuidado de la piel (Shivanna et al., 2013; Thiagarajan & Venkatachalam, 2012). En veterinaria, se emplean hojas en la alimentación de animales para mejorar su desarrollo (Atteh et al., 2011).

Dentro de los cultivares de stevia más utilizados destacan 'Morita II' y 'Silvestre'; ambos con características dulces. El primero presenta cerca de 10 a 12 % de rebaudiósidos "A" y de 2 a 4 % de esteviósidos, lo que le proporciona a la planta un sabor más suave y dulce que otras especies. En 'Silvestre' las hojas presentan rendimientos de 12 % de glicósidos de esteviol (Thiagarajan & Venkatachalam, 2012).

Existe una demanda alta a nivel mundial de material en crudo de stevia por su uso para el tratamiento de obesidad y de diabetes, principalmente. Por ello, es necesario contar con una metodología que permita incrementar su tasa de multiplicación para producción comercial, ya que la densidad de siembra en campo es de aproximadamente 70,000 plantas·ha⁻¹ (Casaccia & Álvarez, 2006). Aunque existen diversas formas de propagar la especie, el proceso de reproducción por semilla no es viable debido a los bajos porcentajes de germinación que presenta y a la alta variabilidad de los resultados (Alvarenga-Venutolo & Salazar-Aguilar, 2015; Goettemoeller & Ching, 1999).

Otro método es la reproducción asexual, el cual es efectivo, barato y produce material homogéneo que conserva las características de la planta madre (Vilchez & Albany, 2014). Sin embargo, si se requiere la propagación masiva se recomienda el empleo de cultivo *in vitro* de tejidos, ya que permite regenerar plantas a mayor escala por embriogénesis u organogénesis, pero el costo de producción es más alto y requiere una intensa labor manual (Ziv, 2005).

Por otro lado, los medios líquidos reducen los costos de producción al no utilizar el agente gelificante en los protocolos de multiplicación (Cabrera-Jova et al., 2008). En muchas especies se ha reportado mayor producción de propágulos con el uso de medios líquidos, ya que en este sistema los explantes están en contacto directo con el medio de cultivo, lo que hace que la toma de nutrientes sea más efectiva por parte del explante (Berthouly & Etienne, 2005; Preil, 2005; Watt, 2012).

limitations of the methods described above, because they are semi-automated (Ziv, 2005). These systems are based on the contact of the explants with the liquid culture medium for short periods of time and the renewal of the gaseous atmosphere to avoid the hyperhydricity of the tissues and the accumulation of toxic gases (Basail-Pérez et al., 2012).

It has been documented that the longer contact time, between the micro-cuttings and the culture medium, increases the supply of nutrients and growth regulators to the explants (Santos-Pino et al., 2011), which can maximize their development (Preil, 2005). In addition, with each immersion, the environment of the culture container is renewed in order to eliminate volatile compounds, such as ethylene (Roels et al., 2006), and promote the recirculation of carbon dioxide necessary for photosynthesis, further improving the autotrophic metabolism of the carbon in the leaves (Aragón et al., 2014).

Some researchers point out that, from a commercial point of view, conventional micropropagation has ceased to be an economically efficient process; in addition, they agree that the root cause is the use of gelling agents as supports for the explants and the high number of manual operations, which imply a high labor cost (Quiala et al., 2012). Based on these considerations, the present study aimed to scale up the *in vitro* production of two *Stevia rebaudiana* cultivars using RITA®, BIT® and SETIS®, and to evaluate their biomass production in the field.

Materials and methods

Plant material

Two *Stevia rebaudiana* cultivars were used: 'Morita II' and 'Silvestre'. The former was a donation from the Centro de Productos Bióticos of the Instituto Politécnico Nacional, Yautepec, Morelos, Mexico. The latter was acquired in a nursery in the Costa Rican Central Valley. Both cultivars were worked with in the greenhouse of the Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) at the Instituto Tecnológico de Costa Rica. These materials were used as mother plants for micropropagation due to their quality and health.

Although both stevia cultivars have sweet characteristics, there are physical and chemical differences between them (Figure 1). 'Morita II' has oval, light green leaves, grows better in tropical climate areas and is more demanding in terms of crop management. On the other hand, 'Silvestre' has elongated, serrated leaves and shades of darker green and adapts to different agro-environmental conditions (Thiyagarajan & Venkatachalam, 2012).

Entre las técnicas de propagación *in vitro*, los sistemas de inmersión temporal (SIT) permiten superar las limitaciones de los métodos antes descritos, debido a que son semi-automatizados (Ziv, 2005). Dichos sistemas se basan en el contacto de los explantes con el medio de cultivo líquido por cortos períodos de tiempo y la renovación de la atmósfera gaseosa para evitar la hiperhidricidad de los tejidos y la acumulación de gases tóxicos (Basail-Pérez et al., 2012).

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).

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). Con base en estas consideraciones, el presente estudio tuvo como objetivos escalar la producción *in vitro* de dos cultivares de *Stevia rebaudiana* utilizando RITA®, BIT® y SETIS®, y evaluar su producción de biomasa en campo.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se utilizaron dos cultivares de *Stevia rebaudiana*: 'Morita II' y 'Silvestre'. El primero fue una donación del Centro de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional, Yautepec, Morelos, México. En segundo se adquirió en un vivero del Valle Central de Costa Rica. Ambos cultivares se trabajaron en el invernadero del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Estos materiales se utilizaron como plantas madre para la micropropagación debido a su calidad y sanidad.

Aunque ambos cultivares de stevia tienen características dulces, existen diferencias físicas y químicas entre ellas (Figura 1). 'Morita II' presenta hojas ovaladas, color verde claro, crece mejor en zonas de clima tropical y es más exigente en cuanto al manejo del cultivo. Por otra parte, 'Silvestre' tiene hojas alargadas y dentadas, tonalidades de verde más oscuro y se adapta a

Introduction and multiplication

For its *in vitro* propagation, nodal segments containing axillary shoots (2 to 3 cm) of the mother plants were used as explants. For this, the explants were washed with water and antibacterial soap, then immersed in a solution of Agrimycin® (5 g·L⁻¹) and Benlate® (5 g·L⁻¹) for 60 min. After this period, they were disinfected with calcium hypochlorite (1.8 % i.a.) for 10 min and taken to the laminar flow transfer chamber.

Under aseptic conditions, calcium hypochlorite was removed and three washes were performed with sterile distilled water. Finally, the explants were placed in a sterile solution with antioxidants (citric acid and ascorbic acid, 100 g·L⁻¹ of each one) before being placed in the culture medium (Gerber®-type flasks of 5.5 x 5.5 cm). The material was multiplied every three or four weeks by passing each explant to a test tube (14 x 2.2 cm) with 10 mL of fresh semi-solid medium containing the base medium described by Murashige and Skoog (1962) enriched with 30 g·L⁻¹ sucrose, 2 mg·L⁻¹ calcium pantothenate (CaPa) and 0.5 mg·L⁻¹ gibberellic acid (GA₃).

Liquid medium test

For growth in liquid medium, a medium test was carried out using the RITA® TIS (Alvard, Cote, & Teisson, 1993) with 200 mL of culture medium. For this test the cultivar 'Morita II' was used with one month of *in vitro* subculture. Each RITA® was inoculated at a density of 10 mL per explant. Different concentrations of sucrose, kinetin (K, as growth regulator) and a microbiological suppressant (methylisothiazolone [2-methyl-4-isothiazolin-3-one, MIT] and methylchloroisothiazolinone [5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one, CIT], Chemical Reagents Gamma, Laboratorios ARVI S.A.) were added to the base medium (Table 1). Each trial was performed in triplicate and evaluated after three weeks. The variables studied were elongation (cm), greenhouse survival and morphological response of the plant to each culture medium (number of leaves and number of shoots).

Temporary immersion systems

For the massive propagation of stevia, three TIS were evaluated: RITA® (Alvard et al., 1993), BIT® (Escalona et al., 1999a) and SETIS® (Duchefa Biochemie B.V.) (Figure 2). The BIT® system consists of two 2-L culture flasks, one where the explants were placed and the other as a reservoir for the culture medium to be used. The flasks are connected to each other by a hose that goes from the lid to the bottom of the container, which allows the recirculation of the culture medium from one flask to another. In the container lid there is a hydrophobic filter (0.22 µm) to ensure the sterilization of the incoming air. In general, the BIT system is easy



Figure 1. Leaves of two *Stevia rebaudiana* cultivars: A) Morita II and B) Silvestre.

Figura 1. Hojas de dos cultivares de *Stevia rebaudiana*: A) Morita II y B) Silvestre.

diferentes condiciones agroambientales (Thiyagarajan & Venkatachalam, 2012).

Introducción y multiplicación

Para su propagación *in vitro*, se utilizaron como explantes segmentos nodales que contenía brotes axilares (2 a 3 cm) de las plantas madres. Para ello, los explantes se lavaron con agua y jabón antibacterial, luego se sumergieron en una solución de Agrimycin® (5 g·L⁻¹) y Benlate® (5 g·L⁻¹) por 60 min. Pasado este período, se desinfectaron con hipoclorito de calcio (1.8 % i.a.) durante 10 min y se llevaron a la cámara de transferencia de flujo laminar.

En condiciones asépticas, se eliminó el hipoclorito de calcio y se realizaron tres lavados con agua destilada estéril. Por último, los explantes se colocaron en una solución estéril con antioxidantes (ácido cítrico y ácido ascórbico, 100 g·L⁻¹ de cada uno) antes de colocarse en el medio de cultivo (frascos tipo Gerber® de 5.5 x 5.5 cm). El material se multiplicó cada tres o cuatro semanas pasando cada explante a un tubo de ensayo (14 x 2.2 cm) con 10 mL de medio semi-sólido fresco que contenía el medio base descrito por Murashige y Skoog (1962) enriquecido con 30 g·L⁻¹ de sacarosa, 2 mg·L⁻¹ de pantotenato de calcio (PACA) y 0.5 mg·L⁻¹ de ácido giberélico (AG₃).

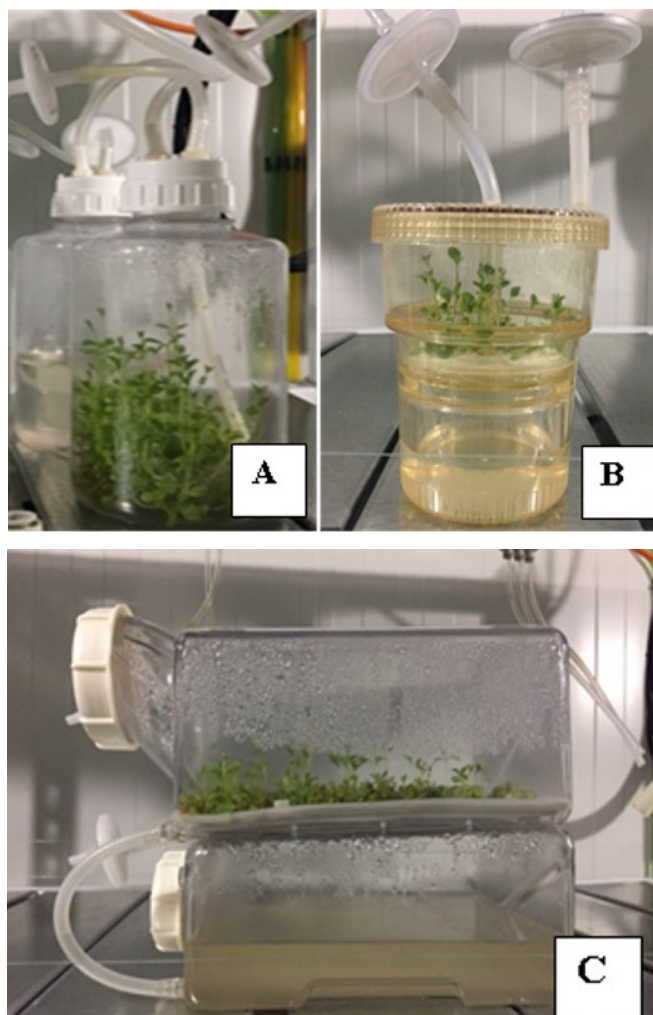


Figure 2. Temporary immersion systems evaluated:
A) BIT®, B) RITA® and C) SETIS®.

Figura 2. Sistemas de inmersión temporal evaluados:
A) BIT®, B) RITA® y C) SETIS®.

to operate and build, and it can be maintained for long periods allowing good ventilation and explant contact with the culture medium (Georgiev, Schumann, Pavlov, & Bley, 2014).

Prueba de medios líquidos

Para el crecimiento en medio líquido, se realizó una prueba de medios utilizando el SIT RITA® (Alvard, Cote, & Teisson, 1993) con 200 mL de medio de cultivo. Para esta prueba se utilizó el cultivar 'Morita II' con un mes de subcultivo *in vitro*. Cada RITA® se inoculó a una densidad de 10 mL por explante. Al medio base se le adicionaron diferentes concentraciones de sacarosa, kinetina (K, como regulador de crecimiento) y un supresor microbiológico (methylisothiazolone [2-methyl-4-isothiazolin-3-one, MIT] y methylchloroisothiazolinone [5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one, CIT], reactivos químicos Gamma, Laboratorios ARVI S.A.) (Cuadro 1). Cada ensayo se realizó por triplicado y se evaluaron después de tres semanas. Las variables estudiadas fueron elongación (cm), sobrevivencia en invernadero y respuesta morfológica de la planta ante cada medio de cultivo (cantidad de hojas y número de brotes).

Sistemas de inmersión temporal

Para la propagación masiva de stevia se evaluaron tres SIT: RITA® (Alvard et al., 1993), BIT® (Escalona et al., 1999a) y SETIS® (Duchefa Biochemie B.V.) (Figura 2). El sistema BIT® consiste en dos frascos de cultivo de 2 L de capacidad, uno donde se colocaron los explantes y el otro como reservorio para el medio de cultivo a utilizar. Los frascos se conectan entre sí por una manguera que va desde la tapa hasta el fondo del recipiente, lo cual permite la recirculación del medio de cultivo de un frasco a otro. En la tapa del recipiente hay un filtro hidrofóbico (0.22 μm) para garantizar la esterilización del aire de entrada. En general, el sistema BIT es fácil de operar y construir, se puede mantener por largos períodos permitiendo una buena ventilación y el contacto de los explantes con el medio de cultivo (Georgiev, Schumann, Pavlov, & Bley, 2014).

Por otra parte, RITA® consiste en un solo recipiente de polisulfona con capacidad máxima de 500 mL. En la

Table 1. Composition of culture media for preliminary tests in RITA® temporary immersion systems.

Cuadro 1. Composición de los medios de cultivo para las pruebas preliminares en los sistemas de inmersión temporal RITA®.

Culture medium/ Medio de cultivo	Sucrose concentration ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)/ Concentración de sacarosa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Microbial suppressant ($1\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$)/ Supresor microbiano ($1\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$)	Kinetin ($1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)/ Kinetina ($1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	30	No	No
2	40	No	No
3	30	Sí	No
4	30	No	Sí
5	30	Sí	Sí

On the other hand, RITA® consists of a single polysulfone container with a maximum capacity of 500 mL. The lid has two holes with a hose; in one of the holes there is a hydrophobic filter (0.22 µm) attached and in the other an air opening and closing valve. A mesh is placed inside the container where the explants are established.

The SETIS® system consists of two horizontal containers, coupled one on top of the other with a capacity of 3 L. Each one has an 80-mm opening with silicone gaskets and screw caps; they are connected to each other by a hose at the bottom of the container. At their upper ends, an orifice connected to a filter allows the entry of sterile air.

The three TIS were connected to solenoid valves, which allow the entry or not of air, and these to a programmable timer with which the immersion frequency and time are defined, given the regulation by a manometer.

All systems were operated at half capacity, at a density of 10 mL per explant (Alvarenga-Venutolo & Salazar-Aguilar, 2015). The material maintained *in vitro* was inoculated with one month of subculture, for which explants of 0.5 to 1 cm in length (no apical buds) were introduced.

The culture conditions of each system are detailed in Table 2. The immersion time and frequency were run with the program already established in the laboratories of the *Centro Nacional de Innovaciones*

tapa tiene dos orificios con manguera; en uno de ellos se acopla un filtro hidrofóbico (0.22 µm) y en el otro una válvula de apertura y cierre de aire. En el interior del recipiente se coloca una malla donde se establecen los explantes.

El sistema SETIS® consta de dos recipientes horizontales acoplados uno sobre el otro con una capacidad de 3 L. Cada uno presenta una abertura de 80 mm con empaques de silicón y tapas de rosca, se conectan entre sí por una manguera en la parte inferior del recipiente. En sus extremos superiores, un orificio conectado a un filtro permite la entrada de aire estéril.

Los tres SIT se conectaron a electroválvulas, que permiten la entrada o no de aire, y éstas a un temporizador programable con el cual se define la frecuencia y tiempo de inmersión, dada la regulación por un manómetro.

En todos los sistemas se trabajó con la mitad de la capacidad, a una densidad de 10 mL por explante (Alvarenga-Venutolo & Salazar-Aguilar, 2015). El material mantenido *in vitro* se inoculó con un mes de subcultivado, para ello se introdujeron explantes de 0.5 a 1 cm de longitud (no brotes apicales).

En el Cuadro 2 se detallan las condiciones de cultivo de cada sistema. El tiempo y la frecuencia de inmersión se trabajaron con el programa ya establecido en los laboratorios del Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot-CENAT), San José, Costa Rica, donde se realizaron estos ensayos.

Table 2. Culture conditions in the different temporary immersion systems evaluated.

Cuadro 2. Condiciones de cultivo en los diferentes sistemas de inmersión temporal evaluados.

	RITA®	BIT®	SETIS®
Maximum capacity (L)/Capacidad máxima (L)	0.500	2	3
Work volume (L)/Volumen de trabajo (L)	0.200	1	1.5
Number of explants/Número de explantes	20	100	150
Volume of medium per explant (mL)/ Volumen del medio por explante (mL)	10	10	10
Filling time (s)/Tiempo de llenado (s)	30	100	90
Immersion time (min)/Tiempo de inmersión (min)	2	2	2
Emptying time (s)/Tiempo de vaciado (s)	0	170	135
Air flow (L·min ⁻¹)/Flujo de aire (L·min ⁻¹)	10	15	18
Immersion frequency (h)/ Frecuencia de inmersión (h)	12	12	12

Each system was evaluated in triplicate for each cultivar of *Stevia rebaudiana*: 'Morita II' and 'Silvestre'.

Cada sistema se evaluó por triplicado para cada cultivar de *Stevia rebaudiana*: 'Morita II' y 'Silvestre'.

Biotechnológicas (CENIBiot-CENAT), San José, Costa Rica, where these tests were carried out.

Evaluation of plants obtained in temporary immersion systems

After one month of cultivation in the different systems, the plant material was removed and in each treatment the number of shoots and elongation (cm) per explant were evaluated considering that all the explants had 10 mL of medium and the same immersion time (2 min).

Acclimatization in greenhouse

Immediately after the plants obtained from the TIS were evaluated, they were taken to a greenhouse and cultivated in humidity chambers constructed with disposable cups. The substrate used was soil and rice husk (60:40), and three drops of a rooting solution (5 mg·L⁻¹ indolbutyric acid) were added before sowing. At the end of the acclimatization period, the survival percentage of the plants was measured based on the TIS used.

Material handling in the field

After a month of greenhouse cultivation, when the plants reached 10 to 15 cm in length, they were transported to the field. Field planting was carried out in conjunction with commercial farmers in the area of San Ramón de la Virgen de Sarapiquí, Costa Rica (10° 21' 16.9" North latitude and 84° 07' 00.79" West latitude, 200-400 masl). The zone has soil described as Inceptisol Dystrandep, with temperatures of 24 to 30 °C and annual precipitation of 5,000 mm.

In the field, the spacing between plants and rows was 30 and 80 cm, respectively, which resulted in a density of 65,000 plants·ha⁻¹. At the time of planting, the material was fertilized with organic fertilizer (cattle manure, 100 g·plant⁻¹); after eight days an application of the NPK formula (10:30:10, 5 g·plant⁻¹) was made, and after two months a second application of organic fertilizer was made. Additionally, 2 mL·L⁻¹ foliar fertilizer (Nitrofoska®) and 2 mL·L⁻¹ low potassium humic acids (Agroroots® 10-30-10) were applied.

Fifteen days after transplanting, the survival percentage was evaluated, and after three months the biomass was harvested 15 cm from the soil (aerial part) to allow the plant to re-sprout. In total, samples of 10 plants were collected by cultivating stevia (in triplicate) of the same age and origin. Subsequently, the biomass produced (stems and leaves) was determined based on fresh weight and dry weight.

Evaluación de las plantas obtenidas en los sistemas de inmersión temporal

Después de un mes de cultivo en los diferentes sistemas, se retiró el material vegetal y en cada tratamiento se evaluó número de brotes y elongación (cm) por explante considerando que todos los explantes dispusieron de 10 mL de medio y el mismo tiempo de inmersión (2 min).

Aclimatación en invernadero

Inmediatamente después de la evaluación de las plantas obtenidas de los SIT, éstas se llevaron a invernadero y se cultivaron en cámaras de humedad construidas con vasos desechables. El sustrato empleado fue tierra y granza de arroz (60:40), y antes de la siembra se le agregaron tres gotas de una solución enraizadora (5 mg·L⁻¹ de ácido indolbutírico). Al finalizar el período de aclimatación, se midió el porcentaje de sobrevivencia de las plantas con base en el SIT de proveniencia.

Manejo de material en campo

Después de un mes del cultivo en invernadero, cuando las plantas alcanzaron de 10 a 15 cm de longitud, se procedió al traslado a campo. La siembra en campo se trabajó en conjunto con agricultores comercializadores de la zona de San Ramón de la Virgen de Sarapiquí, Costa Rica (10° 21' 16.9" latitud norte y 84° 07' 00.79" latitud oeste, de 200 a 400 msnm). La zona presenta suelo descrito como Inceptisol Dystrandep, temperaturas de 24 a 30 °C y precipitación anual de 5,000 mm.

En el campo, la distancia entre plantas e hileras fue de 30 y 80 cm, respectivamente; lo que resultó en una densidad de 65,000 plantas·ha⁻¹. Al momento de la siembra el material se fertilizó con abono orgánico (estiércol de ganado vacuno, 100 g·planta⁻¹); a los ocho días se hizo una aplicación de la fórmula NPK (10:30:10, 5 g·planta⁻¹), y a los dos meses se realizó una segunda aplicación de abono orgánico. Adicionalmente, se aplicaron 2 mL·L⁻¹ abono foliar (Nitrofoska®) y 2 mL·L⁻¹ de ácidos húmicos bajos en potasio (Agroroots® 10-30-10).

Al cabo de 15 días del trasplante se evaluó el porcentaje de sobrevivencia, y a los tres meses se cosechó la biomasa a 15 cm del suelo (parte aérea) para permitirle a la planta rebrotar. En total se recolectaron muestras de 10 plantas por cultivar de stevia (por triplicado) de la misma edad y procedencia. Posteriormente, se determinó la biomasa producida (tallos y hojas) con base en el peso fresco y peso seco.

Statistical analysis

The Minitab 17 program (2010), with the Kruskal-Wallis test ($P \leq 0.05$), was used for the statistical analysis and comparison of means of the TIS results. The data obtained in the field were analyzed statistically with the Infostat program (di Rienzo et al., 2017) and a one-way analysis of variance was performed ($P \leq 0.05$).

Results and discussion

Introduction and multiplication of *in vitro* material

The axillary buds proliferated after two to three weeks of culture in the base medium. Some researchers have enriched the medium with kinetin to increase the number of shoots, but at a very low concentration (Espinal-de Rueda, Delvalle, Cifuentes, & Ramia, 2006); however, like Alvarenga-Venutolo and Salazar-Aguilar (2015), in this study GA_3 was used as the sole growth regulator. GA_3 induces a wide variety of physiological effects, including stem elongation due to the activation of intercalary meristems (George, Hall, & de Klerk, 2008). The results obtained seem to confirm this effect, since the plants showed rapid vertical growth, taking advantage of the cultivation space. This characteristic is evident when changing the container (from flask to test tube) during the multiplication, observing greater shoot elongation and thickness. These results could be explained based on the height of the test tube, which allowed the plants to direct their growth vertically, since the culture medium was the same in both cases. These results agree with those observed by Sánchez-Chiang and Jiménez (2010), who recommend selecting the container depending on the subculture frequency and time.

Liquid medium test

Regarding the culture media evaluated using RITA®, significant statistical differences were observed among the media ($P \leq 0.002$). Culture medium 1 (base medium, 30 g·L⁻¹ sucrose, without microbial suppressant and without cytokinin) allowed for greater elongation of the explants, followed by medium 3 (same as above but with 1 mL·L⁻¹ suppressant) (Figure 3). However, when the plants obtained *in vitro* were taken to the greenhouse, those from medium 3 had a higher survival percentage during acclimatization (92 %) than those from medium 1 (80 %), which presented the best growth *in vitro* (Figure 4). In addition, it was observed that the microbial suppressant allowed maintaining low bacterial contamination levels throughout the micropropagation process, which, according to the results, was an advantage when it came to taking the plants to the greenhouse.

The microbial suppressant was used because in both *Stevia rebaudiana* materials a gram-negative endogenous

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico y la comparación de medias de los resultados de los SIT se utilizó el programa Minitab 17 (2010), con la prueba Kruskal-Wallis ($P \leq 0.05$). Los datos obtenidos en campo se analizaron estadísticamente con el programa Infostat (di Rienzo et al., 2017) y se realizó un análisis de varianza de una vía ($P \leq 0.05$).

Resultados y discusión

Introducción y multiplicación del material *in vitro*

Los brotes axilares proliferaron después de dos a tres semanas de su cultivo en el medio base. Algunos investigadores han enriquecido el medio con kinetina para incrementar el número de brotes, pero en muy baja concentración (Espinal-de Rueda, Delvalle, Cifuentes, & Ramia, 2006); sin embargo, al igual que Alvarenga-Venutolo y Salazar-Aguilar (2015), en este estudio se utilizó GA_3 como único regulador de crecimiento. El GA_3 induce una gran variedad de efectos fisiológicos, entre ellos la elongación de tallos debido a la activación de los meristemos intercalares (George, Hall, & de Klerk, 2008). Los resultados obtenidos parecen confirmar este efecto, ya que las plantas presentaron rápido crecimiento vertical, tomando ventaja del espacio de cultivo. Esta característica es evidente al cambiar de recipiente (de frasco a tubo de ensayo) durante la multiplicación, observándose una mayor elongación y grosor de los brotes. Dichos resultados podrían explicarse con base en la altura del tubo de ensayo, lo que les permitió a las plantas direccionar su crecimiento verticalmente, ya que el medio de cultivo fue igual en ambos casos. Estos resultados concuerdan con los observados por Sánchez-Chiang y Jiménez (2010), quienes recomiendan seleccionar el recipiente dependiendo de la frecuencia y tiempo de subcultivo.

Prueba de medios líquidos

En cuanto a los medios de cultivo evaluados utilizando RITA®, se observaron diferencias estadísticas significativas entre los medios ($P \leq 0.002$). El medio de cultivo 1 (medio base, 30 g·L⁻¹ de sacarosa, sin supresor microbiano y sin citoquinina) permitió la mayor elongación de los explantes, seguido por el medio 3 (igual al anterior pero con 1 mL·L⁻¹ de supresor) (Figura 3). No obstante, cuando las plantas obtenidas *in vitro* se llevaron al invernadero, las provenientes del medio 3 presentaron mayor porcentaje de sobrevivencia durante la aclimatación (92 %) que las del medio 1 (80 %), que presentó el mejor crecimiento *in vitro* (Figura 4). Además, se pudo observar que el supresor microbiano permitió mantener niveles bajos de contaminación bacteriana durante todo el proceso de micropropagación,

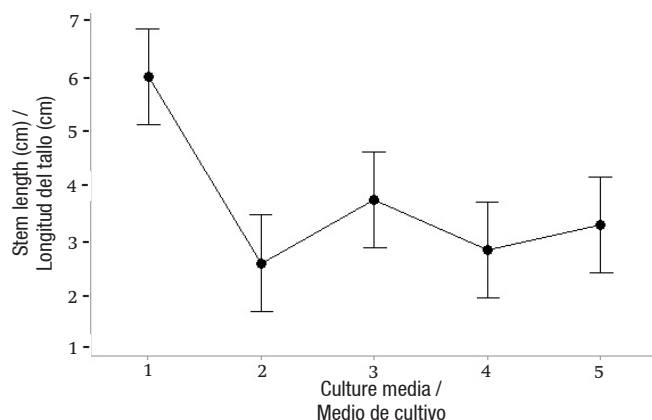


Figure 3. Effect of the culture medium (sucrose, calcium pantothenate and gibberellic acid; Murashige & Skoog, 1962) on stem length of explants of *Stevia rebaudiana* cv. 'Morita II'. Medium 1: 30 g·L⁻¹ sucrose; medium 2: 40 g·L⁻¹ sucrose; medium 3: 30 g·L⁻¹ sucrose + microbial suppressant; medium 4: 30 g·L⁻¹ sucrose + kinetin; medium 5: 30 g·L⁻¹ sucrose + suppressant + kinetin.

Figura 3. Efecto del medio de cultivo (sacarosa, pantotenato de calcio y ácido giberélico; Murashige & Skoog, 1962) en la longitud del tallo de explantes de *Stevia rebaudiana* cv. 'Morita II'.

Medio 1: 30 g·L⁻¹ de sacarosa; medio 2: 40 g·L⁻¹ de sacarosa; medio 3: 30 g·L⁻¹ de sacarosa + supresor microbiano; medio 4: 30 g·L⁻¹ de sacarosa + kinetina; medio 5: 30 g·L⁻¹ de sacarosa + supresor + kinetina.

bacterium appeared in the third week, identified by DNA sequencing as *Burkholderia fungorum* (data not shown). This suppressant delays the appearance of contaminants in the *in vitro* culture, which allows not discarding a large amount of plant material and being able to take more plants to the greenhouse.

Bacteria are the most common *in vitro* contaminants and cause serious problems, and are also difficult to detect and eliminate (Orlikowska, Nowak, & Reed, 2017). Their distribution can be localized or systemic, by xylem or phloem, and they usually do not manifest themselves in the first subcultures, since the high osmotic pressure, pH and certain hormones of the culture media can inhibit their growth. Due to these inhibitory factors, many microorganisms require a period of adaptation to the new conditions before manifesting their presence, which usually occurs in the multiplication phase (Hernández & González, 2010).

The results of this study show that *Stevia rebaudiana* is not a demanding plant in terms of culture medium, since the base medium enriched with 2 mg·L⁻¹ CaPa and 0.5 mg·L⁻¹ GA₃ allowed micropropagation of the explants, which coincides with the findings reported

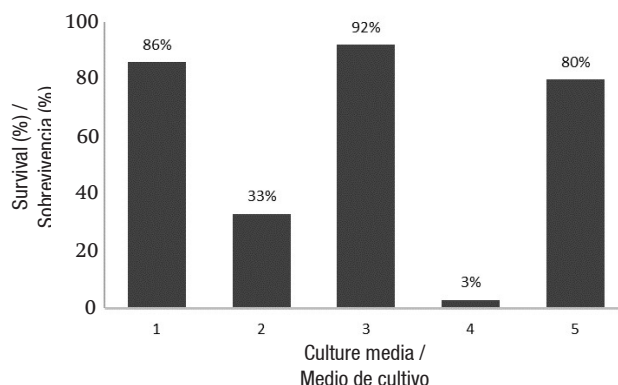


Figure 4. Survival percentages of seedlings of *Stevia rebaudiana* cv. 'Morita II' in the greenhouse.

Medium 1: 30 g·L⁻¹ sucrose, medium 2: 40 g·L⁻¹ sucrose, medium 3: 30 g·L⁻¹ sucrose + microbial suppressant, medium 4: 30 g·L⁻¹ sucrose + kinetin and medium 5: 30 g·L⁻¹ sucrose + suppressant + kinetin.

Figura 4. Porcentajes de sobrevivencia de plántulas de *Stevia rebaudiana* cv. 'Morita II' en el invernadero.

Medio 1: 30 g·L⁻¹ de sacarosa, medio 2: 40 g·L⁻¹ de sacarosa, medio 3: 30 g·L⁻¹ de sacarosa + supresor microbiano, medio 4: 30 g·L⁻¹ de sacarosa + kinetina y medio 5: 30 g·L⁻¹ de sacarosa + supresor + kinetina.

lo que de acuerdo con los resultados fue una ventaja a la hora de llevar las plantas al invernadero.

El supresor microbiano se utilizó debido a que en ambos materiales de *Stevia rebaudiana* apareció una bacteria endógena gram negativa en la tercera semana, identificada por secuenciación de ADN como *Burkholderia fungorum* (datos no mostrados). Este supresor sirve para retrasar la aparición de contaminantes en el cultivo *in vitro*, lo que permite no desechar gran cantidad de material vegetal y poder llevar más plantas al invernadero.

Las bacterias son los contaminantes *in vitro* más comunes y ocasionan serios problemas, además de ser difíciles de detectar y eliminar (Orlikowska, Nowak, & Reed, 2017). Su distribución puede ser localizada o sistémica, por xilema o floema, y 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).

Los resultados de este estudio muestran que *Stevia rebaudiana* no es una planta exigente en cuanto al



Figure 5. *Stevia rebaudiana* seedlings obtained from the culture medium with kinetin added.

Figura 5. Plántulas de *Stevia rebaudiana* obtenidas del medio de cultivo adicionado con kinetina.

by Alvarenga-Venutolo and Salazar-Aguilar (2015). However, these results are contrary to those obtained by Sivaram and Mukundan (2003), who found the highest multiplication and growth rates using cytokinins and auxins in the culture medium. In the present study, the addition of kinetin to the culture medium caused heterogeneous growth (in rosette, hyperhydrated explants, glassy and translucent appearance of both the stems and leaves) (Figure 5), being characteristic of this growth regulator when found in high concentrations (George et al., 2008).

Temporary immersion systems

All treatments evaluated in the TIS (BIT®, SETIS® y RITA®) produced vigorous plants with low levels of hyperhydricity, a higher average number of leaves and shoots, and, in general, a higher rate of multiplication than those explants cultured in semi-solid medium.

The TIS are automated systems that base their operation on the contact of the culture medium with the explants at regular time intervals and the pumping of clean air through a filter. This method allows excess liquid in the explants to be drained by gravity at the end of the pumping and they are kept moist (Santos-Pino et al., 2011; Steinmacher, Guerra, Saare-Surminski, & Lieberei, 2011). The air flow is regulated by electronic timers that control the immersion frequency and times, and solenoid valves that allow the system to turn on or off.

medio de cultivo, ya que el medio base enriquecido con 2 mg·L⁻¹ de PACA y 0.5 mg·L⁻¹ AG₃ permitió la micropropagación de los explantes, lo que coincide con lo reportado por Alvarenga-Venutolo y Salazar-Aguilar (2015). Sin embargo, estos resultados son contrarios a los obtenidos por Sivaram y Mukundan (2003), quienes encontraron las mayores tasas de multiplicación y crecimiento utilizando citocininas y auxinas en el medio de cultivo. En el presente estudio, la adición de kinetina al medio de cultivo causó crecimiento heterogéneo (en roseta, explantes hiperhidratados, apariencia vidriosa y translúcida tanto de los tallos como de las hojas) (Figura 5), siendo característico de este regulador de crecimiento cuando se encuentra en concentraciones altas (George et al., 2008).

Sistemas de inmersión temporal

Todos los tratamientos evaluados en los SIT (BIT®, SETIS® y RITA®) produjeron plantas vigorosas con niveles bajos de hiperhidricidad, mayor número promedio de hojas y brotes, en general, una mayor tasa de multiplicación que aquellos explantes cultivados en medio semi-sólido.

Los SIT son sistemas automatizados que basan su funcionamiento en el contacto del medio de cultivo con los explantes por intervalos de tiempos regulares y el bombeo de aire limpio a través de un filtro. Este método permite que el exceso de líquido en los explantes se drene por gravedad al finalizar el bombeo y éstos se mantengan húmedos (Santos-Pino et al., 2011; Steinmacher, Guerra, Saare-Surminski, & Lieberei, 2011). El flujo de aire está regulado por temporizadores electrónicos que controlan la frecuencia y los tiempos de inmersión, y válvulas solenoides que permiten encender/apagar el sistema.

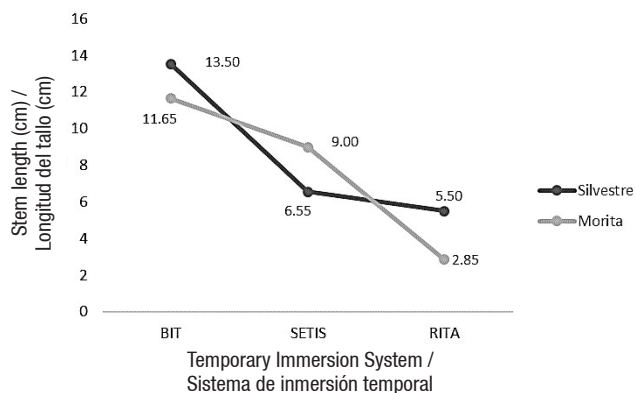


Figure 6. Stem length of two cultivars of *Stevia rebaudiana*, 'Morita II' and 'Silvestre', based on the temporary immersion systems evaluated.

Figura 6. Longitud del tallo de dos cultivares de *Stevia rebaudiana*: 'Morita II' y 'Silvestre', según los sistemas de inmersión temporal evaluados.

According to the comparison of means, 'Morita II' showed greater stem length in the plants grown in the BIT® system (11.65 cm), compared to SETIS® (9 cm) and RITA® (2.85 cm). Also, in 'Silvestre', the longest stem length was observed with BIT® (13.50 cm). In both cases, the differences were statistically significant ($P \leq 0.05$) (Figure 6).

In general, the composition of the gases in the culture vessel is influenced by the volume of the container, the volume of the medium and the ventilation (Georgiev et al., 2014). In TIS, the control of the gas phase depends on the volume of the container, the gases produced by the explants and the frequency of immersion through the air flow (Basail-Pérez et al., 2012). Additionally, Ziv (2005), by measuring the concentration of gases within TIS, showed that the concentration of O₂ and CO₂ in the culture container is as important.

The BIT container, which showed the best results in terms of plant elongation, presented a higher relative volume for the exchange and accumulation of gases. This is due to the fact that a vertical container is used, and the space between the explants and the upper part of the container is greater compared to that available in the other systems evaluated, allowing a greater availability of gases and space for the elongation of the explants (Figure 2).

Sprouting

In 'Morita II', the BIT® median was eight shoots per plant, whereas in SETIS® it was three shoots, with significant differences between the two systems evaluated ($P \leq 0.05$). For 'Silvestre', the number of shoots in both cases was two ($P = 0.42$). Both cultivars presented similar seedling elongation in BIT®; however, according to the sprouting results, 'Morita II' produces more shoots than 'Silvestre'.

These results seem to indicate that 'Silvestre' is more sensitive to the presence of GA₃, since it induces stem elongation (George et al., 2008). Similar results were reported by Escalona et al. (1999b), who observed that GA₃ promoted better shoot elongation and uniformity in pineapple (*Ananas comosus*).

According to Thiyagarajan and Venkatachalam (2012), the greater sprouting of stevia in solid medium is due to the use of growth regulators such as kinetin (0.5 mg·L⁻¹) and benzylaminopurine (1.0 mg·L⁻¹), achieving up to 85.7 % regeneration. The culture medium used in this research was only supplemented with GA₃, and in the initial medium tests the presence of cytokinins caused negative effects, so the results seem to indicate that the sprouting effect is due to the TIS. Vilchez and Albany (2014) attribute the increase in the number of guava shoots to the type of TIS evaluated (RITA® and BIT®).

De acuerdo con la comparación de medias, 'Morita II' mostró mayor longitud de tallo en las plantas cultivadas en el sistema BIT® (11.65 cm), comparado con SETIS® (9 cm) y RITA® (2.85 cm). Asimismo, en 'Silvestre' se observó la mayor longitud de tallo con BIT® (13.50 cm). En ambos casos las diferencias fueron estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) (Figura 6).

En general, la composición de los gases en el envase de cultivo está influenciada por el volumen del recipiente, el volumen del medio y la ventilación (Georgiev et al., 2014). En los SIT, el control de la fase gaseosa depende del volumen del recipiente, de los gases producidos por los explantes y de la frecuencia de inmersión por medio del flujo de aire (Basail-Pérez et al., 2012). Adicionalmente, Ziv (2005), al medir la concentración de gases dentro de los SIT, mostró que es tan importante la concentración de O₂ como de CO₂ en el recipiente de cultivo.

El recipiente BIT, que mostró los mejores resultados en elongación de las plantas, presentó mayor volumen relativo para el intercambio y acumulación de gases. Lo anterior debido a que se usa un recipiente vertical, y el espacio entre los explantes y la parte superior del recipiente es mayor en comparación con el disponible en los otros sistemas evaluados, permitiendo una mayor disponibilidad de gases y espacio para la elongación de los explantes (Figura 2).

Brotación

En 'Morita II', la mediana de BIT® fue ocho brotes por planta, mientras que en SETIS® fue de tres brotes, observándose diferencias significativas entre los dos sistemas evaluados ($P \leq 0.05$). Para 'Silvestre', el número de brotes en ambos casos fue de dos ($P = 0.42$). Ambos cultivares presentaron elongación similar de plántulas en BIT®; sin embargo, de acuerdo con los resultados de brotación, 'Morita II' produce más brotes que 'Silvestre'.

Estos resultados parecen indicar que 'Silvestre' es más sensible a la presencia del AG₃, ya que éste induce la elongación de tallos (George et al., 2008). Resultados similares fueron reportados por Escalona et al. (1999b), quienes observaron que el AG₃ promovió mejor elongación y uniformidad de brotes en piña (*Ananas comosus*).

De acuerdo con Thiyagarajan y Venkatachalam (2012), la mayor brotación de stevia en medio sólido se debe al uso de reguladores de crecimiento como kinetina (0.5 mg·L⁻¹) y bencilaminopurina (1.0 mg·L⁻¹), logrando hasta un 85.7 % de regeneración. El medio de cultivo utilizado en esta investigación solo se suplementó con AG₃, y en las pruebas iniciales de medios la presencia de citocininas causó efectos negativos, por lo que los

Immersion time and frequency

Immersion time and frequency are two key factors to achieve the highest multiplication coefficient and the best quality of plants. Although in this study they were not analyzed, the parameters used are recommended by certain researchers for magnophyte plants. Castro and González (2002) evaluated different immersion frequencies and times. In their case, the frequency of 12 h and 3 min of immersion showed a greater number of shoots in relation to lower frequencies and 1 min of immersion.

On the other hand, in banana cultivation under TIS, the immersion times were longer, since the morphology of the species is very different from that of stevia. In banana, immersion times of 5, 10 and 15 min were evaluated, demonstrating after 21 days that this significantly influenced all the evaluated variables, with 0 min being the time that allowed a higher multiplication coefficient, a larger pseudostem diameter and a lower degree of oxidation (Basail-Pérez et al., 2011).

At the end of this study, differences could be observed among the TIS evaluated, among which some advantages stand out, but there are also some disadvantages in terms of the use of the equipment, which can be useful for the search for improvements. The capacity of RITA® is lower compared to the other two systems evaluated, although its design allows easier introduction of the explants to the culture flask. On the other hand, the mesh where the explants are placed in both RITA® and SETIS® makes it difficult to recover the material if it has roots at the end of the multiplication period. The distribution of the culture medium is more homogeneous in RITA® and BIT®; however, the acquisition cost of BIT® is much lower. Vilchez and Albany (2014) report similar results.

Greenhouse acclimatization

After a month of cultivation in the TIS, the plants were taken to the greenhouse for acclimatization. It is important to mention that *in vitro* growth is heterotrophic and *in vivo* autotrophic. The *in vitro* atmosphere presents high relative humidity, low or no gas exchange, a CO₂ shortage during almost the entire period, ethylene production and low photosynthetic density, which induces disturbances in plants developed under these conditions.

The plants obtained *in vitro* have thin leaves, weak stems, weak and little functional roots, incomplete stem-root connection and a low photosynthetic rate (George et al., 2008). Therefore, acclimatization is an important factor in the subsequent survival of the plant, since it is a critical stage in the process and is where the greatest loss of plants occurs. It is

resultados parecen indicar que el efecto de la brotación se debe al SIT. Vilchez y Albany (2014) atribuyen el aumento del número de brotes de guayabo al tipo de SIT evaluado (RITA® y BIT®).

Tiempo y frecuencia de inmersión

El tiempo y frecuencia de inmersión son dos factores fundamentales para lograr el mayor coeficiente de multiplicación y la mejor calidad de plantas. Aunque en este estudio no se analizaron, los parámetros empleados son recomendados por ciertos investigadores para plantas magnófitas. Castro y González (2002) evaluaron diferentes frecuencias y tiempos de inmersión. En su caso, las frecuencias de 12 h y 3 min de inmersión mostraron mayor número de brotes en relación con frecuencias menores y 1 min de inmersión.

Por otra parte, en cultivo de plátano bajo SIT, los tiempos de inmersión fueron más prolongados, ya que la morfología de la especie es muy diferente a la de stevia. En plátano se evaluaron tiempos de inmersión de 5, 10 y 15 min, demostrando al cabo de 21 días que esto influyó significativamente en todas las variables evaluadas, siendo 10 min el tiempo que permitió mayor coeficiente de multiplicación, diámetro del pseudotallo y menor grado de oxidación (Basail-Pérez et al., 2011).

Al finalizar este estudio, se pudieron observar diferencias entre los SIT evaluados, entre los cuales se destacan algunas ventajas, pero también se mencionan desventajas en cuanto al uso del equipo, que pueden ser útiles para la búsqueda de mejoras. La capacidad de RITA® es menor en comparación con los otros dos sistemas evaluados, aunque su diseño permite mayor facilidad de introducción de los explantes al frasco de cultivo. Por otra parte, la malla donde se colocan los explantes tanto en RITA® como en SETIS® dificulta la recuperación del material si este presenta raíces al final del período de multiplicación. La distribución del medio de cultivo es más homogénea en RITA® y en BIT®; sin embargo, el costo de adquisición de BIT® es mucho menor. Vilchez y Albany (2014) reportan resultados similares.

Aclimatación en invernadero

Después de un mes de cultivo en los SIT, las plantas se llevaron al invernadero para su aclimatación. Es importante mencionar que el crecimiento *in vitro* es heterótrofo y el *in vivo* autótrofo. El ambiente *in vitro* presenta alta humedad relativa, bajo o nulo intercambio gaseoso, escasez de CO₂ durante casi todo el período, producción de etileno y baja densidad fotosintética, lo que induce perturbaciones en las plantas desarrolladas bajo esas condiciones.

Las plantas obtenidas *in vitro* tienen hojas delgadas, tallos débiles, raíces débiles y poco funcionales,

important to start the acclimatization process by gradually reducing the relative humidity to allow, in addition to stomatal closure, better cuticle formation and reduced water loss (Nava et al., 2011).

In this work, the highest plant mortality in the greenhouse occurred during the first acclimatization stage, due, in part, to the characteristics of the plants recently released from *in vitro* culture and the conditions of the greenhouse, whose infrastructure does not allow properly regulating relative humidity, temperature or luminosity. Another major constraint during this period was an attack by whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*), which was controlled with yellow chromatic traps and the insecticide Actara® (Tiametoxam), of which 2.5 mg·L⁻¹ were applied every 15 days. The high sugar content in this species makes it very attractive to these insects. Once past this first stage, the plants that survived were transferred to the field. The results of this stage obtained in this research seem to indicate that the initial acclimatization conditions were not the most appropriate for this species, and that in future tests attention must be paid to the conditions given in the initial greenhouse period.

For both cultivars, regardless of the TIS used, the greenhouse survival percentages were very similar (Figure 7), although low due to the aforementioned problems. Based on the results obtained, it can be deduced that the quality of the plants obtained *in vitro* is good and similar in both cultivars, and that the management of the newly sown plants in the greenhouse will determine the survival percentage.

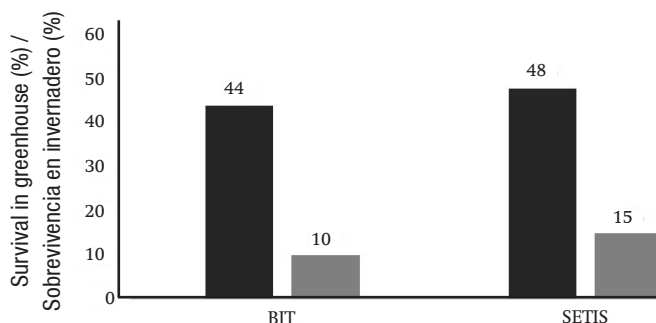


Figure 7. Survival of the *Stevia rebaudiana* seedlings from the BIT® and SETIS® temporary immersion systems after greenhouse acclimatization. First column corresponds to 'Morita II' and the second to 'Silvestre'.

Figura 7. Sobrevivencia de las plántulas de *Stevia rebaudiana* provenientes de los sistemas de inmersión temporal BIT® y SETIS® después de su aclimatación en invernadero. Primera columna corresponde a 'Morita II' y la segunda a 'Silvestre'.

conexión tallo-raíz incompleta y tasa fotosintética baja (George et al., 2008). Por ello, la aclimatación es un factor importante en la posterior supervivencia de la planta, ya que es una etapa crítica dentro del proceso y es en la que se produce la mayor pérdida de plantas. Es importante iniciar el proceso de aclimatación reduciendo gradualmente la humedad relativa para permitir, además del cierre estomático, una mejor formación de cutícula y disminuir la pérdida de agua (Nava et al., 2011).

En este trabajo, la mayor mortalidad de plantas en invernadero se presentó durante la primera etapa de aclimatación, debido, en parte, a las características que presentan las plantas recién salidas del cultivo *in vitro* y a las condiciones del invernadero, cuya infraestructura no permite regular apropiadamente la humedad relativa, temperatura ni luminosidad. Otra de las principales limitantes durante este periodo fue el ataque por mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*), que se controló con trampas cromáticas color amarillo y el insecticida Actara® (Tiametoxam), 2.5 mg·L⁻¹ cada 15 días. El contenido alto de azúcar en esta especie la hace muy atractiva para estos insectos. Una vez pasada esta primera etapa, las plantas que sobrevivieron llegaron hasta el traslado a campo. Los resultados de esta etapa obtenidos en esta investigación parecen indicar que las condiciones iniciales durante la aclimatación no fueron las más adecuadas para esta especie, y que en futuras pruebas se debe prestar atención a las condiciones dadas en el periodo inicial en invernadero.

Para ambos cultivares, sin importar el SIT utilizado, los porcentajes de sobrevivencia en invernadero fueron muy similares (Figura 7), aunque bajos por los problemas antes mencionados. Con base en los resultados obtenidos, se puede deducir que la calidad de las plantas obtenidas *in vitro* es buena y similar en ambos cultivares, y que el manejo de las plantas recién sembradas en el invernadero determinará el porcentaje de sobrevivencia.

Cultivo en campo

Una vez que las plantas alcanzaron una longitud de 10 a 15 cm en invernadero se llevaron a campo. Durante el cultivo en campo se presentaron algunos problemas con plagas, como la hormiga zompopa (*Atta* spp) y jobotos (*Phyllophaga* spp); sin embargo, se observó 95 % de sobrevivencia de las plantas después de 15 días de siembra. En esta etapa las plantas mostraron crecimiento vigoroso y coloración característica de la especie (Figura 8).

La producción de follaje fue alto en ambos cultivares; aunque con diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$) entre ambos, siendo 'Morita II' el que produjo el mayor peso fresco (260.7 g), comparado con

Field cultivation

Once the plants reached a length of 10 to 15 cm in the greenhouse, they were taken to the field. During field cultivation there were some problems with pests such as the leaf-cutter ant (*Atta spp*) and may beetles (*Phyllophaga spp*); however, 95 % plant survival was observed 15 days after planting. In this stage the plants showed vigorous growth and the characteristic coloration of the species (Figure 8).

Foliage production was high in both cultivars, although with statistically significant differences ($P \leq 0.05$) between them, with 'Morita II' producing greater fresh weight (260.7 g) than 'Silvestre' (214.4 g). By contrast, in dry weight there were no statistically significant differences ($P \leq 0.05$), both producing about 80 g of dry matter per sample (10 plants of the same age and origin, in triplicate) (Figure 9).



Figure 8. *Stevia rebaudiana* plants, cultivars: 'Silvestre' and 'Morita II'.

Figura 8. Plantas de *Stevia rebaudiana*, cultivares: 'Silvestre' y 'Morita II'.

Conclusions

All the immersion systems evaluated allowed scaling-up and, therefore, obtaining a greater number of plants compared with the conventional semi-solid system. With the BIT system there was greater sprouting and shoot length in the cultivar 'Morita II'. In 'Silvestre' there was no significant difference in the number of shoots between the different systems, but there was greater shoot length in BIT.

It is important to pay attention to the conditions given at the beginning of the greenhouse acclimatization stage, as this is critical to ensure the survival of the plant and, therefore, obtain a greater volume of material for planting in the field. The plants in the field produced a lot of biomass, confirming not only the quality of the material planted but also the suitability of the planting site.

'Silvestre' (214.4 g). Por el contrario, en peso seco no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$), produciendo ambas alrededor de 80 g de materia seca por muestra (10 plantas de la misma edad y procedencia, por triplicado) (Figura 9).

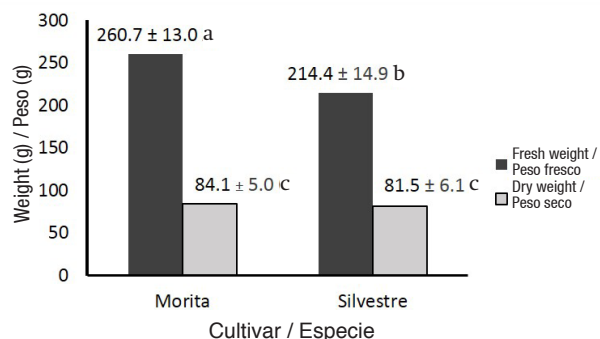


Figure 9. Dry and fresh weight of the foliage produced by two *Stevia rebaudiana* cultivars three months after field planting.

Means with the same letters between bars of the same color do not differ statistically ($P \leq 0.05$).

Figura 9. Peso seco y fresco del follaje producido por dos cultivares de *Stevia rebaudiana* después de tres meses de siembra en campo.

Medias con la misma letra entre barras del mismo color no difieren estadísticamente ($P \leq 0.05$).

Conclusiones

Todos los sistemas de inmersión evaluados permitieron el escalamiento y, por ende, la obtención de mayor número de plantas comparado con el sistema convencional semi-sólido. Con el sistema BIT se produjo mayor brotación y longitud de brotes en el cultivar 'Morita II'. En 'Silvestre' no se observó diferencia significativa en el número de brotes entre los diferentes sistemas, pero si se tuvo mayor longitud de brotes en BIT.

Es importante prestar atención a las condiciones que se den al inicio de la etapa de aclimatación en invernadero, ya que ésta es crítica para asegurar la sobrevivencia de la planta y, por tanto, mayor volumen de material para siembra en campo. Las plantas en campo produjeron mucha biomasa, confirmando no solo la calidad del material sembrado sino también la idoneidad del sitio de siembra.

Agradecimientos

A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica por el apoyo financiero para el desarrollo de este proyecto. Al

Acknowledgments

The authors thank the *Vicerrectoría de Investigación y Extensión* of the *Instituto Tecnológico de Costa Rica* for the financial support given for the development of this project, and the *Centro de Productos Bióticos* of the *Instituto Politécnico Nacional*, Yautepec, Morelos, Mexico, for providing us with the 'Morita II' material used in the research.

End of English version

References / Referencias

- Alvard, D., Cote, F., & Teisson, C. (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation: Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32(1), 55-60. doi: 10.1007/BF00040116
- Alvarenga-Venutolo, S., & Salazar-Aguilar, T. (2015). Micropropagación masiva de *Stevia rebaudiana* Bertoni en sistemas de inmersión temporal. *Cultivos Tropicales*, 36(3), 50-57. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/1932/193242312008.pdf>
- 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. doi: 10.1007/s10535-013-0381-6
- Atteh, J., Onagbesan, O., Tona, K., Buyse, J., Decuyper, E., & Geuns, J. (2011). Potential use of *Stevia rebaudiana* in animal feeds. *Archivos de Zootecnia*, 60(229), 133-136. Retrieved from <http://scielo.isciii.es/pdf/azoo/v60n229/art15.pdf>
- Basail-Pérez, M., Medero-Vega, V., Otero-Gálvez, E., Torres-Delgado, M., López-Torres, J., Cabrera-Jova, M., Santos-Pino, A., Rayas-Cabrera, A., Bauta-Toledo, M., & Beovides-García, Y. (2012). Empleo de sistemas de inmersión temporal como alternativa para la multiplicación *in vitro* del cultivar de plátano vianda 'INIVTPV06-30' (*Musa* AAB). *Biotechnología Vegetal*, 12(1), 53-57. Retrieved from <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/150/html>
- Basail-Pérez, M., Medero-Vega, V., Otero-Gálvez, E., Torres-Delgado, M., Cabrera-Jova, M., López-Torres, J. & Pérez-Martínez, J. E. (2011). Multiplicación *in vitro* de 'FHIA-25' (*Musa* spp., AAB) en sistemas de inmersión temporal. *Revista Biotecnología Vegetal*, 11(1), 27-31. Retrieved from <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/205>
- Berthouly, M., & Etienne, H. (2005). Temporary immersion system: a new concept. In: Hvorslef-Eide, A. K., & Preil, W. (Eds), *Liquid culture systems for in vitro plant propagation* (pp. 165-195). Netherlands: Springer. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Eric_Gontier/publication/235004787_Hvorslef-Eide_Walter_Preil_2005/links/0fcfd5104021fc8bd4000000.pdf
- Cabrera-Jova, M., Gómez-Kosky, R., Rodríguez-Morales, S., López-Torres, J., Rayas-Cabrera, A., Basail-Pérez, M., Santos-Pino, A., Medero-Vega, V., & Rodríguez-Rodríguez, G. (2008). Multiplicación *in vitro* de segmentos nodales del clon de ñame Blanco de Guinea (*Dioscoria cayenensis* - *D. rotundata*) en sistemas de cultivo semi automatizados. *Revista colombiana de Biotecnología*, 10(2), 97-103. Retrieved from <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/9182>
- Casaccia, J., & Álvarez, E. (2006). *Recomendaciones técnicas para una producción sustentable del KA'A HE'E (Stevia rebaudiana Bertoni) en el Paraguay*. Paraguay: Ministerio de Agricultura y Ganadería, Subsecretaría de Estado de Agricultura y Dirección de Investigación agrícola. Retrieved from http://www.steviaparaguay.com.py/recomendaciones-tecnicas_kaahee.pdf
- Castro, D., & González, J. (2002). Eucalyptus (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) micropropagation in a temporary immersion system. *Agricultura técnica*, 62(1), 68-78. Retrieved from http://www.chileanjar.cl/files/V62I1A07_es.pdf
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2017). *InfoStat software estadístico*. Argentina: Universidad Nacional de Córdoba. Retrieved from <http://www.infostat.com.ar>
- Escalona, M., Cid, M., Lezcano, Y., Capote, I., Yáñez, E., & González, J. (1999a). Propagación de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en biorreactores de inmersión temporal. *Efecto de la frecuencia de inmersión y el paclobutrazol* (pp. 28). Ciego de Avila, Cuba: BioVeg'99.
- Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., González, J. L., Desjardins, Y., & Borroto, C. G. (1999b). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion system. *Plant Cell Reports*, 18(9), 743-748. doi: 10.1007/s002990050653
- Espinal-de Rueda, D., Delvalle, W., Cifuentes, E., & Ramia, N. (2006). Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B. a partir de segmentos nodales. *Ceiba*, 47(1-2), 11-18. doi: 10.5377/ceiba.v47i1-2.442
- George, E., Hall, M. A., & de Klerk, G. (2008). *Plant propagation by tissue culture* (pp. 29-64). Netherlands: Springer. Retrieved from www.springer.com/us/book/9781402050046
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., & Bley, T. (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Science*, 14(6), 607-621. doi: 10.1002/elsc.201300166

- Goettmoeller, J., & Ching, A. (1999). Seed germination in *Stevia rebaudiana*. In: Janick, (Ed.), *Perspectives on new crops and new uses* (pp. 510-511). Alexandria, Virginia: ASHS Press. Retrieved from <https://hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1999/v4-510.html>
- 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. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000400015
- Minitab 17. (2010). *Statistical Software by Minitab Inc.* Retrieved from <http://www.minitab.com/es-mx/products/minitab/>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum*, 15(3), 473-497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nava, J., Jimenez-Aparicio, A., de Jesús-Sánchez, A., Arenas-Ocampo, M. L., Ventura-Zapata, E., & Evangelista-Lozano, S. (2011). Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de *Laelia eyermaniana* RCHB. f. generadas *in vitro*. *Polibotánica*, 32, 107-117. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/621/62119933006.pdf>
- Orlikowska, T., Nowak, K., & Reed, B. (2017). Bacteria in the plant tissue culture environment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 128(3), 487-508. doi: 10.1007/s11240-016-1144-9
- Preil, W. (2005). General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. In: Hvorslef-Eide, A. K., & Preil, W. (Eds), *Liquid culture systems for in vitro plant propagation* (pp. 1-18). Netherland: Springer. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Eric_Gontier/publication/235004787_Hvorslef-Eide_Walter_Preil_2005/links/0fcfd5104021fc8bd4000000.pdf
- 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. doi: 10.1007/s11240-011-0088-3
- 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), 138-146. doi: 10.1007/s11240-005-9013-y
- Sánchez-Chiang, N., & Jiménez, V. M. (2010). Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos vegetales. *Agronomía mesoamericana*, 21(1), 193-205. Retrieved from http://www.mag.go.cr/rev_meso/v21n01_193.pdf
- Santos-Pino, A., Cabrera-Jova, M., Gómez-Kosky, R., López-Torres, J., Rayas-Cabrera, M., Basail-Pérez, M., Medero-Vega, 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. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4808854>
- Shivanna, N., Mahadev, N., Khanum, F., & Kaul, V. K. (2013). Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 27(2), 103-113. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2012.10.001
- Sivaram, L., & Mukundan, U. (2003). *In vitro* culture studies on *Stevia rebaudiana*. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39(5), 520-523. doi: 10.1079/IVP2003438
- Steinmacher, D. A., Guerra, M. P., Saare-Surminski, K., & Lieberei, R. (2011). A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Annals of Botany*, 108(8), 1463-1475. doi: 10.1093/aob/mcr033
- Thiyagarajan, M., & Venkatachalam, P. (2012). Large scale *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* (bert) for commercial application: Pharmaceutically important and antidiabetic medicinal herb. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 111-117. doi: 10.1016/j.indcrop.2011.10.037
- Vilchez, J., & Albany, N. (2014). Multiplicación *in vitro* de *Psidium guajava* L. en sistemas de inmersión temporal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(2), 96-103. Retrieved from <http://www.redalyc.org/html/776/77632757012/>
- Watt, P. (2012). The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant propagation. *African Journal of Biotechnology*, 11(76), 14025-14035. doi: 10.5897/AJB12.1693
- Ziv, M. (2005). Simple bioreactors for mass propagation of plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81, 277-285. doi: 10.1007/1-4020-3200-5_5