

MICROPROPAGACIÓN DE *Stevia rebaudiana* Bertoni Y DETECCIÓN DE STEVIÓSIDOS

Liberia Vázquez-Baxcajay¹, Alejandrina Robledo-Paz¹, Alfonso Muratalla-Lúa¹ y
Víctor Conde-Martínez²

RESUMEN

Stevia rebaudiana Bertoni produce glucósidos diterpenoides (steviosidos) que pueden ser utilizados como edulcorantes dietéticos. La creciente demanda de esta planta requiere buscar nuevas alternativas de producción, tales como el cultivo de tejidos mediante micropropagación. Para la regeneración *in vitro* se utilizaron segmentos nodales como explantes, los cuales fueron cultivados en medio basal de Murashige y Skoog suplementado con distintas combinaciones de 6-benciladenina (2,0 a 4,0 mg·L⁻¹), cinetina (1,3 a 8,0 mg·L⁻¹) y ácido 3-indolacético (0,3 a 1,0 mg·L⁻¹). El análisis estadístico mostró diferencias para el porcentaje de explantes que formaron brotes y el número de brotes formados, resultando inferior la combinación que contenía 2,0 mg·L⁻¹ de cinetina y 0,5 mg·L⁻¹ de AIA, en la cual sólo se obtuvo 29,41 % explantes con brotes y 1,40 brotes por explante. Las plantas lograron aclimatarse a las condiciones de invernadero en los primeros 15 días; después de 60 días el 81 % de ellas sobrevivieron, y cuatro meses más tarde formaron semillas. Asimismo, extractos obtenidos a partir de tejidos de plantas madre, plantas micropropagadas cultivadas en el invernadero y micropropagadas cultivadas *in vitro* se analizaron por cromatografía en capa fina para detectar la presencia de steviosidos. Se identificaron steviosido, steviol y rebaudiósido A en la planta madre de *Stevia*, así como steviol y steviosido en plantas micropropagadas cultivadas en el invernadero y steviosido y rebaudiósido A en plantas cultivadas *in vitro*.

Palabras clave adicionales: Aclimatación, cultivo de tejidos, glucósidos, reguladores de crecimiento

ABSTRACT

Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni, and steviosides detection

Stevia rebaudiana Bertoni produces diterpenoid glycosides (steviosides) which can be used as dietetic edulcorants. The growing demand for the plant requires the search of new production ways, such as tissue culture through micropropagation. For *in vitro* regeneration, nodal segments were used as explants which were cultured on Murashige and Skoog medium supplemented with different combinations of 6-benzyladenine (2.0-4.0 mg·L⁻¹), kinetin (1.3- 8.0 mg·L⁻¹) and 3-indoleacetic acid (0.3-1.0 mg·L⁻¹). There were significant differences in the percentage of explants with shoots and number of shoots per explant, being the lowest the combination containing 2.0 mg·L⁻¹ kinetin and 0.5 mg·L⁻¹ IAA, which only showed 29,41 % explants with shoots, and 1.40 shoots per explant. The plants were able to acclimate to greenhouse conditions in the first 15 days; after 60 days 81 % of plants survived, and four months later those plants produced seeds. Extracts obtained from stock plant tissues, micropropagated plants cultured in the greenhouse and micropropagated plants cultured *in vitro* were analyzed by thin layer chromatography to detect the presence of steviosides. Stevioside, steviol and rebaudioside A were identified in extracts from stock plants, steviol and stevioside in micropropagated plants cultured in the greenhouse and stevioside and rebaudioside A in *in vitro* cultured plants.

Additional key words: Acclimatization, tissue culture, glycosides, growth regulators

INTRODUCCIÓN

La industria de los edulcorantes, naturales y artificiales tiene gran relevancia mundial, ya sea como aditivos en alimentos o como suplementos dietéticos para ayudar en el control de la diabetes y la obesidad. *Stevia rebaudiana* Bertoni constituye una alternativa prometedora, en el

rango de edulcorantes naturales, más aun cuando los endulzantes sintéticos están seriamente cuestionados por los efectos de su consumo a corto y largo plazo (Marín, 2004). Esta planta produce una serie de glucósidos diterpenoides o steviosidos (steviosido, steviol, rebaudiósido A), los cuales tienen un poder endulzante considerablemente mayor que la glucosa; además,

Recibido: Mayo 27, 2013

Aceptado: Enero 17, 2014

¹ Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados. e-mail: arobledo@colpos.mx

² Postgrado en Botánica, Colegio de Postgraduados, km. 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco. México. CP. 56230

son bajos en calorías y no son tóxicos, ni mutagénicos (Soejarto et al., 1982; Matsui et al., 1996).

La Agencia de Alimentos y Drogas (FDA) de los Estados Unidos aprobó en 2008 el uso de los glucósidos diterpenoides como edulcorantes naturales no calóricos en alimentos y bebidas (Jiménez et al., 2010), dando al cultivo una gran expectativa, no solamente en el mercado de los edulcorantes, sino también en la agricultura, ganadería, farmacéutica y cosmetología.

Debido a las propiedades endulzantes de la *Stevia*, se estima que la demanda de hojas secas podría llegar a ser de 202,500 toneladas al año, lo que lleva a buscar nuevas alternativas de producción (Madan et al., 2010). La planta se propaga principalmente por semillas que resultan de la polinización cruzada. Esta forma de reproducción implica recombinación genética y, por lo tanto, alta heterogeneidad en cuanto al crecimiento de las plantas y la producción de steviósidos (Ferreira y Handro, 1988). Se ha recurrido a la reproducción asexual mediante estacas para tratar de obtener materiales homogéneos; sin embargo, con esta forma de reproducción se obtiene bajo número de individuos por planta (Sivaram y Mukundan, 2003).

Una alternativa es el cultivo de tejidos (micropropagación) que ofrece la posibilidad de obtener gran cantidad de plantas de un genotipo seleccionado, más uniformes en cuanto a su crecimiento y producción de steviósidos. Asimismo, permite tener mayor control sobre la sanidad del material facilitando su transporte de un país a otro (Orozco-Castillo, 2004; Mroginski et al., 2010).

Aun cuando se han desarrollado algunos protocolos de micropropagación de plantas de *Stevia* (Suárez y Salgado, 2008; Taware et al., 2010; Arpita et al., 2011), se necesita mayor investigación (Pérez-Barraza et al., 2013), ya que la naturaleza heterogénea de esta planta requiere establecer protocolos de regeneración *in vitro* para cada genotipo, como ha sido reconocido por otros autores (Mitra y Pal, 2007). Considerando lo antes mencionado, el objetivo del presente trabajo fue establecer las condiciones para la micropropagación de *Stevia rebaudiana*, la aclimatación de las vitroplantas regeneradas y la detección de los steviósidos producidos por las mismas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron segmentos nodales obtenidos de plantas de *Stevia rebaudiana* de tres meses de edad, de apariencia sana y sin heridas. Para desinfectar los segmentos nodales centrales de 0,6 cm de longitud (explantos), éstos fueron sumergidos en una solución con 0,7 g·L⁻¹ de Fungimycin 100 (18,1% estreptomicina y 2% oxitetraciclina) y 0,7 g·L⁻¹ de Ridomil (9% metalaxil y cloratonil) durante 5 min y luego en una con hipoclorito de sodio (1,8 % de cloro activo) durante 25 min. Posteriormente, los explantes se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada dentro de una campana de flujo laminar.

Los medios consistieron en las sales basales del medio de Murashige y Skoog (MS), más diferentes concentraciones de ácido 3-indolacético (AIA) (0,3 -1,0 mg·L⁻¹) en combinación con 6-bencilaminopurina (BA) (2 y 4 mg·L⁻¹) y 6-furfurilaminopurina (cinetina) (C) (1,3-8,0 mg·L⁻¹), las cuales se definieron con base en la literatura consultada y ensayos previos. Además, los medios fueron suplementados con Ridomil (0,7 g·L⁻¹), Cefotaxima (500 mg·L⁻¹) y Fungimycin 100 (0,7 g·L⁻¹); el pH de los mismos se ajustó a 5,8 y se les agregó 2,3 g·L⁻¹ de Phytigel. En estos medios los explantes permanecieron durante 10 días, para después transferirlos a unos carentes de desinfectantes. Posteriormente, se evaluó el porcentaje de explantes que formaron brotes adventicios y el número de brotes por explante.

Los cultivos establecidos para regenerar brotes adventicios fueron incubados en una cámara de ambiente controlado a 25±2 °C, 16 h de fotoperiodo y una intensidad lumínica de 25 μmol·m⁻²·s⁻¹. Este ensayo se realizó bajo un diseño completamente al azar, con cinco tratamientos (Cuadro 1) y 25 repeticiones por tratamiento, considerando como una repetición un frasco con un segmento nodal.

Para la etapa de aclimatación y crecimiento, cuarenta y cinco plantas regeneradas *in vitro* de aproximadamente 5 cm de altura, se extrajeron de los frascos y sus raíces se lavaron con agua corriente para eliminar los residuos de agar. Luego, las plantas se sumergieron en una solución de Ridomil (1 g·L⁻¹) durante 5 min, y finalmente se colocaron en vasos de poliestireno de 1 L de

capacidad que contenían turba canadiense (Fafard Growing Mix 1) humedecida a capacidad del pote. Los vasos se cubrieron con bolsas de polietileno y se llevaron al invernadero; después de 10 días, éstas fueron retiradas y los vasos se colocaron bajo una malla sombra de 90 % durante 8 días. Después las plantas se transfirieron a maceteros de 20 x 35 cm,

las cuales contenían el mismo sustrato. Las plantas se regaron cada tercer día con agua corriente y cada 15 días se les aplicó el fertilizante Miracle Gro (N-P-K: 15-30-15) en dosis de 1 g·L⁻¹ y se evaluó durante 60 días la supervivencia y altura de las plantas, las cuales permanecieron en el invernadero hasta la formación de semillas.

Cuadro 1. Efecto de distintos reguladores de crecimiento en la inducción de brotes adventicios de *Stevia rebaudiana*

Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento (mg·L ⁻¹)			Explantes que formaron brotes (%)	Nº de brotes por explante
	AIA	BA	C		
1	0	0	1,3	76,47 a	2,68 a
2	0,3	4,0	0	64,71 ab	2,24 ab
3	0,5	0	2,0	29,41 b	1,40 b
4	0,8	0	8,0	58,82 ab	1,92 ab
5	1,0	2,0	0	41,18 ab	2,08 ab

Valores con la misma letra dentro de las columnas son iguales estadísticamente según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$)

Para la extracción y análisis cualitativo de steviósidos se utilizaron hojas de plantas madre de *Stevia rebaudiana* de 30 días después de la emergencia (DDE) y de tres meses de edad, así como de plantas micropropagadas cultivadas en el invernadero durante 60 días (plantas regeneradas *in vitro* desarrolladas en un invernadero) y plantas micropropagadas cultivadas *in vitro* por 30 días en presencia de 1,3 mg·L⁻¹ de cinetina (plantas regeneradas *in vitro*, propagadas en medio de cultivo en una cámara de ambiente controlado). Se trituraron 100 mg de tejido de cada una de las muestras liofilizadas en un mortero con 10 mL de etanol 96 %. Las muestras en solución alcohólica se colocaron en vasos de precipitado y se mantuvieron a temperatura ambiente y agitación durante 4 h, tiempo que se consideró suficiente para la extracción eficiente de steviósidos, con base en ensayos preliminares. Posteriormente, las muestras se centrifugaron por 5 min a 1400 rpm a 4 °C, la pastilla se desechó y el sobrenadante colectado se concentró hasta 1 mL a 90 °C utilizando una estufa de aire forzado; el concentrado se filtró a través de una membrana millipore de 0,45 µm (Scholes et al., 1996; Bondarev et al., 2003; Bravo et al., 2009).

Previo a la separación de steviósidos en cromatografía de placa fina, los porcentajes de steviósidos de las muestras extraídas de la planta

madre (hojas, tallo y raíces en la etapa vegetativa, y flores en la madurez) fueron cuantificados por el método colorimétrico, utilizando una curva de calibración preparada con una solución estándar (2 mg·mL⁻¹) de *Stevia* comercial (Bravo et al., 2009). Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro (Jenway modelo 6305) con un barrido de 610 hasta 660 nm, con intervalos de 10 nm, y la absorción máxima de los steviósidos fue de 630 nm (Bondarev et al., 2003; Bravo et al., 2009).

Para la cromatografía de placa fina se utilizaron 100 µL de extracto de cada muestra y se aplicaron en placas de Sílica gel 60 F₂₅₄ (5x20 cm, Merck). Estas placas se colocaron en el interior de una cámara de cromatografía de vidrio, previamente saturada con una mezcla volumétrica de cloroformo:isopropanol:ácido acético:agua (25:25:5:5). La separación de las bandas de steviósidos se realizó por un tiempo de 4 a 5 horas y los diferentes steviósidos fueron revelados con una solución de timol 0,2 % a 110 °C durante 10 min. Los cromatogramas resultantes se compararon contra tres patrones estándar de steviol, steviósido y rebaudiósido A (Sigma-Aldrich) que también fueron sometidos a cromatografía fina.

La identificación de los diferentes steviósidos separados en las muestras experimentales se

realizó por comparación de los valores de Rf obtenidos de los steviosidos estándar (steviol, steviósido y rebaudiósido A).

Los resultados del ensayo de inducción de brotes adventicios se compararon mediante análisis de varianza y prueba de medias de Tukey utilizando el programa SAS V6.4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la fase de establecimiento *in vitro* de los segmentos nodales, el tratamiento de desinfección permitió reducir la contaminación hasta 1,7 % y obtener un índice de supervivencia de los mismos del 98 %.

Todos los medios de cultivo utilizados para la regeneración de brotes adventicios indujeron la formación de éstos a partir de segmentos nodales. No obstante, el medio 1 superó significativamente al medio 3, tanto en el porcentaje de explantes que formaron brotes como en el número de brotes por explante (Cuadro 1); es decir, que al incrementar los niveles de cinetina de 1,3 a 2,0 mg·L⁻¹ y adicionar 0,5 mg·L⁻¹ de AIA se produjo una disminución del porcentaje de explantes que formaron brotes y del número de brotes por explante.

Se destaca que el medio 1, que sólo contenía el regulador de crecimiento cinetina, fue el que produjo mejores resultados en la inducción de brotes adventicios de *Stevia*. Estos resultados coinciden con los de Mitra y Pal (2007), quienes encontraron que la cinetina fue más eficiente que la BA para la multiplicación a partir de yemas axilares de la planta.

Después de 10 días de que las plantas regeneradas *in vitro* se transfirieron al invernadero, y se les retiró la bolsa que las cubría, mostraron cambio de coloración de las hojas así como síntomas de deshidratación debido a la escasa funcionalidad del aparato estomático, lo que podría ocasionar su muerte. Estos síntomas se redujeron considerablemente al colocar las plantas bajo la malla de sombra. Las plantas cultivadas *in vitro* usualmente tienen una cutícula poco desarrollada y la aclimatación es un proceso gradual que implica la habilitación y desarrollo de los estomas de la epidermis (Morgado et al., 2000; Mroginski et al., 2010).

Aunque el porcentaje de supervivencia de las plantas fue decreciendo con el tiempo de

permanencia en el invernadero hasta llegar al 82 % para el día 60 (Figura 1), los resultados obtenidos indican que el procedimiento de aclimatación fue favorable para el crecimiento de las plantas micropropagadas, ya que permitió una alta supervivencia de éstas al final del periodo de evaluación. Sivaram y Mukundan (2003) reportaron una tasa de supervivencia del 70,0 % de microplantas de *S. rebaudiana* bajo condiciones de invernadero, mientras que Hwang (2006) encontró 98,4 % de supervivencia durante la aclimatación en campo. De la misma forma, Espinal de Rueda et al. (2006) reportaron que utilizar un sistema de microtúnel permitió la supervivencia de 82,7 % de las vitroplantas. En contraste, cuando se cubrieron las plantas con bolsas de plástico o se mantuvieron bajo un sistema nebulizado, la supervivencia fue de sólo 16,0 y 2,5 %, respectivamente.

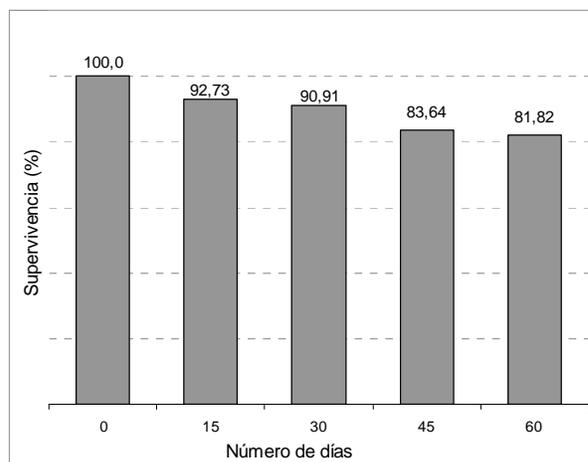


Figura 1. Supervivencia de las microplantas de *Stevia rebaudiana* bajo condiciones de invernadero

Las plantas cuya altura inicial promedio fue de 5,3 cm alcanzaron una altura promedio de 8,1 cm en los primeros 15 días; es decir, en este periodo de tiempo las plantas sólo aumentaron su tamaño en 2,8 cm (Figura 2). Dicha respuesta puede atribuirse a que durante este lapso las microplantas se estaban adaptando a las condiciones del invernadero (aclimatación). En contraste, a los 30 y 45 días, las plantas tuvieron un rápido incremento en su longitud, atribuido a que éstas ya habían logrado adaptarse a las nuevas condiciones de crecimiento; a los 60 días se registró un menor incremento en altura, lo que

finalmente generó una curva de crecimiento total de tipo sigmoideal.

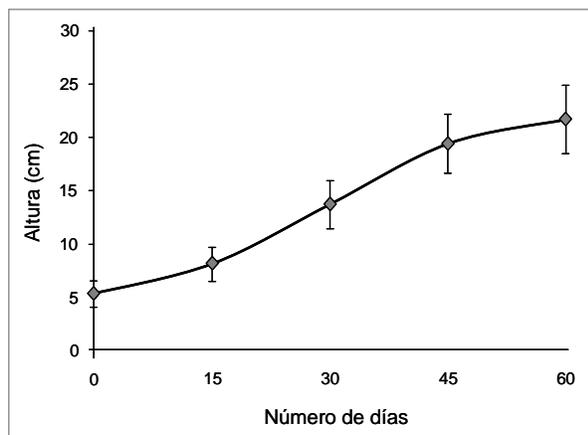


Figura 2. Altura promedio de las plantas de *Stevia rebaudiana* micropropagadas cultivadas en el invernadero durante 60 días. Las barras indican la desviación estándar

Se observó que el procedimiento de aclimatación utilizado, además de promover que más del 80 % de las plantas de *Stevia* micropropagadas permanecieran vivas después de 60 días, permitió que éstas alcanzaran la madurez y formaran semillas (Figura 3A y B).

La extracción etanólica a temperatura ambiente permitió obtener los steviósidos de manera efectiva. Aunque Jaroslav et al. (2007) encontraron que temperaturas muy altas (100 a 110 °C) dieron buenos resultados, Kroyer (1999) señaló que al superar 80 °C podría ocurrir degradación de steviósidos,

El porcentaje de steviósidos totales extraídos de la planta madre fue de 6,5 % en hojas, 3,3 % en tallo, 2,2 % en raíces y 3,6 % en las flores. Estos resultados indican que los steviósidos se encuentran distribuidos en toda la planta en mayor o menor concentración y ésta depende del tejido de la misma y de la etapa fenológica, como fue señalado por Bondarev et al. (2003).

Los estándares purificados del steviol, steviósido y rebaudiósido A presentaron valores Rf de 0,11; 0,27 y 0,36, respectivamente (Cuadro 2). Por su parte, al observar los cromatogramas (Rf's) de los extractos se reveló un perfil de seis bandas para la planta madre, cuatro para las plantas micropropagadas cultivadas en invernadero y dos para las cultivadas *in vitro* (Cuadro 3). Las bandas en la

planta madre correspondieron a steviol, steviósido y rebaudiósido A, acorde con los Rf's revelados por los steviósidos estándar. Las otras tres bandas separadas (bandas 2, 3 y 6) pueden corresponder a compuestos pertenecientes a la familia de los steviósidos, cuyos estándares no estuvieron disponibles. Es interesante hacer notar la presencia de steviol y steviósido en las plantas micropropagadas cultivadas en el invernadero, y de steviósido y rebaudiósido A en las plantas micropropagadas cultivadas *in vitro*. Distintos autores han señalado que el steviósido y el rebaudiósido A son los steviósidos más importantes y abundantes en las plantas de *Stevia* (Yamazaki y Flores, 1991; Bondarev et al., 2003).

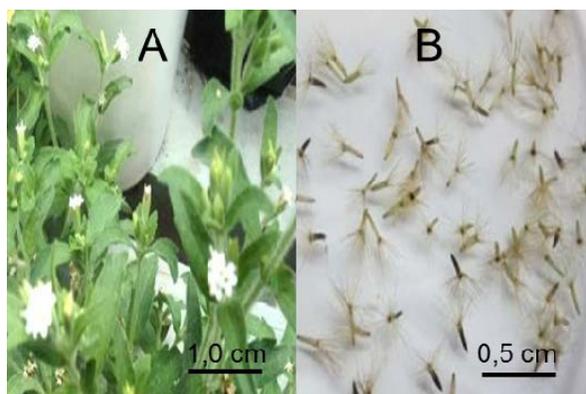


Figura 3. A) Plantas en floración después de cuatro meses en el invernadero. B) Semillas producidas por las plantas regeneradas *in vitro*

Los resultados obtenidos del presente análisis cualitativo de steviósidos indican que las plantas micropropagadas no perdieron su capacidad para producir y acumular steviósidos, aún después de pasar por los procesos de dediferenciación y diferenciación que involucra el cultivo *in vitro*, previos a la formación de brotes adventicios. Además, es interesante hacer notar que la síntesis de steviósidos toma lugar en etapas muy tempranas del desarrollo de la planta; sin embargo, la presencia de uno u otro tipo de steviósido en los extractos, así como su concentración, pueden verse afectadas por el grado de desarrollo de las plantas y las condiciones ambientales (Bondarev et al., 2001; 2003). Es conocido que un ambiente adecuado puede producir elevados porcentajes de steviósido y rebaudiósido A, y porcentajes menores de

rebaudiósido C, dulcósido A, rubósido, esteviolbósido y rebaudiósido B. La composición de los extractos también puede depender de los

procesos de extracción y purificación empleados (Kroyer, 1999; Bondarev et al., 2003; Bravo et al., 2009).

Cuadro 2. Caracterización de los estándares de steviósidos por cromatografía en capa fina

Compuesto estándar (Sigma Aldrich, USA)	Masa molecular (g·mol ⁻¹)	Rf
Steviol	318,45	0,11
Steviósido	804,87	0,27
Rebaudiósido A	967,01	0,36

Cuadro 3. Valores de Rf de extractos *Stevia rebaudiana* obtenidos a partir de distintas fuentes y analizados por cromatografía en capa fina

Número de bandas	Planta madre	Rf	
		Planta micropropagada cultivada en invernadero	Planta micropropagada cultivada <i>in vitro</i>
1	0,12	0,10	---
2	0,22	0,16	---
3	0,20	0,19	---
4	0,27	0,27	0,26
5	0,36	---	0,36
6	0,57	---	---

CONCLUSIONES

El protocolo de regeneración *in vitro* desarrollado en la presente investigación permitió obtener plantas de *Stevia rebaudiana* a partir de segmentos nodales. Las condiciones de aclimatación promovieron la supervivencia y el crecimiento de más del 80 % de las microplantas después de 60 días. Las plantas micropropagadas lograron florecer y formar semillas, a la vez que conservaron la capacidad para sintetizar distintos steviósidos (steviósido, steviol y rebaudiósido A).

AGRADECIMIENTO

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México, por el financiamiento otorgado a Liberia Vazquez Baxcajay mediante una beca para realizar sus estudios de Maestría en Ciencias (Becario N° 235822).

LITERATURA CITADA

1. Arpita, D., S. Gantait y N. Mandal. 2011.

Micropropagation of an elite medicinal plant: *Stevia rebaudiana* Bert. Int. J. Agri. Res. 6: 40-48.

- Bondarev, N.I., O.V. Reshetnyak y A.M. Nosov. 2001. Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Plant Sci. 161: 155-163.
- Bondarev, N.I., M.A. Sukhanova, O.V. Reshetnyak y A.M. Nosov. 2003. Steviol glycoside content in different organs of *Stevia rebaudiana* Bertoni and its dynamics during ontogeny. Biol. Plant. 47: 261-264.
- Bravo, M., N. Ale, D. Rivera, J. Huamán, D. Delmás., M. Rodríguez, M. Polo, y M. Bautista. 2009. Caracterización química de la *Stevia rebaudiana*. Rev. Per. Quím. Ing. Quím. 12: 5-8.
- Espinal de Rueda, D., W. Del Valle, E. Cifuentes y N.E. Ramia. 2006. Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B. a partir de segmentos nodales. Ceiba 47(1-2): 11-18.

6. Ferreira, C. y W. Handro. 1988. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* through leaf explants from adult plants. *Plant Medic.* 54(2): 157-160.
7. Hwang, H.S. 2006. Rapid propagation *in vitro* and enhanced stevioside accumulation in *Stevia rebaudiana* Bert. *J. Plant Biol.* 49(4): 267-270.
8. Jaroslav, P., E.V. Ostrá, P. Karásek, M. Roth, K. Benesová, P. Kotlariková y J. Caslavsky. 2007. Comparison of two different solvents employed for pressurised fluid extraction of stevioside from *Stevia rebaudiana*: metanol versus water. *Anal. Bioanal. Chem.* 388: 1847-1857.
9. Jiménez, T., G. Cabrera, E. Álvarez y F. Gómez. 2010. Evaluación del contenido de esteviósido y rebaudiósido A en una población de *Stevia rebaudiana* Bertoni (kaâ heê) cultivada comercialmente. Estudio preliminar. Memoria del Instituto de Investigación Ciencias de la Salud (Caacupé, Paraguay) 8(1): 47-53.
10. Kroyer, G. T. 1999. The low calorie sweetener stevioside: stability and interaction with food ingredients. *Lebensm. Wiss. Technol.* 32: 509-512.
11. Madan, S., A. Sayyed, G.N. Singh, K. Kanchan, Y. Kumar, R. Singh y M. Gorg. 2010. *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni. A review. *Indian J. Nat. Prod. Resour.* 1(3): 267-286.
12. Marín, W. 2004. Sondeo de mercado de la estevia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, Colombia. pp. 15-20.
13. Matsui, M., K. Matsui, Y. Kawasaki, Y. Oda, T. Noguchi, Y. Kitagawa, M. Sawada, M. Hayashi, T. Nohmi, K. Yoshihira, M. Ishidate y T. Sofuni. 1996. Evaluation of the genotoxicity of steviosido and steviol using six *in vitro* and one *in vivo* mutagenicity assays. *Mutagenesis* 11(6): 573-579.
14. Mitra, A. y A. Pal. 2007. *In vitro* regeneration of *Stevia rebaudiana* (Bert) from the nodal explant. *Plant Biochemistry & Biotechnology* 16(1): 59-62.
15. Morgado, I.F., J. Carneiro, P. Leles y D. Barroso. 2000. Resíduos agroindustriais prensados como substrato para a produção de mudas de cana de açúcar. *Sci. Agric.* 57(4): 23-24.
16. Mroginski, L., P. Sansberro y E. Flaschland. 2010. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. In: Levitus, G., V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y A. Mroginski (Eds.). *Biotechnología y Mejoramiento Vegetal II*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotechnología. Buenos Aires, Argentina. pp. 17-25.
17. Orozco-Castillo, C. 2004. Situación actual de la Biotechnología en Guatemala. Consejo Nacional de Áreas Protegidas. Guatemala, Guatemala. 86 p.
18. Pérez-Barraza, H. M., M. A. Gutiérrez-Espinosa, Z. Y. López-Barrios y A. I. Pérez-Luna. 2013. Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* B. mediante segmentos nodales. Memoria del VII Simposio Internacional de *Stevia*. Mérida, Yucatán. México. Resumen p. 294.
19. Scholes, J., N. Bundock, R. Wilde y S. Rolfe. 1996. The impact of reduced vacuolar invertase activity on the photosynthetic and carbohydrate metabolism of tomato. *Planta* 200: 265-272.
20. Sivaram, L. y U. Mukundan. 2003. *In vitro* culture studies on *Stevia rebaudiana*. *In Vitro Cell. Dev.-Pl.* 39(5): 520-523.
21. Soejarto, D.D., A.D. Kinghorn y N.R. Farnsworth. 1982. Potential sweetening agents of plant origin III. Organoleptic evaluation of *Stevia* leaf herbarium samples for sweetness. *J. Nat. Prod.* 45: 590-599.
22. Suárez, E.I. y A.J. Salgado. 2008. Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bert. (Asteraceae-Eupatorieae) a través de organogénesis. *Revista Temas Agrarios* 13(1): 40-48.
23. Taware, A.S., D.S. Mukadam, A.M. Chavan y S.D. Taware. 2010. Comparative studies of *in vitro* and *in vivo* grown plants and callus of *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Int. J. Integr. Biol.* 9(1): 10-15.

24. Yamazaki, T. y H.E. Flores. 1991. Examination of steviol glycoside production by hair root and shoot cultures of *Stevia rebaudiana*. J. Nat. Prod. 54: 986-992.