

Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un Cultivo Promisorio para México

Dumas Oviedo-Pereira¹, Silvana Alvarenga Venutolo², Silvia Evangelista Lozano³, Gabriela Sepúlveda Jiménez³ y Mario Rodríguez-Monroy^{3*}

1. *Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia. Carrera 78 No 65-46 Robledo, Medellín, Colombia.*

2. *Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica.*

3. *Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional. Calle CEPROBI 8. Col. San Isidro. Yautepec, Morelos. México CP. 62730. mrmonroy@ipn.mx*

RESUMEN

Stevia rebaudiana Bertoni (stevia) es una planta con potencial industrial, debido a que contiene glucósidos diterpenos, que le confieren propiedades edulcorantes. Además, la planta tiene propiedades medicinales y es usada como anticancerígena, antidepresiva, antiviral, antimicrobiana, y el control de la hipertensión y la obesidad, que son motivo de estudios recientes. Industrialmente, los glucósidos de stevia se usan para la preparación de alimentos y es un ingrediente de jugos, néctares, bebidas carbonatadas, pastelería, confitería, yogurt, chicles, entre otros. Sin embargo, el porcentaje bajo de germinación de las semillas limita la propagación de la planta por esta vía. Como una alternativa se realiza la propagación por métodos asexuales, a través de esquejes o brotes laterales; pero el número de propágulos es limitado y hay problemas de transmisión de enfermedades, lo que probablemente afecta la concentración de los compuestos de mayor interés. Por ello se realizan estudios usando nuevas estrategias de propagación de esta especie. En esta revisión se presenta una descripción de las características del cultivo de *S. rebaudiana* y del estado del arte del uso de herramientas biotecnológicas basadas en la micropropagación para la obtención de plántulas sanas de *S. rebaudiana*.

Palabras clave: *Stevia rebaudiana* Bertoni, sistemas de micropropagación, biorreactores de inmersión temporal.

ABSTRACT

Stevia rebaudiana Bertoni is a plant with industrial potential, due the presence of diterpenes glycosides with sweetener properties. Additionally, the plant have medicinal properties and used as: anticancer, antidepressant, antiviral, antimicrobial, and control of hypertension and obesity; which are subject of studies. Industrially, stevia glycosides are used in the food preparation as ingredient of juices, fruits nectars, soft drinks, pastries, confectionery, yogurt, and chewing gum. However, the low percentage of seed germination limits the propagation of the plant by this pathway. Alternatively, plant propagation is realized by asexual methods, using cuttings or side-shoots; but the production of propagules number is limited and there is problems of diseases transmission that probably affect the compounds concentration of high interest. Therefore, studies using new strategies of vegetative propagation of this species are realized. This review shows a description of the crop characteristics of *S. rebaudiana* and the art state of the use of biotechnology tools based on micropropagation for obtaining healthy seedlings of *S. rebaudiana*.

Key words: *Stevia rebaudiana* Bertoni, micropropagation systems, temporary immersion bioreactors.

***Stevia rebaudiana* Bertoni.**

Stevia rebaudiana es un arbusto ramificado nativo de Paraguay y conocido por los indígenas guaraníes como “Kaa he-he”, que se traduce como “Hierba dulce”. Las hojas de la planta se han usado tradicionalmente como edulcorante y como un potencializador del sabor (Pande & Gupta, 2013). La planta se desarrolla preferentemente en climas con lluvias que van desde los 1400 a 1800 mm anuales y temperaturas entre los 15 y los 30 °C. La intensidad de luz alta y los fotoperiodos largos favorecen el desarrollo y crecimiento de los entrenudos y del área foliar. El suelo adecuado para el desarrollo de la planta es de tipo areno-arcilloso, franco y franco-

arcilloso, con una porción regular de humus, además se adapta a pH entre 6.5 y 7.5 (Goyal & Goyal, 2010; Jarma-Orozco, 2010; Jiménez-Quesada, 2011; Ramírez-Jaramillo, 2011).

S. rebaudiana se distribuye en Paraguay y zonas vecinas de Brasil y Argentina. Actualmente el cultivo se ha extendido a Japón, China, Taiwán, Tailandia, Indonesia, Filipinas, Australia, Rusia, Ucrania, Kazajstán, Malasia, Indonesia y América Latina. Los principales países productores de stevia son: China, Paraguay, Colombia, Argentina, Brasil, Israel, Tailandia, y Japón. Actualmente el consumo de hoja seca se estima en aproximadamente 200 millones de dólares. Japón es el país que controla el

mercado de ventas de compuestos purificados con ventas cercanas a los 130 millones de dólares. En Sudamérica los países productores principales de hoja son Paraguay y Brasil (Ramírez-Jaramillo *et al.*, 2011).

En México, no se han encontrado estadísticas oficiales sobre la producción de stevia. El cultivo se introdujo y promovió por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, SAGARPA (Das *et al.*, 2011; Jarma-Orozco, 2010; Pande & Gupta, 2013; Ramírez-Jaramillo *et al.*, 2011). El reporte del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP (2011) propone que en México las zonas de alto potencial para el cultivo de stevia, se distribuyen principalmente en los estados del Pacífico como: Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chipas. También se describen algunas áreas importantes en el Golfo de México en los estados de Tamaulipas, Veracruz y en menor medida Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo. En los estados de Quintana Roo y Chiapas hay reportes de su introducción a campo con rendimiento de siete toneladas de hoja seca por hectárea al año. En el mercado Mexicano se pueden encontrar diversos productos a base de stevia como edulcorantes, en presentaciones líquidas y granuladas (Ramírez-Jaramillo *et al.*, 2011).

Los compuestos endulzantes naturales de *S. rebaudiana* no son compuestos

calóricos, lo que los hace apropiados para aquellas personas que deben controlar la concentración de azúcar en la sangre. Actualmente, la industria alimentaria y farmacéutica tiene gran interés en la producción de esta planta; además debe resaltarse que también se le atribuyen propiedades medicinales, como: anticancerígena, antidepresiva, antiviral, antimicrobiana, controla la hipertensión y la obesidad, entre otras (Barba *et al.*, 2015; Carbonell-Capella *et al.*, 2015; Holvoet *et al.*, 2015; Langle *et al.*, 2015; Ramya *et al.*, 2014; Shivanna *et al.* 2013; Thiyagarajan & Venkatachalam, 2012). Hoy en día se le utiliza industrialmente como aditivo para alimentos como, jugos, néctares, bebidas carbonatadas, pastelería, confitería, yogurt y chicles, entre otros (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012).

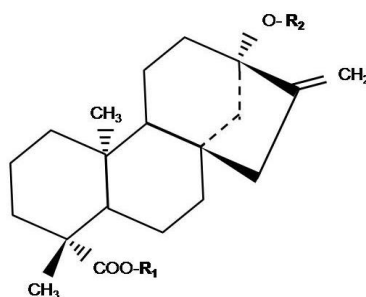
Wölwer-Rieck (2012) reporta que los grupos químicos mayoritarios son los esteviol glucósidos, los diterpenos no glucosilados, los polifenoles y las vitaminas solubles en agua. El estudio también destaca que existen por lo menos treinta esteviol glucósidos en diferentes concentraciones, que varían en proporción según el genotipo y las condiciones de cultivo. Se reporta que la producción de esteviol glucósidos varía en un rango del 5 al 22 % del peso seco de la hoja.

El esteviósido y el rebaudiósido A (Figura 1) son compuestos que puede tener un poder edulcorante de 100 a 400 veces mayor a la de la sacarosa (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012; Wölwer-Rieck, 2012). La

Artículos

proporción de estos dos esteviosidos puede variar del 5-22 % y para el rebaudiósido A del 25 al 54 % de los glucósidos totales. En la variedad Morita, que es una variedad mejorada la proporción de rebaudiósido es de 9.2% y la del rebaudiósido A del 61.6% (Herrera *et al.*, 2012, Ohta *et al.*, 2010; Wölwer-Riecker, 2012). La presencia de otros glucósidos minoritarios como los rebaudiósidos C, D, E y F y el

dulcósido A estar presentes en cantidades del 1 al 2 % del total de los glucósidos (Pande & Gupta, 2013). Además se reporta la presencia de otros compuestos como; vitamina A, B2, B6, carotenos, aminoácidos, carbohidratos, enzimas, ácidos orgánicos, polisacáridos y microelementos (Goyal & Goyal, 2010; Lemus-Mondaca *et al.*, 2012; Pande & Gupta, 2013; Ramirez-Jaramillo *et al.*, 2011).



Nombre	R ₁	R ₂
Esteviol	H	H
Eteviósido	Glu	Glu-1, 2-Glu
Rebaudiósido A	Glu	Glu-1, 2-Glu 1, 3-Glu
Rebaudiosido B	H	Glu-1, 2-Glu 1, 3 Glu
Rebaudiósido C	Glu	Glu-1, 2- Ram 1, 3-Glu
Rebaudiosido D	Glu-1, 2-Glu	Glu1-,2-Glu 1,3-Glu
Rebaudiósido E	Glu-1, 2-Glu	Glu-1, 2-Glu
Rebaudiósido F	Glu	Glu-1, 2-Xil 1,3-Glu
Dulcósido A	Glu	Glu-1, 2-Ram

Fig. 1. Estructura química de los principales esteviosidos presentes en *Stevia rebaudiana* Bertoni, Glc Glucosa, Ram Ramnosa, Xil Xilosa (Adaptado de Woelwer-Rieck *et al.*, 2010).

El rendimiento de los compuesto edulcorantes de *Stevia* depende del genotipo, del método de propagación de la planta y de las técnicas agronómicas empleadas (Wölwer-Riecker, 2012; Pande & Gupta, 2013). La planta se puede propagar naturalmente mediante esquejes y por semillas. En el primero de los casos, se corre el riesgo fitosanitario de propagar plantas contaminadas con enfermedades. En el caso de propagación por semillas, éstas presentan una baja viabilidad y un bajo porcentaje de germinación, entre el 10 y el 38 % (Shahid *et al.*, 2014). En este sentido, es indispensable desarrollar programas de selección de plantas con mejores características fenológicas y con un perfil químico deseable para satisfacer las necesidades de los productores. Las herramientas biotecnológicas basadas en la micropropagación de la planta por cultivo de tejidos vegetales, representan una herramienta potencial para la propagación y mejoramiento de la planta de *S. rebaudiana* (Osman *et al.*, 2013).

PROPAGACIÓN IN VITRO DE *Stevia rebaudiana* Bertoni.

La multiplicación masiva de las plantas *in vitro* permite la reproducción de un genotipo específico, sin que se presente segregación de caracteres genéticos, lo que se observa inevitablemente durante la propagación sexual por semillas. En la actualidad, la micropropagación se está aplicando con gran éxito en una gran gama de cultivos hortícolas, ornamentales, frutales

y forestales (Orellana, 1998; Evans *et al.*, 2003). Arriaga & Larqué (2001), señalan que para México, el 52 % de las empresas biotecnológicas en el sector agropecuario, utilizan tecnologías de cultivo de tejidos vegetales. Las características que presenta el cultivo de *in vitro* para la multiplicación de plantas son: a) el uso de pequeños segmentos de la planta (explantes), que son el punto de partida para el inicio del cultivo, manteniendo condiciones de asepsia, b) se obtiene un gran número de plántulas en corto tiempo, en comparación con la propagación por esquejes, c) el crecimiento es continuo a lo largo del año, sin hacer diferenciación por las estaciones climáticas al crecer en cuartos controlados, d) se requiere menos espacio y mantenimiento para la propagación que en los métodos tradicionales, e) se asegura la calidad sanitaria de las plantas (Orellana, 1998; Evans *et al.*, 2003).

S. rebaudiana es una planta que ha sido estudiada para su multiplicación por sistemas *in vitro*. En la Tabla 1, se muestra una síntesis de los trabajos sobre la micropropagación y aclimatación con *S. rebaudiana* en los últimos cinco años. De la revisión de los reportes destaca el uso de la variedad criolla, además de que el medio de cultivo utilizado es el de Murashige & Skoog (1962), con el empleo de reguladores de crecimiento del tipo auxinas y citocininas. La organogénesis es la vía de propagación reportada en todos los casos, utilizando preferentemente como fuente de explante segmentos nodales, si bien también se reporta el uso de yemas apicales y hojas

Artículos

Tabla 1. Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni en diferentes sistemas.

Explantes	Medio	Reguladores del crecimiento*	Sistema	Tasa de multiplicación (Brotos/explante)	Sustrato de aclimatación	Sobrevivencia de plantas (%)	Referencias
Segmento nodal y yema axilar	MS	BA, AIB, KIN, AIA.	Frascos Gerber	11	Tierra, abono, arena.	82	Das <i>et al.</i> , 2011
Yema axilar	MS	BA, AIB, AIA, ANA.	Tubos de ensayo	21.6	Tierra, vermiculita.	No reportado	Preethi <i>et al.</i> , 2011
Hoja cotiledonar	MS	BA, AIB, KIN, CCO.	Tubos de ensayo	No reportado	Tierra, soilrite.	92.3	Dey <i>et al.</i> , 2013
Segmento nodal	MS	BA, AIB, KIN, AIA, ANA.	Frascos Gerber	17.5	Tierra, arena, vermiculita.	94.8	Verma <i>et al.</i> , 2011
Segmento nodal	MS	BA, KIN, TDZ, AIA, ANA.	Frascos Gerber	9.48	Tierra, Peat moss®, vermiculita.	97.0	Soliman, 2013
Segmentos nodales	MS	BA, AIB, AIA.	Tubos de ensayo	4.25	Tierra, abono.	67.0	Laribi <i>et al.</i> , 2012
Segmento nodal	MS	BA, AIB, KIN, AIA, NAA.	Tubos de ensayo	15.7	Tierra.	65.8	Thiyagarajan & Venkatachalam, 2012
Segmento nodal y apicales	MS	BA, ANA.	Frascos Gerber	6	Peat moss®, agrolita®.	75.0	Vargas Gutiérrez, 2012
Segmentos nodales	MS	AG ₃	RITA® y BIT®	14.2	No realizado	No realizado	Jiménez Quesada, 2011
Segmentos nodales	MS	BA, KIN, AIB	Tubos de ensayo	3.42	Tierra, arena, Peat moss®	90	Jitendra <i>et al.</i> , 2012
Segmentos nodales	MS	AIA, BA, KIN	Frascos Gerber	2.68	Turba	Más del 80	Vásquez-Baxcajay <i>et al.</i> , 2014

Artículos

Segmentos nodales	MS	BA, KIN, ANA	Tubos de ensayo	9.31	Tierra, arena , vermicompost	80	Chotikadachanarong & Dheeranupattana, 2013
Yema axilar y apical	MS	BA, KIN, ANA, AIA	Tubos de ensayo	8.6	Arena, tierra, turba	90	Ali <i>et al.</i> , 2010
Microtallos	MS	BA, Zeatin, AIB, AIA, ANA	Matraz	8.9	Turba, perlita	90	Shatnawi <i>et al.</i> , 2011
Brotos apicales y Segmentos Nodales	MS	BA, KN, IBA	Frascos Gerber, matraz, frasco de plástico	9.56	No reportado	Más 80	Modi <i>et al.</i> , 2012
Segmentos Nodales	MS	BA, KIN, AIB	Frascos Gerber	5.28	Coco picado, arena	80	Autade <i>et al.</i> , 2014
Segmentos Nodales	MS	BA, KIN, AIB, ANA	Tubos de ensayo, frascos Gerber	36.9	Peat moss®, Arena	75	Mohamed, 2011
Segmentos nodales, brotes apicales y segmentos internodales.	MS	BA, KIN, AIB, AG ₃ , 2,4-D, ANA. AIA	Tubos de ensayo, matraz	3.0	Tierra y arena	No reportado	Singh <i>et al.</i> , 2013

* BA: benciladenina; AIB: ácido-3-indolbutírico; KIN: cinetina; CCO: cloruro de clorocolina; AIA: ácido indolacético; ANA: ácido naftalenacético; TDZ: tiazurón; AG₃: ácido giberélico; Zeatin: zeatina; 2,4-D: ácido 2,4 diclofenoxicético.

Artículos

cotiledonares. El cultivo en medio semisólido es la condición de mayor uso, empleando para ello frascos tipo Gerber y tubos de ensayo como recipientes. Solamente Jiménez-Quezada (2011) y Alvarenga-Venutolo y Salazar-Aguilar (2015), reportaron el uso de medios líquidos en sistemas de inmersión temporal (SIT) empleando biorreactores del tipo RITA® y BIT®. La tasa de multiplicación más altas obtenidas en los sistemas semisólidos son las reportadas por Mohamed (2011), Preethi *et al.* (2011), Verma *et al.* (2011) y Thiyagarajan & Venkatachalam (2012), con valores de 36.9, 21.6, 17.5 y 15.7 brotes/explante, respectivamente. Mientras que en los sistemas líquidos (SIT), Jiménez-Quesada (2011) y Alvarenga-Venutolo y Salazar-Aguilar (2015), reportan un valor de

14.1 y 14.2 brotes/explante, respectivamente. La adaptación de las plantas se en diferentes sustratos, con un porcentaje de sobrevivencia superior al 60%.

La tasa de multiplicación de plantas de stevia obtenida con el medio semisólido puede ser más alta que la obtenida con los SIT y la calidad de las plantas resulta diferente (Figura 2). El cultivo de microestacas de *S. rebaudiana* en un sistema SIT con 10 minutos de inmersión cada 12 horas, regeneró plantas de vigor elevado, con mayor incremento en longitud, masa fresca y masa seca promedio y con baja hiperhidricidad, lo que favoreció la aclimatación (Alvarenga-Venutolo y Salazar-Aguilar, 2015).

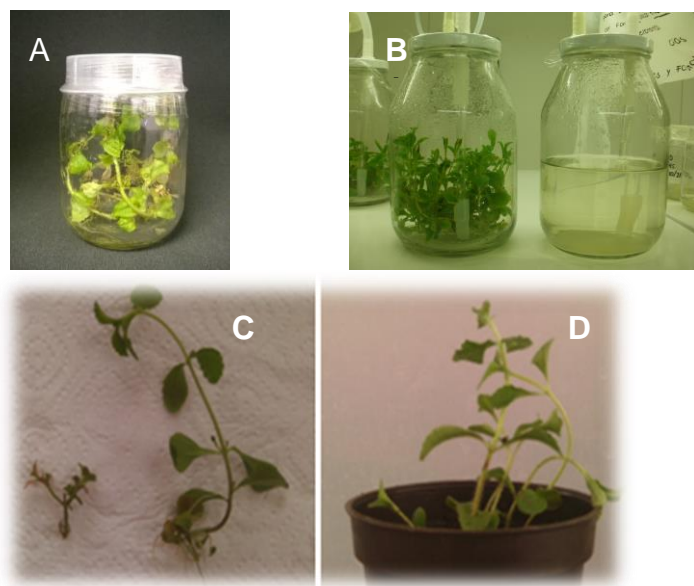


Fig. 2. Aspecto de las plántulas cultivadas *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni. A. Propagación mediante medio semisólido en frascos tipo Gerber. (B) Propagación mediante sistema de biorreactores de inmersión temporal (SIT). C. Comparación del desarrollo de las plantas en medio semisólido (izquierda) y en SIT (derecha). D. Plántula aclimatada.

Artículos

Los sistemas de inmersión temporal (SIT) basan su funcionamiento en el contacto del medio de cultivo con los explantes por intervalos de tiempos regulares, por medio del bombeo de aire limpio a través de un filtro. Este método permite que el exceso de líquido en los explantes se drenen por gravedad al finalizar el bombeo y éstos se mantengan húmedos (Santos Pino *et al.*, 2011; Steinmach *et al.*, 2011). Este tipo de sistemas reduce los costos de la propagación *in vitro* hasta en un 46% con respecto al medio semisólido. Además, es importante resaltar que el uso de este método reduce la mano de obra, al igual que el espacio, lo que facilita la propagación a gran escala, generando un aumento en la productividad y calidad del material propagado. Los SIT pueden constituirse como una alternativa de micropropagación a corto plazo, mientras que a largo plazo se logran vencer obstáculos biológicos que permitan la obtención eficiente de plántulas; también se logra prevenir la anoxia o falta de oxígeno en el medio, controla el ambiente gaseoso en cada inmersión y facilita la renovación de medio.

Como se mencionó anteriormente, los SIT comprenden los “biorreactores de inmersión temporal o twin flasks system” (BIT®) y el “recipiente de inmersión temporal automatizado o recipient for automated temporary immersion system” (RITA®). (Jiménez Quesada, 2011; Santos Pino *et al.*, 2011). El sistema BIT es diseñado con dos recipientes transparentes de vidrio o plástico de un litro de capacidad, uno de los cuales contiene el material vegetal de interés y el

otro sirve como contenedor del medio de cultivo líquido. Los dos recipientes se conectan mediante mangueras de silicona, el flujo de aire pasa a través de microfiltros de 0.2 µm. La presión que ejerce el aire permite que el medio líquido pase de un recipiente a otro, sumergiendo totalmente las plántulas. Posteriormente el flujo de aire se invierte para devolver el medio líquido a su recipiente de origen, este proceso es controlado mediante válvulas de solenoide y temporizadores, que facilitan establecer el tiempo de contacto o inmersión de las plántulas con el medio líquido.

Este sistema “BIT” ha demostrado solucionar algunos problemas habituales que se presentan en la micropropagación tradicional en medio líquido y semi-sólido, tales como la hiperhidricidad, baja calidad de los propágulos y se evita transplantar o multiplicar las plántulas. En la figura 3 se muestra el ciclo de operación del biorreactor de inmersión temporal “BIT” (Escalona *et al.*, 2003).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Stevia rebaudiana es una planta con interés industrial gracias al contenido de edulcorantes. Existe el potencial interés para el cultivo de esta planta en México. El uso de sistemas de micropropagación representa una alternativa viable para la propagación masiva de plantas libres de patógenos y que conserven la producción de los glucósidos de interés. Sin embargo, se necesita mejorar protocolos para la micropropagación de *S. rebaudiana*, que permitan aumentar la tasa

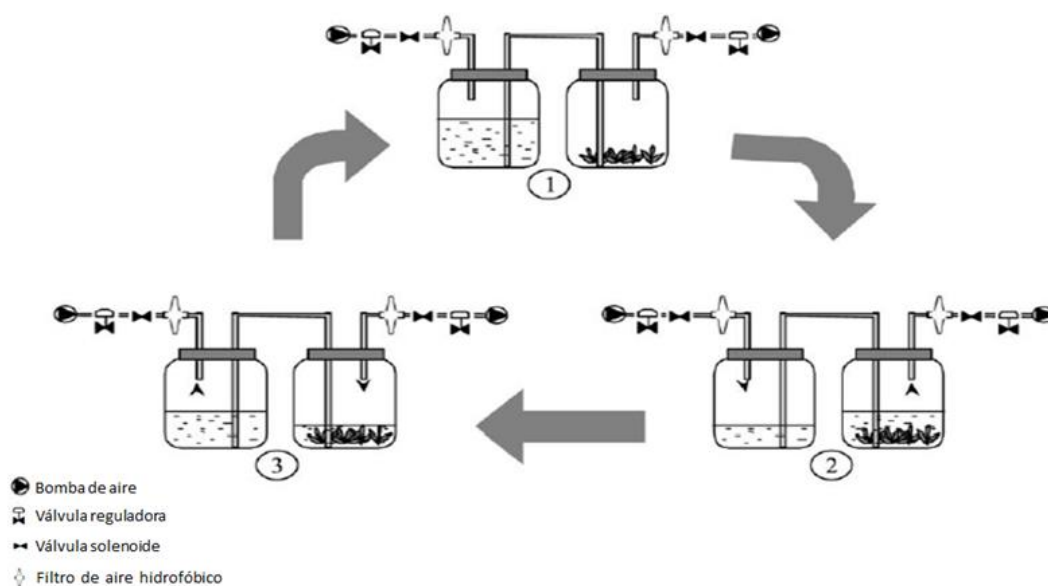


Fig. 3. Sistema y operación de un biorreactor de inmersión temporal "BIT". 1. Inicio del ciclo de inmersión de los explantes. 2. Inmersión o paso del medio de cultivo del frasco reservorio al frasco donde están los explantes. 3. Retorno del medio de cultivo al frasco reservorio luego de cumplir el tiempo de inmersión establecido.

de multiplicación. El empleo de sistemas de biorreactores de inmersión temporal es un proceso automatizado que provee condiciones de cultivo uniformes y controladas para la planta, se requiere de menos recipientes y se siembra una mayor cantidad de explantes por envase de cultivo que en los frascos usados en los sistemas semisólidos. Por lo que los SIT representan una alternativa que puede potenciar la generación de plantas más vigorosas, con incremento en el tamaño, mayor número de hojas y formación de raíz. Sin embargo existen algunos retos por superar, como determinar la densidad apropiada de explantes, el volumen de medio adecuado para una propagación exitosa, y el flujo de

aire en el cual las plántulas presenten un mejor comportamiento. Así mismo, es necesario realizar las pruebas de identidad molecular de las plantas y cuantificar la producción de los esteviosidos en las plantas micropropagadas.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Cooperación Técnica y Científica entre México y Costa Rica 2013-2015. "Incremento de las capacidades biotecnológicas de México y Costa Rica, para el Desarrollo de Cultivos Vegetales". El proyecto está apoyado por la SIP-IPN 20150061

Artículos

REFERENCIAS

- Ali A Gull, I Naz S & Afghan S (2010) Biochemical investigation during different stages of *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana*. *Pakistan J. Bot* 42(4): 2827–2837.
- Alvarenga S, Arnáez E, Moreira I, Alan E, Romero E & Vargas W (2008) Cultivo de *Stevia rebaudiana* (hierba dulce) en Costa Rica. En: Manejo integrado de Recursos Bióticos. Rogelio Oliver, Marisela Tabeada y Andrea Granjeno (Eds). AGT S.A. México, DF., México. pp: 73-83.
- Alvarenga-Venutolo S & Salazar-Aguilar T (2015) Micropropagación masiva de *Stevia rebaudiana* Bertoni en sistemas de inmersión temporal. En prensa. *Cultivos Tropicales*. <http://www.redalyc.org/revista.oa?id=1932>.
- Autade R, Fargade S, Borhade P, Udmale S & Choudhary R (2014) *In vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* (bert) a natural , non caloric sweetener herb. *J. Cell Tiss. Res.* 14(3):4659–4664.
- Arriaga A E & Larqué S A (2001) Diagnóstico de la situación de la biotecnología en México. en Biotecnología moderna para el desarrollo de México en el siglo XXI: retos y oportunidades. Bolivar Z F (Ed). Conacyt y Fondo de Cultura Económica.pp. 45-70.
- Barba F J, Grimi N & Vorobiev E (2015) Evaluating the potential of cell disruption technologies for green selective extraction of antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *J. Food Eng.* 149:222–228
- Carbonell-Capella J M, Buniowska M, Esteve M J & Frígola A (2015) Effect of *Stevia rebaudiana* addition on bioaccessibility of bioactive compounds and antioxidant activity of beverages based on exotic fruits mixed with oat following simulated human digestion. *Food Chem.* 184:122–130.
- Chotikadachanarong K & Dheeranupattana S (2013) Micropropagation and acclimatization of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Pakistan J. Biol. Sci.* 16(17):887–890.
- Das A, Gantait S & Mandal N (2011) Micropropagation of an elite medicinal plant: *Stevia rebaudiana* Bert. *Int. J. Agric. Res.* 6(1), 40–48.
- Dey A, Kundu S, Bandyopadhyay A & Bhattacharjee A (2013) Efficient micropropagation and chlorocholine chloride induced stevioside production of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Comp. Rend. Biol.* 336(1):17–28.
- Escalona M, Samson G, Borroto C & Desjardins Y (2003) Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. *In Vitro Cell. Developm. Biol.- Plant.* 39(6):651–656.
- Escobar Medez F de M & Hernandez Saravia R A (2012) Extracción de un edulcorante natural a no calórico a escala de laboratorio a partir de “*Stevia rebaudiana* Bertoni” y su aplicación en la industria de alimentos. Tesis para optar título de Ingeniería de alimentos. Universidad del el Salvador. El Salvador.pp.1-230.

- Evans D E, Coleman J O D & Kearns A (2003) Plant cell Culture. Bios Scientific Publisher. New York, USA
- Gantait S, Das A & Mandal N (2014) Stevia: A Comprehensive review on ethnopharmacological properties and *in vitro* regeneration. *Sugar Technol.* 17(2): 95-106.
- Goyal S K & Goyal R K (2010) Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 61:1–10.
- Herrera Cedano F, Gómez Jaines R & Gonzáles Rivas C (2012) El Cultivo de Stevia (*Stevia rebaudiana*) Bertoni en condiciones agroambientales de Nayarit, México (p. 52). Nayarit, Mexico.
- Holvoet P, Rull A, García-Heredia A, López-Sanromà S, Geeraert B, Joven J & Camps J (2015) Stevia -derived compounds attenuate the toxic effects of ectopic lipid accumulation in the liver of obese mice: A transcriptomic and metabolomic study. *Food and Chemical Toxicology* 77: 22–33.
- Jarma-Orozco A de J (2010) Adaptación de dos clones de Estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) En tres ambientes del caribe Colombiano. Tesis de doctorado en Ciencias agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C.pp.1-92.
- Jiménez-Quesada K M (2011) Evaluación del desarrollo *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni con el empleo de sistemas de propagación semi-sólido, inmersión temporal RITA y Biorreactor de burbujeo. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Informe final para optar título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología. Cartago, Costa Rica. 1-104.
- Jitendra M, Monika S, Dev Ratan S, Priyanka G, Priyanka S & Jayraj Kiran D (2012) Micropropagation of an anti diabetic plant- *Stevia rebaudiana* Bertoni, (Natural Sweetener) in Hadoti Region of South-East Rajasthan, India. *ISCA J. Biol. Sci.* 1(3): 37–42.
- Laribi B, Rouatbi N, Kouki K & Bettaieb T (2012) *In vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* (Bert.) - A non caloric sweetener and antidiabetic medicinal plant. *Int. J. Med. Arom. Plants.* 2(2):333–339.
- Langle A., González-Coronel M A, Carmona-Gutiérrez G, Moreno-Rodríguez J A, Treviño S & Díaz A (2015) *Stevia rebaudiana* loaded titanium oxide nanomaterials as an antidiabetic agent in rats. *Rev. Brasileira Farmacog.* 25:145–151.
- Lemus-Mondaca R, Vega-Gálvez A, Zura-Bravo L & Ah-Hen K (2012) *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chem.* 132(3):1121–1132.
- Modi A R, Patil G, Kumar N, Singh A S & Subhash N (2012) A Simple and efficient *in vitro* mass multiplication procedure for *Stevia rebaudiana* Bertoni and analysis of genetic fidelity of *in vitro* raised plants through RAPD. *Sugar Technol.* 14(4):391–397.
- Mohamed R A (2011) Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. A new sweetening crop in Egypt. *Global J. Biotechnol. Biochem.* 6(4):178–182.
- Murashige T & Skoog F (1962) A Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 15(3), 473–497.
- Ohta M, Sasa S, Inoue A, Tamai T, Fujita I, Morita K & Matsuura F (2010)

- Characterization of Novel Steviol Glycosides from leaves of *Stevia rebaudiana* Morita. *J. Appl. Glycosci.* 57:199-209.
- Osman M, Samsudin N S, Faruq G & Nezhadahmadi A (2013) Factors affecting microcuttings of *Stevia* using a mist-chamber propagation box. *The Sci. World J.* ID. 940201.
- Orellana P (1998) Introducción a la propagación masiva. en Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de Planatas, Santa Clara. Cuba. Pérez-Ponce J (ed), pp. 125-133.
- Pande S S & Gupta P (2013) Plant tissue culture of *Stevia rebaudiana* (Bertoni): A review. *J. Pharmacog. Phytother.* 5:26–33.
- Preethi D, Sridhar T M & Naidu C V (2011) Carbohydrate concentration influences on *in vitro* plant regeneration in *Stevia rebaudiana*. *J. Phytol.* 3 (5):61–64.
- Ramírez-Jaramillo G (2011) Programa estratégico para el desarrollo rural sustentable de la región Sur- Sureste de México: Trópico húmedo 2011. Paquete Tecnológico Estevia (*Stevia rebaudiana*) Establecimiento y mantenimiento. (pp. 0–15). Yucatán.
- Ramírez-Jaramillo G, Avilés Baeza W I, Moguel Ordoñez Y B, Góndora Góonzales S F & May Lara C (2011) Estevia (*Stevia rebaudiana*, Bertoni), un cultivo con potencial productivo en México. En *Estevia (Stevia rebaudiana, Bertoni)*, un cultivo con potencial productivo en México. Moguel Ordoñez Y, Ramirez Jaramillo B G, Góndora Góonzales S F (Eds). Primera edición. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Mérida, Yucatán, México pp. 65–70.
- Ramya M, Manogaran S, Joey K, Keong T W & Katherasan S (2014) Studies on biochemical and medicinal properties of *Stevia rebaudiana* grown *in vitro*. *Int. J. Res. Ayurveda Pharm.* 5(2): 169-174.
- Santos Pino A, Cabrera Jova M , Gómez Kosky R, López Torres J, Rayas Cabrera A, Basail Pérez M & Beovides Graía Y (2011) Multiplication in temporary immersion system cocoyam clone “ Viequera ” (*Xanthosoma spp.*). *Rev. Colomb. Biotecnol.* 13(2):97–106.
- Shahid Akba K, Roshan Z & Nisar A (2014) Selection of suitable propagation method for consistent plantlets production in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Saudi J. Biol. Sci.* 21(6):566-573.
- Shatnawi M, Shibli R, Abu-Romman S M, Al-Mazra’awi M S, Al Ajlouni Z I, Shatanawi W, Odeh W H (2011) Clonal propagation and cryogenic storage of the medicinal plant *Stevia rebaudiana*. *Spanish J. Agric. Res.* 9(1):213–220.
- Shivanna N, Naika M, Khanum F & Kaul V K (2013) Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. *J. Diabet. Complic.* 27(2):103–13.
- Singh P, Dwivedi P & Atri N (2013) *In vitro* shoot multiplication of *Stevia* and assessment of stevioside content and genetic fidelity of the regenerants. *Sugar Technology.* 16(4):1–10.
- Soliman I A H (2013) Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni and assessment of genetic stability of *in vitro* regenerated plants using inter simple sequence repeat (ISSR) marker. *Archives Des Sciences.* 66(3):343–359.

Artículos

- Steinmacher D A, Guerra M P, Lieberei R & Saare-Surminski K (2011) A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Ann. Bot.* 108:1463–1475.
- Thiyagarajan M & Venkatachalam P (2012) Large scale *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* (bert) for commercial application: Pharmaceutically important and antidiabetic medicinal herb. *Ind. Crops Prod.* 37(1):111–117.
- Vargas Gutierrez L. (2012). Propagación y adaptación *ex vitro* de plantas de *Stevia sp.* Tesis para obtener titulo de Tecnico superior en Quimica Área Biotecnología. Universidad Tecnológica de Xicotepec de Juárez.Puebla, Mexico.pp.1-51.
- Vásquez-Baxcajay L, Robledo-Paz A, Muratalla-Lúa A & Conde-Martínez V (2014) Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni, and steviosides detection. *Bioagro.* 26(1): 49–56.
- Verma S, Yadav K & Singh N (2011) Optimization of the protocols for surface sterilization, regeneration and acclimatization of *Stevia rebaudiana* Bertoni, *American-Eurasian J. Agric. & Environm. Sci.* 11(2): 221–227.
- Woelwer-Rieck U, Lankes C, Wawrzun A & Wüst M (2010) Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. *Eur. Food Res. Technol.* 231:581–588.
- Wölwer-Rieck U (2012) The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: a review. *J. Agric. Food Chem.* (60):886–895.