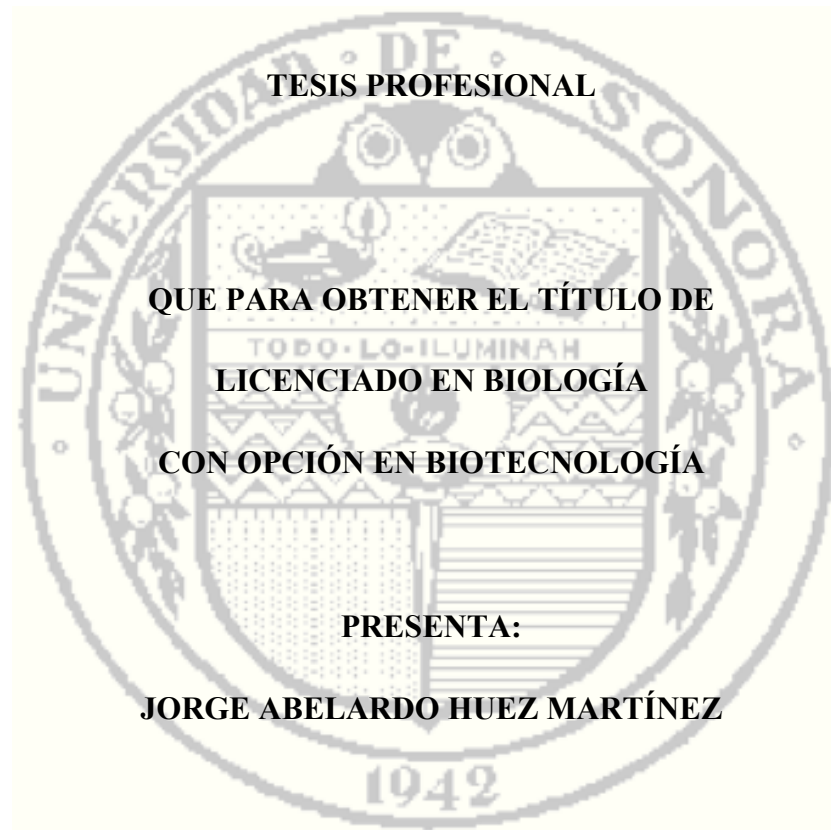


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

PROLIFERACIÓN DE *Stevia rebaudiana* BERTONI IN VITRO



HERMOSILLO, SONORA

Marzo de 2013

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la Tesis de **Jorge Abelardo Huez Martínez**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito para obtener el Título de **Licenciado en Biología** con Opción en Biotecnología

Dra. Gloria Irma Ayala Astorga
Director de Tesis

Dr. Rubén Armando Corella Bernal
Sinodal Secretario

M.C. Damián Martínez Heredia
Sinodal

Dra. Ángela Corina Hayano Kanashiro
Sinodal Suplente

DEDICATORIA

A mí querida Familia

Viridiana mi esposa y mi hijo Santiago por ser mi motor en la vida y por ser pacientes son una gran inspiración en mi vida

A mis padres, Marco y Alba por creer en mí en todo momento, por sacarme adelante en todas las etapas de la vida, y ver alcanzada mí meta son un gran ejemplo

A mis hermanos, Marco, Alba y Valeria por estar conmigo siempre apoyando

Y a mi sobrina Natalia.

Muchas gracias

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora por ser la institución responsable de mi formación académica.

Al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas del la Universidad de Sonora.

A la Dra. Gloria Irma Ayala Astorga, por darme la oportunidad de ser su alumno, y ser paciente. Gracias por sus enseñanzas en la materia de cultivo de tejidos vegetales, gracias a esa clase supe lo que realmente quería en la licenciatura de biología.

A los integrantes de mi comité de tesis, Dr. Rubén Armando Corella Bernal, gracias por su apoyo y correcciones; M.C. Damián Martínez Heredia, gracias por la enseñanza en el área de cultivo de tejidos en la escuela de agronomía; Dra. Ángela Corina Hayano Kanashiro por su valiosa aportación académica y aunque tenemos poco de conocernos me dio su gran apoyo, gracias a todos por su aportaciones en la formación de mi tesis de licenciatura.

A Mitzi Abigail por ser mi compañera de clases y laboratorio en cultivos de tejidos.

A toda mi Familia por estar siempre al pendiente de mi titulación

A mis compañeros del Z11 por todos los momentos juntos, vamos equipo.

A mis suegros y cuñado por el gran apoyo, gracias

Y gracias a Dios por acompañarme todos los días.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. ANTECEDENTES	4
II.1 <i>Stevia rebaudiana</i>	4
II.2. Clasificación	4
II.3. Características	5
II.4. Seguridad de Estevia Como Edulcorante	6
II.5. Edulcorantes Artificiales	6
II.5.1 Daños por edulcorantes artificiales	8
II.6. Usos de Estevia	9
II.7. Comercialización	10
II.8 Estevia en México	11
II.8.1 Condiciones climatológicas en Sonora	11
II.9. Micropropagación	13
II 9.1. Técnicas de cultivo in vitro de Estevia	14
III. JUSTIFICACIÓN	15
IV. HIPÓTESIS	16
V. OBJETIVO GENERAL	17
V.1. Objetivos específicos	17
VI. METODOLOGÍA	18
VI. 1. Material Vegetal	18
VI.2. Desinfección y Siembra	19
VI.3. Medio de Cultivo	19

VI.4 Cortes Vegetativos	19
VI.5. Tratamientos	22
VI.6. Siembra e Incubación de los Tratamientos AIB y BAP	22
VI.7. Selección de Tratamiento BAP	24
VI.8. Siembra e incubación en el Tratamiento con BAP	24
VI.9. Registro de Datos	26
VI.10. Diseño Experimental	26
VII. RESULTADOS	27
VII.1. Germinación de semillas de <i>Stevia rebaudiana</i>	27
VII.2. Tratamiento con Ácido-indol-3-butírico y 6-Bencilaminopurina	27
VII.3. Experimento con diferentes concentraciones de 6-Bencilaminopurina	29
VIII. DISCUSIÓN	31
IX. CONCLUSIONES	33
VII. LITERATURA CITADA	34

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Edulcorantes artificiales (Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994 para la prevención, tratamiento y control de la diabetes, Diario Oficial de la Federación 15 de Diciembre de 1999).	7
II	Índice de consumo diario de edulcorantes artificiales. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Organización Mundial de la Salud (OMS).	8
III	Composición de nutrientes del medio de cultivo basal Woody Plant Medium (WPM).	20
IV	Concentraciones de los reguladores de crecimiento AIB y BAP (M).	22
V	Efecto de los reguladores de crecimiento AIB-BAP (M) sobre el crecimiento (cm) de estevia en cuatro semanas de incubación.	28
VI	Efecto de la 6-bencilaminopurina (M) sobre muestras de <i>Stevia rebaudiana</i> en 30 días de incubación.	30

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Origen de la planta <i>Stevia rebaudiana</i> Mapa de Departamento de Amambay, Paraguay.	5
2	Temperaturas óptimas y subóptimas en México para la producción de stevia.	12
3	Semillas maduras e inmaduras de <i>Stevia rebaudiana</i> .	18
4	Cortes vegetativos: a) Selección de la planta. b) cortes de los entrenudos. c) Cortes en forma de Y en plantas de stevia.	21
5	Figura 5. Crecimiento obtenido de las muestras en el medio de cultivo: a) BAP 5 M. b) BAP 10 M. c) AIB 2.5 M. d) AIB 5 M.	23
6	Crecimiento observado de <i>Stevia rebaudiana</i> en medio de cultivo con BAP.	25
7	Efecto de 0 M AIB con 5 M BAP y 0 M de AIB con 10 M BAP sobre el crecimiento (cm) de <i>Stevia rebaudiana</i> en cuatro semanas de incubación.	29
8	Promedio de crecimiento (cm) de las muestras en las concentraciones de 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 M de BAP en 15 y 30 días de incubación.	30

RESUMEN

Stevia rebaudiana Bertoni es una hierba nativa de Paraguay, sus hojas contienen glucósidos que son compuestos intensamente dulces con cero valor calórico. Su uso es para el control de azúcar en la sangre y algunas enfermedades como la diabetes, fenilcetonuria y el sobrepeso. Debido a que esta planta se puede adaptar a temperaturas extremas (-5 a 43 °C), es posible su establecimiento en gran parte del territorio nacional; además, la concentración de esteviósido se incrementa si la planta se encuentra en una región con una exposición de mayor radiación solar y duración del día como los que se observan en el Estado de Sonora, por lo que podría adaptarse muy bien en dicho Estado. Debido a la baja tasa de germinación de sus semillas, se aprovechó la técnica de cultivo de tejidos para la propagación vegetativa, la cual permitió obtener una rápida multiplicación clonal de plantas y con la adición de reguladores de crecimiento se observó una mejoría en las plantas obtenidas. Se realizaron dos experimentos con la finalidad de evaluar el crecimiento, cuantificar el crecimiento de explantes de *Stevia rebaudiana* vía técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*. Los explantes fueron seleccionados de plantas obtenidas de semillas de estevia germinadas en el medio de cultivo basal Woody Plant Medium (WPM). En el primer experimento se evaluó el efecto de la adición de dos reguladores de crecimiento al medio de cultivo en diferentes concentraciones: 6-Bencil-amino-purina (BAP) y Ácido-indol-3-butírico (AIB) sobre el crecimiento de brotes de *S. rebaudiana*. Se observó que los explantes sometidos en los medios de cultivo conteniendo el regulador de crecimiento BAP promovieron mayor crecimiento de brotes, debido a estos resultados se estableció el segundo experimento que consistió en determinar el efecto de diferentes concentraciones de BAP sobre yemas de estevia, observándose un mejor crecimiento con 5M y 25 M de BAP.

I. INTRODUCCIÓN

Estevia (*Stevia rebaudiana*) pertenece a la familia Asteraceae, es una planta tropical de mucho valor debido a que contiene el compuesto esteviósido, el cual es un endulzante natural que se extrae de sus hojas. Es originaria de Sudamérica (Katayma et al., 1976) y se puede encontrar en lugares semiáridos, pastizales, bosque de matorral y terrenos montañosos. Existen más de 180 especies de stevia, que contiene esta esencia edulcorante (Soejarto et al., 1982). El esteviósido es una alternativa natural a sustitutos de azúcar artificiales ya que no causa problemas químicos durante el proceso digestivo, su uso es seguro para el control de azúcar en la sangre (Strauss, 1995).

S. rebaudiana tiene hojas elípticas, ovales y presentan disposición opuesta en sus estados juveniles y son alternas cuando las plantas llegan a su madurez fisiológica, previa a la floración. La flor es hermafrodita, pequeña y blanquecina; su corola es tubular, pentalobulada, en capítulos pequeños, terminales o axilares, agrupados en panículas corimbosas (Shock, 1982). La raíz es pivotante, filiforme y poco profunda, distribuyéndose cerca de la superficie. El crecimiento de la planta es afectado por la radiación, duración del día, temperatura, suelo y el viento (Singh et al., 2006). El clima ideal para stevia varía de un rango entre -6.0 a 43 °C, con una temperatura promedio de 23 °C, en un clima subtropical semihúmedo (Brandle y Rosa, 1992). Los días prolongados incrementan la longitud de los entrenudos, el área de la hoja y las concentraciones de glucósidos (Metivier y Viana, 1979).

Las semillas de estevia muestran un porcentaje de germinación muy bajo (Miyazaki y Wantenabe, 1974), su reproducción proporciona una población no homogénea que da como resultado una gran variabilidad de aspectos importantes como la composición y niveles de la esencia edulcorante (Tamura et al., 1984).

El cultivo de tejidos es un método de propagación vegetativa que permite plantaciones uniformes; además, se obtiene una rápida multiplicación clonal (Yang y Chang, 1979; Marcavillaca, 1985). La propagación in vitro o micropropagación se define como cualquier procedimiento aséptico que comprende la manipulación de órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas en condiciones asépticas, contrario a la propagación vegetativa no aséptica (Ayerbe, 1990). Algunos autores han sugerido que uno de los problemas

en este tipo de propagación es la contaminación que se presenta (Hurtado y Merino, 2001), sin embargo, las ventajas de la micropropagación, en comparación con otros sistemas, son un mayor control de la sanidad, el incremento acelerado del número de plantas, la disminución del tiempo de multiplicación, un mayor número de plantas por superficie utilizada y la posibilidad de multiplicar rápidamente especies en peligro de extinción (Ayerbe, 1990).

Independientemente del tejido o células utilizadas en este tipo de propagación asexual, generalmente son tomados los mismos enfoques para optimizar el crecimiento y la sobreproducción de biomasa, los cuales se logran utilizando diferentes concentraciones del nutriente principal o con la combinación de varias fitohormonas a la vez (Weathers et al., 2010).

Las fitohormonas o reguladores de crecimiento de las plantas son los componentes críticos que son adicionadas al medio de cultivo, las cuales determinan la secuencia del desarrollo de las células de la planta, entre éstas las más comúnmente utilizadas son las auxinas y citocininas (Slater et al., 2008), donde, las primeras promueven la división celular y el desarrollo de la célula mientras que las segundas promueven la división celular.

Las citocininas regulan el crecimiento de las plantas de diferentes maneras, la regulación que ejerce sobre la división celular, es quizás la mas importante, también estimula la síntesis de ADN (Ting, 1982).

La aplicación de 6-bencilaminopurina (BAP) retrasa la senescencia foliar, promueve la acumulación de ácido ascórbico, el cual constituye uno de los mecanismos de retraso de senescencia mediante el aumento del antioxidante, incrementando la protección al daño de membranas durante la senescencia foliar (Wilson-García et al., 2008).

Las auxinas modifican las pautas normales de desarrollo de las plantas y pueden ayudar a incrementar la productividad, mejorar la calidad del cultivo, facilitar la recolección del fruto, entre otras. Algunas auxinas utilizadas son AIB, ANA, 4-CPA (Acosta et al., 2008).

Por lo anteriormente mencionado, es necesario el establecimiento de una metodología para cuantificar el crecimiento de explantes de *S. rebaudiana* vía técnicas de cultivo de tejidos, así como determinar el efecto de diferentes reguladores de crecimiento para obtener plantas con mejores características.

II. ANTECEDENTES

II.1 *Stevia rebaudiana*

Stevia rebaudiana, cuyo nombre común es hierba dulce, es una planta que contiene un edulcorante natural no calórico llamado esteviósido, el cual es hasta 300 veces más dulce que la sacarosa o azúcar de caña; es el más parecido al azúcar entre todos los edulcorantes naturales, distinguiéndose de los artificiales por no tener un sabor metálico y no ser cancerígeno (Galván y Guzmán, 2003). Descrita por primera vez por el naturalista suizo Moisés Bertoni en 1887, pero analizada químicamente en 1900 por el químico paraguayo Ovidio Rebaudi, estudio en el cual se descubrió el glucósido edulcorante llamado esteviosido.

II.2. Clasificación

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Subfamilia	Asteroideae
Género	<i>Stevia</i>
Especie	<i>rebaudiana</i>

(Soejarto et al., 1982).

II.3. Características

La estevia, conocida comúnmente, como la hierba dulce, crece naturalmente en el noroeste de Paraguay, en el Departamento de Amambay (Figura 1), donde se han encontrado poblaciones a 198 metros sobre el nivel del mar aproximadamente. Puede crecer en suelos infértiles, ácido arenoso, en clima caracterizado como semihúmedo tropical con temperaturas extremas de 43°C a -6 °C con una temperatura anual de 23 °C y una precipitación anual de 1397 mm.

En su hábitat natural esta planta es una hierba perenne que crece hasta 60 cm de altura, permanece vegetativa desde la primavera al verano y florece de finales de verano a principios de otoño, sus brotes mueren generalmente después de madurar o con las heladas, dejando las raíces activas para la próxima primavera (Shock, 1982; Brandle y Rosa, 1992). El aumento de la radiación solar genera un incremento en el área foliar de la planta, induciendo alto incremento en la materia seca de la hoja, sugiriendo que en días prolongados con más radiación solar, se incrementan la longitud de los entrenudos, el área de la hoja y las concentraciones de glucósidos (Metivier y Viana, 1979; Jarma et al., 2005).



Figura 1. Origen de la planta *Stevia rebaudiana* Mapa del Departamento de Amambay, Paraguay

II.4. Seguridad de Estevia Como Edulcorante

Existe mucha controversia sobre la planta de estevia o hierba dulce, en lo que se refiere a los resultados sobre los efectos de la planta al ser consumidas por animales, ya que estudios realizados en ratas de laboratorio proporcionaron resultados de infertilidad de los animales y esterilidad al consumir grandes cantidades del esteviósido, así como peligroso para seres humanos, sin embargo, estudios recientes indicaron claramente que *S. rebaudiana* no presentó efecto tóxico en la reproducción de ratas hembras (Kanokporn et al., 2006).

La planta de estevia se ha utilizado como edulcorante, así como en pacientes con diabetes, y PKU (fenilcetonuria), como suplemento en dietas para pacientes con sobrepeso y no se ha observado reacción alérgica (Geuns, 2002).

La Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA) no había permitido el uso de la hoja o extracto de estevia porque su sustancia no había sido aprobada como uso de aditivo en la alimentación, debido a que existían publicaciones que mostraban inquietudes en el uso de la sustancia, pero por publicaciones en trabajos recientes, se ha autorizado el uso de un compuesto extraído de la hoja de estevia: la Rebiana (rebaudiósido A, 97% puro), el cual es muy utilizado como edulcorante en una gran variedad de productos como cereales, barras de energía, bebidas dietéticas, jugos, tés entre otros (U.S. Food and Drug Administration 2009).

II.5. Edulcorantes Artificiales

La Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994 para la prevención, tratamiento y control de la diabetes, en la sección de definiciones señala: Los edulcorantes nutritivos aportan energía a la dieta e influyen sobre los niveles de insulina y glucosa. Los edulcorantes no nutritivos son endulzantes potentes, su aporte energético es mínimo y no afectan los niveles de insulina o glucosa sérica, entre ellos están: sacarina, aspartame, acesulfame de potasio y sucralosa (Tabla I) (Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994 para la prevención, tratamiento y control de la diabetes, Diario Oficial de la Federación 15 de Diciembre de 1999). Lo anterior sugiere

que en nuestro país se acepta el consumo de edulcorantes artificiales como alternativa al azúcar para las personas que necesitan regular su consumo por problemas de salud.

Tabla I. Edulcorantes artificiales (Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994 para la prevención, tratamiento y control de la diabetes, Diario Oficial de la Federación 15 de Diciembre de 1999).

Sustancia	Características
Sacarina	300 veces más dulce que el azúcar, es el edulcorante más antiguo (1879), era el sustituto de azúcar por excelencia capaz de endulzar sin liberar ninguna caloría. Sin embargo la sacarina deja un sabor amargo y metálico en la boca.
Aspartame	200 veces más dulce que el azúcar. Descubierta en 1965 es el más exitoso edulcorante, es limitado en su tendencia a descomponerse, a temperatura ambiente se descompone 10% al mes, al incrementar la temperatura se acelera la velocidad de descomposición, por lo que no se puede utilizar en comidas y bebidas calientes.
Sucralosa	Se descubrió en 1976, es 600 veces más dulce que el azúcar, es el único edulcorante de bajas calorías que se fabrica a partir del azúcar, pasa por el organismo sin sufrir cambios y es eliminada por la orina y no es absorbida por el cuerpo.
Acesulfame-k	Fue descubierta en 1967, es 200 veces más dulce que el azúcar, tiene un sabor dulce limpio y no se metaboliza en el organismo y se excreta sin alteración en la orina.

II.5.1 Daños por edulcorantes artificiales

El exceso en el consumo de edulcorantes artificiales puede ser perjudicial para la salud, por lo que la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) establecieron un índice de consumo seguro conocido como Ingestión Diaria Máxima Aceptable (IDA) para los edulcorantes artificiales (Tabla II).

Tabla II. Índice de consumo diario de edulcorantes artificiales. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Organización Mundial de la Salud (OMS).

SUSTANCIA	CARACTERISTICAS
Sacarina	5 mg por Kg de peso al día
Aspartame	40 mg por Kg de peso al día
Sucralosa	5 mg por Kg de peso al día
Acesulfame-k	15 mg por Kg de peso al día

II.6. Usos de Estevia

La estevia se utiliza en forma de hoja seca, líquido concentrado, hojas pulverizadas o polvo blanco concentrado. El líquido y las hojas pulverizadas tienen un ligero sabor a hierbas. El líquido concentrado de color verde oscuro es aproximadamente 70 veces más dulce que el azúcar común. Se usa comúnmente añadiéndolo a la leche para endulzar cereales para desayuno, té, café o chocolate.

La hoja pulverizada es 30 veces más dulce que el azúcar, generalmente se vende en bolsitas por gramo o por kilo para hacer preparaciones de té, se puede usar para hacer té solo o combinándola con otros, a los que endulza y realza el sabor.

El Esteviósido, en forma de polvo blanco concentrado es 300 veces más dulce que el azúcar. Al tratarse de cristales de Rebaudiosido A es 400 veces más dulce que el azúcar común; A pesar de que la estevia no ha sido aprobada como edulcorante por la FDA de EEUU, actualmente se vende en tiendas naturistas de ese país como suplemento dietario o producto natural para uso personal.

El esteviósido, al ser utilizado como aditivo tiene comprobadas propiedades, entre las cuales se encuentran la capacidad de atrasar la descomposición de las bebidas, frutas confitadas y alimentos congelados, al tiempo que realza su sabor. También es destacable su aporte nulo de calorías, pues el organismo no lo metaboliza (INCAGRO, 2008).

Otras ventajas que proporciona el edulcorante derivado de la planta de estevia es que se aprovecha por sus características medicinales en pacientes con diabetes, sin afectar el nivel de azúcar en la sangre, además, no presenta efectos secundarios como los edulcorantes artificiales, es muy utilizado por sus propiedades antibacterianas y antifúngicas, en enjuague bucal y en pasta de dientes (Midmore y Rank, 2002).

II.7. Comercialización

El principal destino de las exportaciones de hoja de estevia es Japón, que demanda grandes cantidades para suplir la industria de edulcorantes aditivos alimentarios y de suplementos. Algunos estudios indican que la industria japonesa ha pasado de consumir cerca de 400 toneladas de hoja seca por año en la década del 80 a aproximadamente 2000 toneladas para finales de los noventa, es importante considerar que se necesitan casi 10 Kg de hoja seca para obtener un kilo de esteviósido.

Recientemente, China y Malasia han incrementado sus importaciones de hoja como insumo industrial, Estados Unidos figuraba como un importador de esta planta y productos que contenían estevia como aditivo, sin embargo, con la restricción sobre la estevia como aditivo para alimentos, sus importaciones se han reducido a la demanda por suplementos dietéticos (Marin, 2004).

Algunos productos derivados de estevia que se pueden comercializar son: edulcorante de estevia en cristales (tipo azúcar, extracto de estevia en polvo, extracto de estevia líquido y como tabletas de estevia) los cuales se pueden utilizar en una gran variedad de productos a nivel comercial.

El rango de costos de estevia varía de 25 a 30 % por encima del azúcar de caña o azúcar común, el precio de los edulcorantes químicos se encuentra por el rango de estevia refinada, por lo cual se pueden comercializar productos edulcorados con estevia manteniendo el mismo precio que con otros edulcorantes. Con un costo de producción de hoja seca de 2,200 kg/ha y una ganancia de aproximadamente \$15,000 /ha (dólares por hectárea) (Midmore y Rank, 2002).

II.8 Estevia en México

La producción de estevia en México no se ha desarrollado comercialmente, sin embargo, tiene un futuro muy prometedor, ya que es muy utilizada por sus múltiples propiedades y usos, posee un gran potencial de mercado tanto nacional como internacional, por lo que sería muy importante realizar investigaciones en áreas como las agronómicas, tecnología de producción, procesamientos industriales, su factibilidad técnica y económica, entre otras (Ramírez, et al., 2011).

Como se mencionó anteriormente, la temperatura promedio de adaptación de la planta es de 23 °C, pero puede soportar temperaturas extremas de -6 a 43 °C, en México se presenta en algunas partes del territorio nacional (Figura 2). Puede producirse bajo condiciones controladas: invernadero, malla-sombras, laboratorio.

En la zona tropical la estevia presenta un amplio rango de adaptación, desde los 0 a los 1200 metros sobre el nivel del mar, pero se ha visto que se obtiene mejor calidad de las hojas en climas cálidos. La altura ideal para la siembra de esta planta, es de 800 msnm, es donde se han encontrado las mejores producciones de follaje, pero este valor puede variar desde el nivel del mar hasta los 850 msnm (Ramia, 2002).

II.8.1 Condiciones climatológicas en Sonora

El clima del norte de México es esencialmente semiárido, con precipitaciones anuales mayores hacia las regiones costeras. La evaporación excede a la precipitación pluvial, por lo cual se observan importantes déficit de humedad en el suelo. La precipitación promedio anual en el estado de Sonora es de aproximadamente 428 mm y en la región de Hermosillo, Sonora, entre 250 y 300 mm. La mayor parte de la precipitación ocurre en los meses de verano asociada con el llamado Monzón Mexicano.

En invierno, algunos frentes fríos llegan a producir lluvias y nevadas en las partes altas del estado. La temperatura media anual en Hermosillo varía entre 15 y 25° C sin embargo, la mayor parte del año las temperaturas máximas están por encima de los 30° C y en algunos

casos las temperaturas máximas pueden alcanzar los 45° C, existen marcadas variaciones en la temperatura media anual.

La década de los 70 y 80 fueron relativamente frías, resultado de mayores precipitaciones y nubosidades. Por otro lado, las lluvias estacionales produjeron una marcada variabilidad interanual, por lo que en ciertos años las lluvias pudieron alcanzar los 600 mm en un año, en otros años, difícilmente alcanzaron los 200 mm (Stratus Consulting, Inc 2004).



Figura

2. Temperaturas óptimas y subóptimas en México para la producción de estevia (INIFAP) (Ramírez et al., 2011).

II.9. Micropropagación

Las técnicas de propagación masiva de diferentes especies con interés comercial, biotecnológico y ecológico ofrecen varias ventajas con respecto a las convencionales. Debido a la alta heterogeneidad de las plantas obtenidas a través de semillas, la propagación agámica (sin semilla) es la mejor, debido a que las plantas obtenidas conservan las características de la planta madre, ésta puede ser por hijuelos, estacas y por cultivo de tejidos (Landázuri et al., 2009).

Dentro de este contexto, estas técnicas ofrecen una alternativa real de micropropagación para una planta como *S. rebaudiana*. Adicionando reguladores de crecimiento en los medios de cultivo se pueden regular aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas en las cuales se incluyen las hormonas como las auxinas, giberelinas, citocininas, que son reguladores del crecimiento conocidas como promotores del crecimiento y pueden influenciar a las plantas regulando algunos aspectos, como el desarrollo de brotes, determinar el sexo de la planta, estimulación y desarrollo de raíces, crecimiento del fruto, incrementan el crecimiento de los tallos, están involucradas en el incremento o en la inhibición de la división celular, retrasan la senescencia o envejecimiento celular (Ting, 1982). En concentraciones adecuadas estimulan embriogénesis somática en los vegetales (Banerjee y Sarkar, 2008), a partir de la parte axilar de los tallos, de yemas y meristemos, es posible lograr plantas uniformes de Mongolian cherry (*Prunus fruticosa*) y Nankin cherry (*Prunus tomentosa*), a partir de otros órganos y callos, se presenta el riesgo de producir variabilidad, razón por la cual es necesario encontrar el tipo y concentración adecuada de los reguladores de crecimiento para inducir formación y crecimiento de tallos sin pasar por el callo (Prusky, 2007). En estudios con *Eucalyptus globulus* encontraron que la inducción de callos está relacionada con la concentración de Bencilaminopurina y el medio nutritivo utilizado (Larson y colaboradores., 2006). En plantas de estevia lograron 100% de callos al utilizar cinetina con 2, 4-D (Singh et al., 2011).

II 9.1. Técnicas de cultivo in vitro de estevia

Debido a que las semillas de estevia generalmente son estériles, es necesario recurrir a otros métodos de propagación para obtener plantas, como el cultivo de tejidos, por medio del cual se lograrían plantas élite. Se ha observado que la inducción de brotes múltiples en la planta de estevia, mejoran el crecimiento (Yang y Chang, 1979).

Se ha reportado que en el medio basal sin reguladores de crecimiento, la planta forma de uno a dos brotes, pero en presencia de hormonas los brotes se incrementan (Yang et al., 1980). Los reguladores de crecimiento tienen la capacidad de afectar a los procesos fisiológicos en concentraciones mucho más bajas que los nutrientes o las vitaminas, el control de la respuesta hormonal se lleva a cabo a través de cambios en la concentración y la sensibilidad de los tejidos a las hormonas (Segura, 2008).

Las citocininas están involucradas en los procesos de división celular, la proliferación de yemas axilares, la neoformación de órganos in vitro, la senescencia foliar, el desarrollo de los cloroplastos y la floración (Segura, 2008). En estudios con *S. rebaudiana* encontraron que el mejor explante utilizado para la micropropagación in vitro e inducción de callo, son los nudos y los entrenudos, utilizando medio de cultivo MS adicionado con algunos reguladores de crecimiento (Saif et al., 2012).

Sivaram y Mukundan (2003) observaron que a través de cultivo de tejidos, el contenido de la esencia esteviósido se incrementó en callos cultivados in vitro suplementados con los reguladores de crecimiento (6-benzyladenina 8.87 μM y ácido indol-3-butírico 9.80 μM). Por otro parte, Espinal de Rueda et al., (2006) encontraron que el mayor tamaño de brotes se logró en el medio líquido MS con 50% de macroelementos y 6 μM de bencilaminopurina (BAP). Igualmente Suárez y Salgado (2008) observaron que la presencia de auxina en el medio de cultivo es necesaria y suficiente para inducir la formación de callos en explantes de estevia. Se ha recomendado un suplemento combinado de 1.0 mgL^{-1} ANA con 4.0 mgL^{-1} BAP para obtener plantas de *S. rebaudiana* a través de organogénesis. También se ha observado un incremento en el porcentaje de explantes con formación de callo al adicionar 6 bencilaminopurina (Kryvenki et al., 2008).

III. JUSTIFICACIÓN

Estevia o la hierba dulce, es una planta con gran potencial en la industria de alimentos y farmacéutica, ya que se puede utilizar como una alternativa al azúcar común y edulcorantes artificiales, los cuales pueden afectar la salud con problemas como la diabetes o pueden causar alteraciones en el organismo.

Es una planta que posee un componente que es más dulce que el azúcar común, el cual se ha visto que no afecta a la salud, lo que constituye una gran ventaja. Una alternativa para poder propagar esta planta es el cultivo de tejidos, el cual puede ser utilizado para la obtención de especies que poseen poca viabilidad en sus semillas como es el caso de *Stevia rebaudiana*, o para producir plantas que no son de esta región, que podrían ser adaptadas a un clima semiárido y que además son prometedoras ya que ofrecen ser económicamente importantes.

IV. HIPÓTESIS

La adición de diferentes concentraciones y tipos de reguladores de crecimiento a tejidos de *Stevia rebaudiana* Bertoni favorece el desarrollo de brotes in vitro por los procesos de organogénesis directa.

V. OBJETIVO GENERAL

Establecer una metodología para cuantificar el crecimiento de explantes de *Stevia rebaudiana* Bertoni vía técnicas de cultivo de tejidos.

V.1. Objetivos específicos

Obtener plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni in vitro, a partir de semillas.

Determinar el efecto de diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento 6-Bencilaminopurina (BAP) y Ácido-indol-3-butírico (AIB) sobre el crecimiento in vitro de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

VI. METODOLOGÍA

VI. 1. Material Vegetal

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos, en el Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora.

El material vegetativo se obtuvo a partir de semillas de *S. rebaudiana* (Figura 3) originarias de Paraguay, las cuales se germinaron en medio de cultivo basal Woody Plant Medium (WPM) (Trigiano y Gray, 2000) y se incubaron en condiciones descritas posteriormente y una vez obtenidas las plantas con una altura promedio de 3 cm, se les hicieron cortes en los entrenudos y cada uno de estos se sembraron en condiciones asépticas en el mismo medio WPM basal, obteniéndose así suficientes plantas para los tratamientos correspondientes.



Figura 3. Semillas maduras e inmaduras de *Stevia rebaudiana*.

VI.2. Desinfección y Siembra

Se seleccionaron semillas maduras de *Stevia rebaudiana*, que mostraran un color mas oscuro, las cuales se sumergieron en alcohol al 90% por un minuto y después se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 20% con una gota de detergente TWEEN 20 por 13 minutos, después se enjuagaron con agua desionizada estéril. Todo esto se realizó en condiciones asépticas en la cámara de flujo laminar (Marca Edge Gard Hood).

Para efectuar la siembra de las semillas en el medio nutritivo, la cámara de flujo laminar se limpió perfectamente con alcohol etílico. Después se encendió la lámpara de luz ultravioleta durante 20-30 min y se conservaron estas condiciones estériles con mecheros de alcohol. Las semillas sembradas en el medio de cultivo, se mantuvieron para su germinación en el cuarto de incubación, al germinar y alcanzar una altura de 3 cm o por lo menos 3 entrenudos, se les efectuaron cortes para volver a sembrarlas en nuevos medios de cultivo y así obtener plantas con el fin de tener suficiente material vegetativo para realizar los otros tratamientos.

VI.3. Medio de Cultivo

Se utilizó el medio de cultivo WPM (Tabla III), agregando 10 mL a tubos de ensaye y frascos, después se esterilizó en autoclave modelo Sterilmatic, durante 15 minutos a 121 °C y una presión de 15 lb. Se utilizó el mismo medio de cultivo en los otros tratamientos adicionando los reguladores de crecimiento AIB y BAP (M).

Tabla III. Composición de nutrientes del medio de cultivo basal Woody Plant Medium (WPM) (Trigiano y Gray, 2000).

Compuesto	Concentración (mgL ⁻¹)	Compuesto	Concentración (mgL ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	400	CuSO ₄ *5H ₂ O	0.025
Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O	556	FeSO ₄ *7H ₂ O	27.8
K ₂ SO ₄	990	Na ₂ EDTA*2H ₂ O	3.4
CaCl ₂ *H ₂ O	96	m-Inositol	100
MgSO ₄ *7H ₂ O	370	Ácido nicotínico	0.5
KH ₂ PO ₄	170	Piridoxina*HCl	0.5
H ₃ BO ₃	6.2	Tiamina*HCl	0.1
MnSO ₄ *4H ₂ O	22.3	Glicina	2.0
Zn SO ₄ *7H ₂ O	8.6	Sacarosa	30 gL ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0.25	Agar	8 gL ⁻¹

VI.4 Cortes Vegetativos

Una vez obtenidas las plantas en incubación, se realizaron cortes en los entrenudos, con un corte en forma de Y, (Figura 4). Los cortes se realizaron dentro de la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas, para después sembrarlas en medio de cultivo WPM adicionado con los reguladores de crecimiento BAP y AIB en diferentes concentraciones molares (M).



Figura 4. Cortes vegetativos: a) Selección de la planta. b) cortes de los entrenudos. c) Cortes en forma de Y en plantas de estevia.

VI.5. Tratamientos

Se probaron los reguladores de crecimiento: auxina ácido indol-3-butírico (AIB) en tres concentraciones (0, 2.5 y 5 M) y la citocinina: 6-bencilaminopurina (BAP) en tres concentraciones diferentes (0, 5 y 10 M) (Tabla IV), que se combinaron para tener un total de nueve tratamientos, cada uno con diez repeticiones. La unidad experimental fueron tubos de ensaye con dos explantes cada uno.

Tabla IV. Concentraciones de los reguladores de crecimiento AIB y BAP (M).

AIB (M)	BAP (M)
0	0
0	5
0	10
2.5	0
2.5	5
2.5	10
5	0
5	5
5	10

VI.6. Siembra e Incubación de los Tratamientos AIB y BAP

Con los cortes efectuados a las muestras en incubación, se sembraron un total de 180 explantes en el medio de cultivo conteniendo las diferentes combinaciones (M) de los reguladores de crecimiento (AIB y BAP) (Figura 5) en la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas. Se

inocularon dos explantes en cada tubo de ensaye conteniendo 10 mL de medio de cultivo (WPM) y se incubaron a una temperatura de $25^{\circ}\text{C}\pm 2$, humedad relativa de 80% y fotoperiodo de 16 horas luz/8horas oscuridad, para el registro de los datos cada semana durante cuatro semanas.



Figura 5. Crecimiento obtenido de las muestras en el medio de cultivo: a) BAP 5 M. b) BAP 10 M. c) AIB 2.5 M. d) AIB 5 M.

VI.7. Selección de Tratamiento BAP

Debido a los resultados obtenidos en el experimento anterior, en donde se observó menor crecimiento de las muestras al utilizar el regulador de crecimiento AIB en el medio de cultivo, se seleccionó el medio de cultivo con el regulador de crecimiento con el cual se logró mayor crecimiento de las muestras y mejor adaptación de la planta obtenidas. Por lo que se hizo un segundo experimento probando diferentes concentraciones molares: (0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30), con la 6-bencilaminopurina (BAP) para observar en qué concentración o concentraciones se obtienen los mejores crecimientos de las plantas.

VI.8. Siembra e incubación en el Tratamiento con BAP

Se establecieron un total de siete tratamientos con tres repeticiones cada uno, sembrando tres explantes en forma de Y en condiciones asépticas en la cámara de flujo laminar. Los explantes se obtuvieron en la primera siembra con medio WPM basal, utilizando frascos de vidrio para cultivo (Figura 6) con 10 mL de medio de cultivo (WPM) con diferentes concentraciones del regulador de crecimiento BAP dando un total de 63 explantes, colocándolos en incubación con temperatura de $25^{\circ}\text{C}\pm 2$, humedad relativa de 80% y fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad.

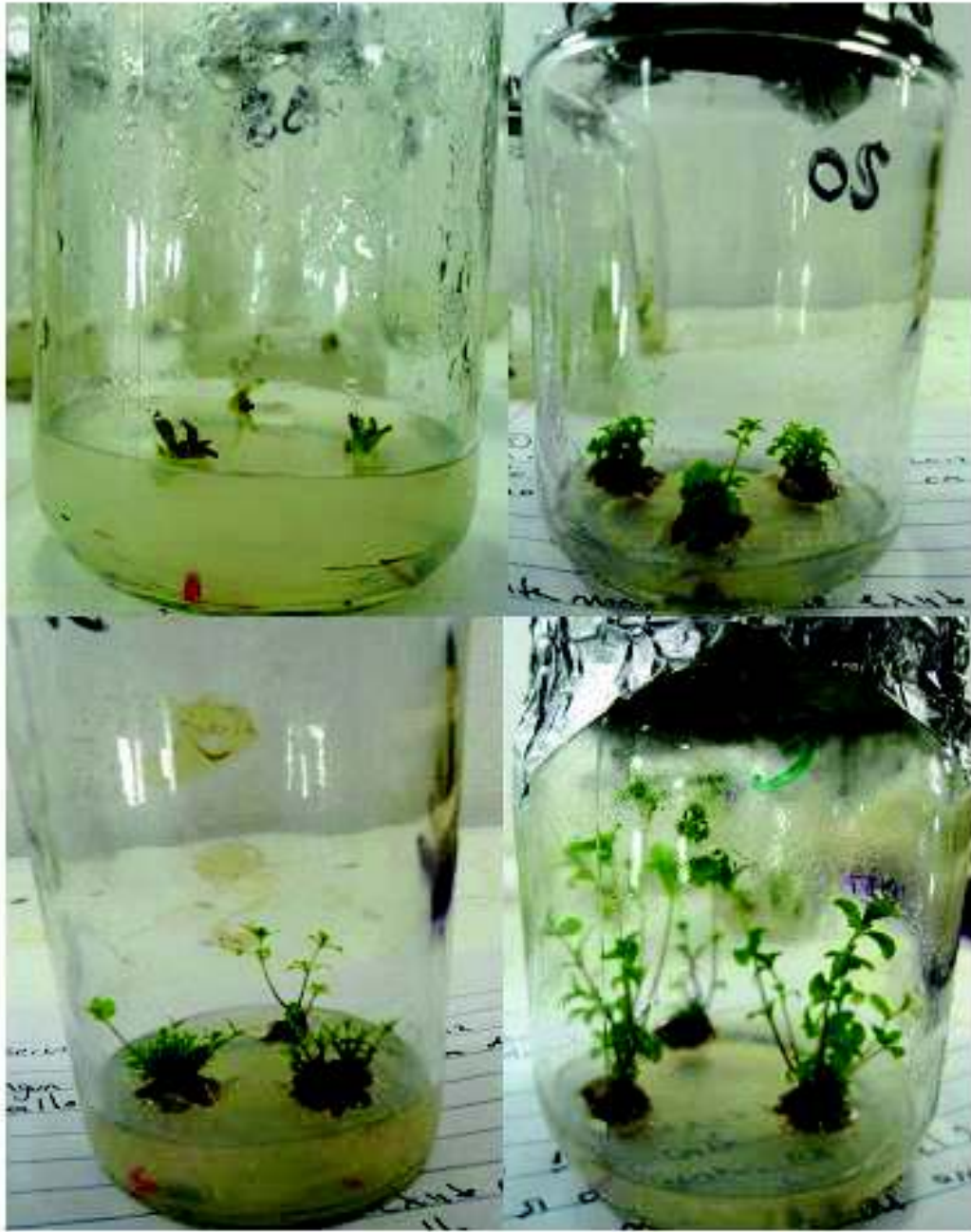


Figura 6. Crecimiento observado de *S. rebaudiana* en medio de cultivo con BAP.

VI.9. Registro de Datos

Las plantas se midieron desde la parte basal del explante hasta la parte final del crecimiento, estas mediciones se realizaron cada siete días, durante 4 semanas. El registro de los datos se midió por fuera del tubo de ensayo o frasco de cultivo, para evitar problemas con la contaminación de la planta, utilizando una regla graduada y flexible.

VI.10. Diseño Experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones y los resultados se evaluaron mediante el análisis estadístico de varianza de una vía para establecer la dependencia entre las variables a analizar, la respuesta del genotipo a la inducción de brotes y el efecto del medio de cultivo en la inducción de brotes.

Se utilizó la prueba de LSD con un nivel de significancia del 95% para determinar las posibles diferencias significativas entre los tratamientos. Los datos se analizaron por medio del programa StatGraphic, versión Plus 5.1.

VII. RESULTADOS

VII.1. Germinación de semillas de *Stevia rebaudiana*

Debido a la poca viabilidad en las semillas de *Stevia rebaudiana*, solo se observó 5% de germinación de un total de 80 semillas sembradas en medio de cultivo (WPM) basal; en incubación, solo germinaron 4 semillas, logrando 4 plantas, en las cuales se hicieron cortes en condiciones asépticas para obtener las muestras necesarias para efectuar los estudios en este experimento.

VII.2. Tratamiento con Ácido-indol-3-butírico y 6-Bencilaminopurina

Al evaluar los efectos de los reguladores de crecimiento (AIB y BAP) en diferentes concentraciones, se pudo observar que la presencia de la auxina AIB tuvo un efecto inhibitor en los explantes de *Stevia rebaudiana* reflejándose en las plantas obtenidas, ya que no desarrollaron brotes ni raíces, sin embargo, se observó que al adicionar BAP en el medio nutritivo, se obtuvo crecimientos significativos en los tratamientos que contenían 5 M y 10 M de BAP sin la adición de AIB como se observa en la gráfica (Figura 7) y al analizar los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los otros tratamientos probados. En los medios de cultivo conteniendo las combinaciones de los reguladores de crecimiento (AIB y BAP) no se observó crecimiento adecuado de las muestras vegetativas (Tabla V).

Con los resultados observados en el crecimiento de las muestras inoculadas en los medios de cultivo con las combinaciones de los reguladores AIB-BAP, en el experimento anterior se determinó que BAP (Tabla VI) mostró mejor respuesta para el crecimiento de brotes, por lo que se realizó otro experimento donde se utilizó solamente el regulador de crecimiento BAP en concentraciones mas elevadas para observar los efectos de dicho regulador en las plantas.

Tabla V. Efecto de los reguladores de crecimiento AIB-BAP (M) sobre el crecimiento (cm) de estevia en cuatro semanas de incubación. Las letras muestran una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.5$) entre concentraciones de AIB-BAP en 30 días. Media \pm DS (n=5).

AIB-BAP (M)	Medias	Diferencias estadísticas
0-0	7.5 \pm 4.2	a
0-5	5.82 \pm 5.2	ab
0-10	5.2 \pm 4.5	b
2.5-0	0.5 \pm 0	c
2.5-5	1.3 \pm 0.3	c
2.5-10	1.24 \pm 0.1	c
5-0	0.5 \pm 0	c
5-5	0.9 \pm 0	c
5-10	0.7 \pm 0.3	c

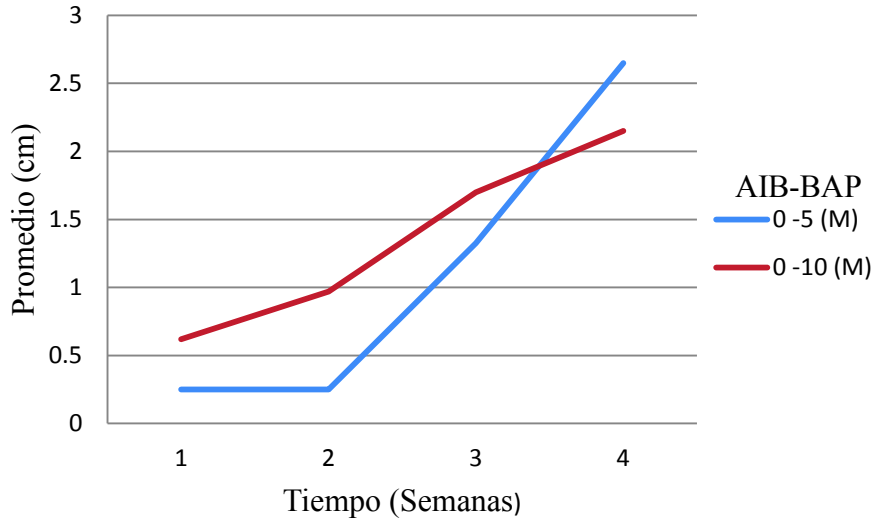


Figura 7. Efecto de 0 M AIB con 5 M BAP y 0 M de AIB con 10 M BAP sobre el crecimiento(cm) de *Stevia rebaudiana* en cuatro semanas de incubación

VII.3. Experimento con diferentes concentraciones de 6-Bencilaminopurina

En base a los resultado obtenidos al utilizar las diferentes combinaciones de los reguladores de crecimiento AIB-BAP, se pudo observar que se obtuvieron resultados adecuados con el regulador de crecimiento BAP, por lo cual se realizó otro experimento con las siguientes concentraciones de bencilaminopurina (BAP): 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 M en el medio de cultivo.

De acuerdo con los resultados obtenidos, a los 30 días de incubación, se observó que el mejor crecimiento se logró en las plantas que estuvieron en el medio nutritivo conteniendo las concentraciones de 5M y 25 M de BAP, como se puede observar en la siguiente gráfica (Figura 8), el análisis estadísticos de los datos, mostró una diferencia significativa de las muestras inoculadas en los medios nutritivos conteniendo las concentraciones de BAP mencionadas (Tabla VI).

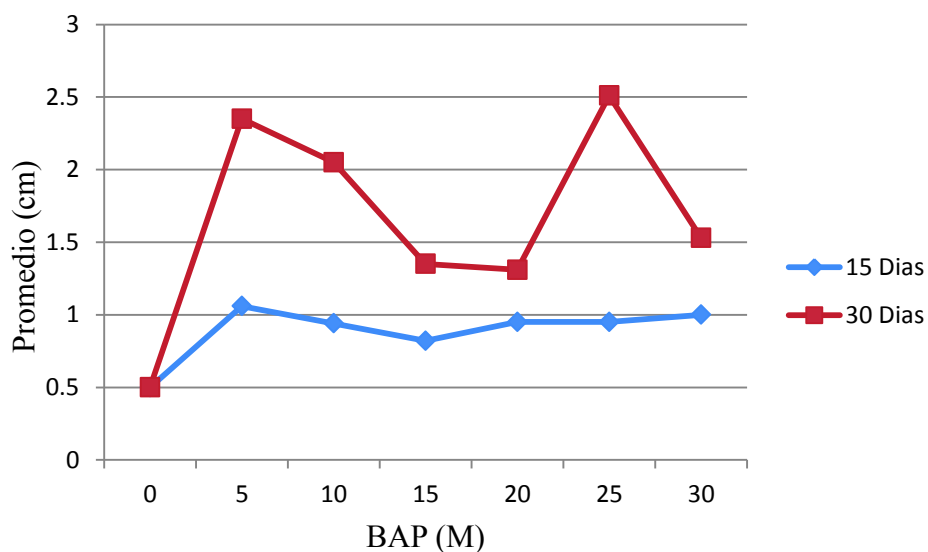


Figura 8. Promedio de crecimiento (cm) de las muestras en las concentraciones de 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 M de BAP en 15 y 30 días de incubación.

Tabla VI. Efecto de la 6 bencilaminopurina (M) sobre muestras de *Stevia rebaudiana* en 30 días de incubación Las letras muestran una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre concentraciones de BAP. Medias \pm DS (n=9)

Tratamiento	BAP(M)	crec.(cm)	Diferencia estadística
5	25	2.0	a
1	5	1.85	a
2	10	1.55	ab
6	30	1.03	bcd
3	15	0.85	bd
4	20	0.75	cd
0	0	0.5	d

VIII. DISCUSIÓN

Stevia rebaudiana es una planta con un valor económico muy importante ya que puede ser utilizada como sustituto de azúcar y edulcorantes artificiales, en el Estado de Sonora se puede adaptar muy bien debido a que soporta un clima caracterizado como semihúmedo tropical con temperaturas extremas de 43 °C a -6 °C con una temperatura anual de 23 °C (Shock, 1982).

Las semillas de estevia tienen un porcentaje de germinación muy bajo (Miyazaki and Wantenabe, 1974), lo cual fue comprobado en este experimento y debido a que es imposible desarrollar una gran cantidad de plantas a nivel comercial a partir de semillas se debe pensar en el aprovechamiento y uso de otras metodologías para la propagación de esta planta, como lo efectuado en este trabajo de tesis.

En los tratamientos con AIB y BAP se observó que la AIB actuó como un inhibidor de crecimiento, ya que las plantas presentaron una sensibilidad diferente a la auxina (AIB), con respecto a las concentraciones, debido a que las raíces mostraron mayor sensibilidad que los tallos causando una inhibición en la formación de raíces (Acosta et al., 2008), asimismo no se obtuvo un crecimiento adecuado de las muestras inoculadas en ellos, mientras que las muestras vegetativas que estuvieron sometidas en el medio de cultivo con BAP se adaptaron muy bien en concentraciones en las cuales no se les adicionó AIB. Las muestras sometidas en los medios de cultivo con 5M y 25M de BAP mostraron mayor crecimiento y al analizar los datos, presentaron resultados estadísticamente significativos (Tabla VI). Resultados similares fueron obtenidos por Laribi et al. (2012) al combinar BAP con AIB, encontraron que al agregar solamente AIB, la inducción de callos fue menor.

Varios investigadores han observado que BAP es esencial para el crecimiento e inducción de brotes a partir de explantes. Oriza et al. (2007) encontraron que la adición de auxina (ANA) de manera individual no mostró efecto en los explantes de *S. rebaudiana*, sin embargo cuando fue combinada con la citocinina BAP se indujo una mayor producción de callo. Rafiq et al. (2007) encontraron que el efecto combinado de ANA y AIB sobre la inducción de raíces en *S. rebaudiana* fue positivo, sin embargo, individualmente esta inducción fue mayor con ANA comparada a la adición de AIB. Con respecto al testigo se obtuvo un

crecimiento promedio, coincidiendo con los resultados encontrados por Yang, y Chang (1979) donde se obtuvieron plantas con uno o dos brotes.

En el segundo experimento, la adición de BAP al medio de cultivo indujo una respuesta positiva, ya que todos los tratamientos provocaron crecimiento de las muestras, siendo significativamente mayor el crecimiento de las muestras cuando estuvieron sometidas en el medio de cultivo conteniendo la concentración de 25 M de BAP. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas en las muestras con esta concentración mencionada y la de 5 M de BAP, sin embargo, fueron estadísticamente diferentes con las muestras inoculadas en los medios conteniendo las otras concentraciones probadas de BAP (Tabla V). Espinal de rueda et al. (2006) encontraron que el mayor tamaño de brotes de *S. rebaudiana* se observó en el medio líquido MS con 50% de macroelementos y 6 μM de 6- bencilaminopurina (BAP). Igualmente, Waliullah (2006) encontró que el mayor número y mayor longitud de brotes fue con la aplicación de BAP 3.0 mgL^{-1} . Para esto mismo, Ojha et al. (2010) encontraron que la concentración de 2.0 mgL^{-1} de BAP produjo el mayor número y longitud de brotes de estevia. Jitendra et al. (2012) encontraron que la incorporación de 3.0 mgL^{-1} de BAP demostró ser la mejor opción para la multiplicación de brotes en *S. rebaudiana*. Finalmente, Javad et al. (2012) encontraron que la adición de 1 mgL^{-1} de BAP evidenció ser el mejor para la inducción de longitud de brotes y 3 mgL^{-1} de BAP para la estimulación del número de brotes.

IX. CONCLUSIONES

Stevia rebaudiana, la hierba dulce, es muy prometedora debido a los compuestos edulcorantes que contiene, es una planta que tiene mucho futuro en el estado de Sonora , por lo que es importante recurrir a las técnicas de propagación para efectuar estudios con esta planta, como la que se desarrolló en este trabajo. La proliferación de esta planta in vitro es una opción de interés, ya que se pueden obtener plantas sanas y debidamente seleccionadas, con un potencial de crecimiento y adaptación en el medio.

Se demostró que la adición del regulador de crecimiento citocinina: 6- bencilaminopurina (BAP) en concentraciones de 5M y 25 M es una opción para el mejor crecimiento de la planta de estevia, ya que no solo se observó la adaptación de las muestras al medio de cultivo, sino que se desarrollaron en tamaño y además, presentaron crecimiento de múltiples brotes, los cuales son resultados muy prometedores, ya que con el trasplante a tierra se podría tener un arbusto mas frondoso y con muy buena adaptación.

Con respecto al regulador de crecimiento auxina: ácido indol-3-butírico (AIB) en las concentraciones utilizadas en el presente trabajo, los resultados obtenidos mostraron que no es una opción viable para la micropropagación de la planta de estevia, debido a que no se logró un crecimiento adecuado de brotes y raíces, probablemente, si se utilizaran otras concentraciones, o en combinaciones con otros reguladores de crecimiento, se obtendrían resultados más favorables.

VII. LITERATURA CITADA

- Acosta, M. J. Sánchez, y M. Bañón, 2008. Auxinas fundamentos de fisiología vegetal. Azcón-Bieto J. y M. Talón. Ed McGraw-Hill.381.
- Ayerbe, L. 1990. Cultivo *In vitro* de las plantas superiores. Ed Mundi-Prensa. Madrid, España. pp: 66-67, 98-99, 112-117, 128-133.
- Banerjee, M. y Sarkar, P. 2008. *In vitro* callusing in *Stevia rebaudiana* Bertoni using cyanobacterial media-a novel approach to tissue culture. International Journal of Integrative Biology. 3(3). 163-168.
- Brandle, J. E. y N. Rosa, 1992. Heritability for yield, leaf:stem ratio and stevioside content estimated from landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. Can. J. Plant Sci. 72:1263-1266.
- Espinal de Rueda, D., W. Del Valle, E. Cifuentes, y N. C. Ramia. 2006. Propagación *in Vitro* de *Stevia rebaudiana* B. a partir de segmentos nodales. Ceiba. 47:11-18.
- Galván, L. y J. Guzmán. 2003. Determinación de los requerimientos nutricionales de *Stevia rebaudiana* Bert, en el Sinú Medio. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba, Montería (Colombia).106.
- Hurtado, M. D. V. y M. E. Merino M. 2001. Cultivo de tejidos vegetales. Ed Trillas. México, D. F. 26.
- INCAGRO. 2008 Manual técnico de producción de stevia. Adaptabilidad biológica para la introducción de la Stevia (*Stevia rebaudiana* B) en seis zonas agroecológicas andinas de San Ignacio y Chota.
<http://www.bvcooperacion.pe/biblioteca/bitstream/123456789/990/1/BVCI0000804.pdf>
- Geuns, J.M.C. 2002. Safety evaluation of Stevia and stevioside Studies in Natural Products Chemistry, 27(H): 299–319.
- Jarma A. T. Rengifo y T. Aramendix. 2005. Aspectos fisiológicos de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en el Caribe colombiano: I. Efecto de la radiación incidente sobre el área foliar y la distribución de biomasa. Agronomía Colombiana 23(2): 207-216
- Javad, S., Sh. Naz, S. Ilyas, A. Ali, F. Aslam, y N. Munir. 2012. Study of the effect of physical state of medium and different concentrations of sucrose, ferric ethylenediamine-

- tetraacetic acid (FeEDTA) and CuSO₄ in enhancing the micropropagation system of *Stevia rebaudiana*. Jour Med Plant Res. 6:1800-1805
- Jitendra, M., S. Monika, Sh. D. Ratan, G. Priyanka, Sh. Priyanka, y D. J. Kiran. 2012. Micropropagation of an Anti diabetic Plant - *Stevia rebaudiana* Bertoni, (Natural Sweetener) in Hadoti Region of South-East Rajasthan, India. ISCA J. Biolog Sci. 1:37-42.
- Kanokporn, S. S. Aritajat, S. Saenphet, J. Manosroi y A. Manosroi. 2006. Safety evaluation of aqueous extracts from *Aegle marmelos* and *Stevia rebaudiana* on reproduction of female rats. Jour Med Plant Rese. 6(27):4429-4435
- Katayama, O., T. Sumida, H. Hayashi, y H. Mitsunashi, 1976. The practical application of *Stevia* and research and development data I.S.U. Company, Japan, p. 747.
- Kryvenki, M., R. G. Kosky, D. Guerrero, M. Domínguez, y M. Reyes. 2008. Obtención de callos con estructuras embriogénicas de *Stevia rebaudiana* Bert. En medios de cultivo semisólidos. Biotec Veg. 8: 91–98.
- Landázuri, P., D. Aguirre, F. Amores, I. y Vaca. 2009. Propagación de *Stevia rebaudiana* Bert. En: *Stevia rebaudiana* Bertoni, una planta medicinal. Bol Téc pp 7-15.
- Laribi, B., N. Rouatbi, K. Kouki, y T. Bettaieb. 2012. In Vitro propagation of *Stevia rebaudiana* (Bert.)- A noncaloric sweetener and antidiabetic medicinal plant. Int. J. Med. Arom. Plants. 2: 333-339.
- Larson, C. G.; Gómez, C.; Sánchez-Olate, M. y Ríos D. 2006. Inducción de caulogénesis indirecta en *Eucaliptus globulus*. BOSQUE: 27(3).250-257.
- Marcavillaca, C. 1985. Micropropagation in vitro de *Stevia rebaudiana* por medio de segmentos nodales y meristemas. Anales de SAIPA. 6: 241-243.
- Marín W. 2004. Sondeo de mercado de la Estevia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá Colombia.
- Metivier, J., y Viana, A. M. 1979. The effect of long and short day length upon the growth of whole plants and the level of soluble proteins, sugars, and stevioside in leaves of *Stevia rebaudiana* Bert. J. Exp. Bot. 30:1211-1222.

- Midmore, D.J., y RANK, A.H. 2002. A new rural industry – Stevia – to replace imported chemical sweeteners. RIRDC Web Publication No W02/022. 50p. Disponible desde Internet en: <http://www.rirdc.gov.au/reports/NPP/02-022.pdf>
- Miyazaki Y, y H. Wantenabe 1974. Studies on the cultivation of stevia; on the propagation of plant. Jap. J. Trop. Agric. 17:154-157.
- Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994 Para la Prevención, Tratamiento y Control de la Diabetes, Diario Oficial de la Federación 15 de Diciembre de 1999.
- Notice to the U.S. Food and Drug Administration (FDA) that the use of Rebiana (Rebaudioside A) derived from *Stevia rebaudiana*, as a Food Ingredient is Generally Recognized as Safe (GRAS). 2009. New York Medical College Department of Pathology Chemical Safety Laboratory.
- Ojha, A., V. N. Sharma, y V. Sharma. 2010. An efficient protocol for *in vitro* clonal propagation of natural sweetener plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni). African Jour Plant Sci. 4:319-321.
- Oriza, C., L. Buendía, J. Orozco, J. Á. Lechuga, y F. Cruz. 2007. Inducción de callo en la planta *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsl. Productora de edulcorantes. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Disponible en: http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/morelia07/TRABAJOS/Area_II/Carteles/CII-1.pdf
- Prusky, K. 2007. Tissue culture propagation of Mongolian cherry (*Prunus fruticosa* L.) and Nanking cherry (*Prunus tomentosa* L.) . 391-407. Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Jaín, S. M. y Haggman, H. Ntherlands, Springer.
- Rafiq, M., M. U. Dahot, S. M. Mangrio, H. A. Naqvi y I. A. Qarshi. 2007. *In vitro* clonal propagation and biochemical analysis of field established *Stevia rebaudiana* Bertoni. Pak. J. Bot. 39:2467-2474.
- Ramia A.; N. C. 2002. Estudio económico para la producción y comercialización de stevia rebaudiana. Proyecto de titulación de nivel Profesional. Carrera de Gestión de agronegocios. Universidad El Zamorano. Zamorano, Honduras
- Ramirez. J. G, B.W. Aviléz, O, Manguel, B, Yolanda, G. S. Góngora y F. May L. C. 2011 Estevia (*Stevia Rebaudiana*, Bertoni), Un Cultivo con Potencial Productivo en México.

- INIFAP, Centro de investigación Regional Sureste Mérida, Yucatán México. 15: 74
- Saif U. Sikdar, Nayem Zobayer, Fazle Azim, M. Ashrafuzzaman y Shamsul H. Prodhan. 2012. An efficient callus initiation and direct regeneration of *Stevia rebaudiana*. African Jour. of Biotech. 11(45): 10381-10387.
- Segura, J. 2008. Introducción al desarrollo. Concepto de hormona vegetal. Fundamentos de Fisiología vegetal. Azcón Bieto J. y M. Talón. Ed. McGraw-Hill. 370.
- Segura, J. 2008. Citoquininas. Fundamentos de fisiología vegetal. Azcón-Bieto J. y M. Talón. Ed. McGraw-Hill. 432.
- Shock, C. C. 1982. Rebaudi's stevia: natural non-caloric sweeteners. Calif Agric. 36: 4-5
- Singh, V. K, Singh, y N. W. Megeji,. 2006. Cultivation of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni]: A comprehensive review. Adv. Agron. 89:137-177.
- Singh, N. ; Yadav, K.; Kumari, S y Renu. 2011. Metabolic changes during differentiation in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Journal of Phytology Tissue culture 3(3).63-67.
- Sivaram, L. y U. Mukundan. 2003. In vitro culture studies on *Stevia rebaudiana*. In *Vitro Cellular & Developmental Biology*. Plant.39:520-523.
- Slater, A., N. Scott, y M. Fowler. 2008. Plant tissue culture. In: Plant Biotechnology. The genetic manipulation of plants. Second ed. Ed Oxford University press. 37.
- Soejarto, D. D., A. D. Kinghorn, N. R. y Farnsworth, 1982. Potential sweetening agents of plant origin. III. Organoleptic evaluation of *Stevia* leaf herbarium samples for sweetness. J. Nat. Prod. 45:590-599.
- Strauss, S. 1995. The perfect sweetener? Technol. Rev. 98: 18-20.
- Stratus Consulting, Inc, 2004. Adaptación al cambio climático: Hermosillo, sonora, un caso de estudio. Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. http://www.ine.gob.mx/descargas/cclimatico/adap_cclimatico.pdf
- Suárez, I.E., y J. A. Salgado. 2008. Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* bert. (asteraceae-eupatorieae) a través de organogénesis. TEMAS AGRARIOS. 13:40 – 48.
- Tamura, Y., S. Nakamura, H. Fukui, y M. Tabata, 1984. Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni by stem-tip culture. Plant Cell Rep. 3:183-185.
- Ting, I. P. 1982. Plant physiology. Ed Addison-Wesley Publishing Company. 481-497.

- Trigiano, R. N., y D. J. Gray. 2000. Plant tissue culture concepts and laboratory exercise Ed CRC. Press LLC. pp 25.
- Waliullah, H. 2006. Effect of growth regulators on micropropagation of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.). Master of Science Thesis. Faculty of Agriculture. Sher-e-Bangla Agricultural University, Dhaka. Disponible en: http://daatj.net/images/abook_file/sau200601_47.pdf
- Weathers, P. J., M. J. Towers, y J. Xu. 2010. Bench to batch: Advances on cell culture for producing useful products. Appl Microbiol Biotechnol. 85: 1339-1351.
- Wilson G.C.Y, M.H.A Zavaleta, D.H. Lopez y G.A Hernandez, ,2008. La citocinina BAP retrasa senescencia, aumenta antioxidantes, proteina y crecimiento en el pasto ovillo (*Dactylis glomerata* L.) Agrocienca, 42 (7)799-806
- Yang, Y. W. y C. W. Chang, 1979. In vitro plant regeneration from leaf explants of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Z. Pflanzenphysiol. 93: 337-343.
- Yang, Y. W., Y.I. Hsing, y C. W. Chang. 1980. Clonal Propagation of *Stevia Rebaudiana* Bertoni through axillary shoot proliferation *in vitro*. Academia Sinica 22: 57-62.