

Caracterización genómica mediante AFLP de *Stevia rebaudiana* Bertoni cultivada en el departamento de Antioquia (Colombia)

Diego Martínez¹, Luis E. Rojas², Aura Urrea I¹, Elio Jiménez², Zulma Monsalve F¹ *. *Autor para correspondencia

¹Universidad de Antioquia, Laboratorio de Biología Molecular de Plantas. Medellín- Colombia.
e.mail: zmonsalve@gmail.com

²Instituto de Biotecnología de las Plantas Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830

RESUMEN

Stevia rebaudiana Bertoni es una planta perteneciente a la familia *Asteraceae* ($2n = 22$), nativa del Paraguay, sus hojas tienen sustancias con alto poder edulcorante, llegando a ser 320 veces más dulces que el azúcar. *Stevia* fue introducida, en el Departamento de Antioquia, Colombia, procedente diversos lugares y en diferentes épocas. Su cultivo se ha difundido en el Departamento, siendo además alternativa para la sustitución de cultivos ilícitos. Marcadores AFLP fueron generados usando ADN genómico de dos variedades de referencia ('Morita' y 'Bertoni') y muestras procedentes de cultivos ubicados en diferentes localidades del departamento de Antioquia. Diez combinaciones de iniciadores *EcoR* I - *Tru* 9I para AFLP, revelaron 923 bandas, con 39.22% de polimorfismo. El análisis de similitud con el coeficiente de Dice, separó las dos variedades de referencia. La combinación de iniciadores *EcoR* I - AGG / *Tru* 9I - ATG, demostró capacidad para identificar ambas variedades y permitió establecer dos agrupamientos para el departamento de Antioquia. Las muestras procedentes de las localidades de Támesis, Andes, Jericó, San José del Nus y Santa Fe de Antioquia se agruparon con la variedad 'Morita', las procedentes de Fredonia, Cisneros, y los laboratorios de la Universidad de Antioquia fueron agrupadas con la variedad 'Bertoni'.

Palabras clave: 'Bertoni', marcador molecular, 'Morita'

ABSTRACT

Stevia rebaudiana Bertoni, *Asteraceae* family ($2n = 22$), is a plant native from Paraguay, it has in leaves tissues a high production of some substances with strong edulcorant power, getting to be 320 sweet times but that the sugar. *Stevia* was introduced, in Department of Antioquia, Colombia, at different times from diverse places. Its cultivation has been spread in the Department, additionally is an alternative for illicit cultivated crops substitution. AFLP marker were generated from genomic DNA of two reference varieties ('Morita' and 'Bertoni') and samples from fields crops located in different regions of Department of Antioquia. Ten AFLP primer combinations revealed 923 bands and 39.22% polymorphism. Dice coefficient similarity analysis show differences between both 'Morita' and 'Bertoni' varieties. Primer combination *EcoR*I-AGG/ *Tru* 9I-ATG, was able to identify every of two cultivars, and established two groups for Department of Antioquia *Stevia* varieties. Samples from Támesis, Andes, Jericó, San José del Nus and Santa Fe de Antioquia localities were grouped within 'Morita' cultivar and samples from Fredonia, Cisneros localities and University of Antioquia laboratories were grouped within 'Bertoni' variety.

Key words: 'Bertoni', molecular marker, 'Morita'

INTRODUCCION

Stevia rebaudiana Bertoni es una planta perteneciente a la familia *Asteraceae* ($2n = 22$), nativa del Paraguay. Es herbácea y perenne con hojas simples, inflorescencia capitular y frutos tipo «aquenios» (Branley y Rosa, 1992).

Stevia presenta en sus hojas sustancias denominadas 'steviósidos' y 'rebaudiósidos' que poseen alto poder edulcorante. El steviósido es el glucósido más abundante, se estima que su poder edulcorante es 300 veces mayor al del azúcar común, 360% más que el ciclamato, 50% más que la sacarina y 20% más que el aspartame. Por este motivo es una de las principales fuentes naturales de edulcorantes no calóricas y se utiliza como alternativa a los sustitutos del azúcar producidos artificialmente (Duke, 1993).

Se estima que hacia finales de los años 80, *Stevia rebaudiana* Bertoni fue introducida al departamento de Antioquia (Colombia) por cultivadores particulares y desde inicios de los años 90, del siglo XX, el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia, viene desarrollando una serie de proyectos de investigación encaminados a la micropropagación y la obtención de las sustancias bioactivas producidas por *Stevia*.

Algunos de los materiales vegetales disponibles en Antioquia, provienen de la variedad mejorada 'Morita' (Morita *et al.*, 2000) importada por la Secretaría de Agricultura de Antioquia mediante el convenio JAIDO Ltda, Japón - Departamento de Antioquia.

La importación de *Stevia* en diferentes épocas y desde diferentes sitios hacia el departamento, la comercialización de material semilla por productores

particulares sin una clara diferenciación entre las variedades mejoradas y no mejoradas, sumado a las variaciones morfológicas que puede presentar *Stevia* de acuerdo con las condiciones del cultivo (Jarma *et al.*, 2005), hacen que los cultivadores requieran identificar las variedades que usan para el cultivo y la producción de los bioactivos debido a las diferencias en la producción de los mismos de acuerdo con la variedad (Jarma *et al.*, 2005). Para la identificación de variedades se cuenta con métodos muy sensibles y confiables como es el uso de marcadores moleculares tipo AFLP, RFLP entre otros.

La técnica de AFLP (por sus siglas, del inglés: *Amplified Fragment Length Polymorphism*) está basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por siglas del inglés: *Polymerase Chain Reaction*) permite la caracterización genómica mediante la detección de polimorfismos presentes en el ácido desoxirribonucleico (ADN) (Vos *et al.*, 1995). Los AFLP que se generan, han probado ser extremadamente efectivos al diferenciar genotipos cercanamente relacionados, por ello, han sido usados en la evaluación de relaciones genéticas de un gran número de especies vegetales (Jianjun *et al.*, 2004). También se han evaluado en la identificación de variedades o genotipos de especies comerciales (Arencibia *et al.*, 2006).

Con respecto al uso de marcadores moleculares en *Stevia* spp. se describe el uso de RAPDs (Yao *et al.*, 1999). Sin embargo, en ese estudio se usaron solamente individuos de la progenie resultante del cruce entre las variedades que denominan 96-002A-336 y N8990-8A-10, las cuales no corresponden a las variedades descritas en Antioquia.

Así, dada la presencia de diferentes variedades de *Stevia rebaudiana* Bertoni, la falta de una clara identificación de las mismas debido a las variaciones morfológicas según las condiciones del cultivo, el objetivo de este trabajo fue generar AFLP, que permitieran diferenciar las variedades de *Stevia* spp. cultivadas en el Departamento de Antioquia brindando información sobre la identidad de los materiales vegetales de que disponen los productores y permitir la conservación de las variedades y su intercambio con otras regiones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Un total de ocho muestras provenientes del huerto de plantas medicinales del Jardín Botánico 'Joaquín Antonio Uribe' de la ciudad de Medellín, fueron usadas como referencia de la variedad no mejorada, 'Bertoni'. Como patrón de referencia de la variedad mejorada 'Morita', se usaron diez muestras cedidas por un importador privado, de las cuales seis fueron de plantas propagadas en condiciones *in vitro*. Como material vegetal control

para la técnica de AFLP se usó ADN de caña de azúcar por ser una especie no emparentada.

Para establecer la identidad de las variedades de *Stevia* spp. cultivadas en el departamento de Antioquia, fueron seleccionadas plantas madre que generan los esquejes para siembra en cada cultivo, en los municipios de Támesis, Jericó, Fredonia, Andes, Santa Fe de Antioquia, San José del Nus, Cisneros, además de muestras de plantas *in vitro* mantenidas en el laboratorio de cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Antioquia (denominada SRQ-93).

El ADN genómico de cada muestra de *Stevia rebaudiana* fue aislado y purificado siguiendo el método basado en la utilización del CTAB (Williams *et al.*, 1990). Para la obtención de los AFLP se cuantificó el ADN por espectrofotometría, este fue llevado luego hasta una concentración de 100ng.µl⁻¹, posteriormente fue digerido con las enzimas de restricción *EcoR* I y *Tru* 9I (Fermentas) a 37°C durante tres horas, y una hora a 65 °C. Después fueron ligados los adaptadores *EcoR* I y *Tru* 9I usando T4 ADN ligasa (Fermentas) y se incubó a 16°C toda la noche. La preamplificación fue realizada con iniciadores de una sola base de selección *EcoR* I / A y *Tru* 9I/A usando los siguientes parámetros de PCR 94°C 5min, 25 ciclos a 94 °C 30s, 56 °C 1min, 72 °C 1min, y una extensión final a 72 °C 5min. Los productos obtenidos con esta preamplificación se diluyeron 1:20 y se usaron 5 µl en la reacción de amplificación selectiva, en la que se usaron iniciadores con tres nucleótidos selectivos. Las condiciones de PCR fueron: 94°C 5min, 12 ciclos a 94°C 30s, 65°C 30s (disminuyendo 0.7 °C luego de cada ciclo), 72°C 1min, y luego 29 ciclos a 94°C 30s, 56°C 30s, 72°C 1min más una extensión final a 72°C 5min. Previa a su separación, los productos de la amplificación fueron desnaturados a 95°C. La separación se realizó en geles de poliacrilamida al 6.5% usando una cámara de secuenciación (*Sequi-Gen GT System and PowerPac HV Power Suppli*. Bio-Rad). Los fragmentos de ADN generados se visualizaron por tinción con plata (*DNA staining kit* Promega cat # Q4132, Madison, WI).

Para dar comienzo al proceso de evaluación de los iniciadores, se seleccionaron diez combinaciones de iniciadores. Se utilizó en esta primera etapa, material vegetal referente de las variedades 'Bertoni' y 'Morita', además de ADN de caña de azúcar como control.

Las combinaciones de iniciadores usadas fueron las siguientes *Eco* RI-AGG / *Tru* 9I-ATG, *Eco* RI-ATA / *Tru* 9I-AAC, *Eco* RI-AAG / *Tru* 9I-ACA, *Eco* RI-ACA / *Tru* 9I-AGT, *Eco* RI-AAT / *Tru* 9I-AGA, *Eco* RI-AGG / *Tru* 9I-AAG, *Eco* RI-ATA / *Tru* 9I-AGG, *Eco* RI-ACA / *Tru* 9I-ACC, *Eco* RI-AAT / *Tru* 9I-ACA, *Eco* RI-AAG / *Tru* 9I-AGT.

Distribución de las variedades de *Stevia* en el Departamento de Antioquia

Con el propósito de identificar las variedades cultivadas en diferentes localidades del departamento de Antioquia, las muestras procedentes de cada cultivo de *Stevia*, así como plantas *in vitro* (denominadas SRQ-93), mantenidas en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Antioquia y los referentes de 'Morita' y 'Bertoni', fueron analizadas por la técnica AFLP, utilizando la combinación de iniciadores Eco RI-AGG / Tru 9I-ATG.

Análisis de Datos

Para el análisis de los resultados se usaron matrices generadas al considerar la ausencia (0) o presencia (1) de bandas con igual migración electroforética. Los datos fueron procesados con el programa NTSys pc2 (Rohlf, 1998) para determinar el coeficiente de similitud utilizando el subprograma Simqual, el coeficiente de DICE (Dice, 1945) y el subprograma SAHN, para construir los dendrogramas por medio del método UPGMA (Unión media aritmética no ponderada).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las combinaciones de iniciadores seleccionadas generaron AFLP en cada una de las muestras de ADN de las variedades de *Stevia*, así mismo en la muestra control de caña de azúcar. Se obtuvieron un total de 923 bandas observables, en 362 de ellas se encontró polimorfismo, lo que representa un 39.22% del total de las bandas (Tabla 1). Todas las combinaciones de iniciadores empleadas presentaron polimorfismo en algunas bandas, con valores que van desde 24.71 % hasta 55.47%.

El análisis de la matriz generada por presencia o ausencia de bandas, mediante UPGMA y el coeficiente de similitud genética de Dice, con el programa NTSys pc2, produjo dos agrupamientos bien definidos (Figura 1).

Las ocho muestras de la variedad 'Bertoni' se ubicaron en un mismo agrupamiento, las diez restantes de la variedad 'Morita' en el otro. Se encontraron diferencias entre las muestras de una misma variedad, aunque estas no fueron significativas, y la similitud genética (SG) calculada con el coeficiente de DICE (CD) fue de 0.98 para la variedad 'Bertoni' y 0.96 para 'Morita'. Estos coeficientes son de esperarse si se tiene en cuenta que la propagación de *Stevia rebaudiana* en cultivos comerciales se realiza mediante esquejes de plantas madre que se mantienen en huertos para este propósito en cada cultivo, y que las muestras para análisis fueron tomadas de diferentes individuos en los huertos de plantas madre (Figura 2).

Variación a nivel genético, como la encontrada entre la variedad 'Morita' procedente de condiciones de campo y las de cultivo *in vitro*, ha sido referida también en otras especies usando otros marcadores moleculares, como es el caso de *Musa* spp. en la cual, mediante el estudio por marcadores RAPD se encontró que plantas *in vitro* presentaban genotipos diferentes en comparación con los tejidos originales de los cuales fueron generados (Newbury *et al.*, 2000). La causa de esta variación aun no ha sido aclarada, una explicación podría darse según Infante *et al.* (2003), por la acumulación de mutaciones somáticas durante el ciclo de vida, que mediante la reproducción asexual llegarían a ser fijadas y transmitidas a los descendientes.

Tabla 1. Porcentaje de Polimorfismos en las bandas generadas por AFLP con cada combinación de iniciadores, para las variedades 'Bertoni' y 'Morita' de *Stevia rebaudiana*.

#	Combinación de iniciadores	Número bandas	No. Bandas polimórficas	Porcentaje de polimorfismo
1	Eco RI-AGG / Tru 9I-ATG	128	71	55.47
2	Eco RI-ATA / Tru 9I-AAC	56	17	30.36
3	Eco RI-AAG / Tru 9I-ACA	82	23	28.04
4	Eco RI-ACA / Tru 9I-AGT	99	50	50.50
5	Eco RI-AAT / Tru 9I-AGA	99	34	34.34
6	Eco RI-AGG / Tru 9I-AAG	66	26	39.39
7	Eco RI-ATA / Tru 9I-AGG	89	22	24.71
8	Eco RI-ACA / Tru 9I-ACC	99	38	38.38
9	Eco RI-AAT / Tru 9I-ACA	88	27	30.68
10	Eco RI-AAG / Tru 9I-AGT	117	54	46.15
	Total bandas	923	362	39.22

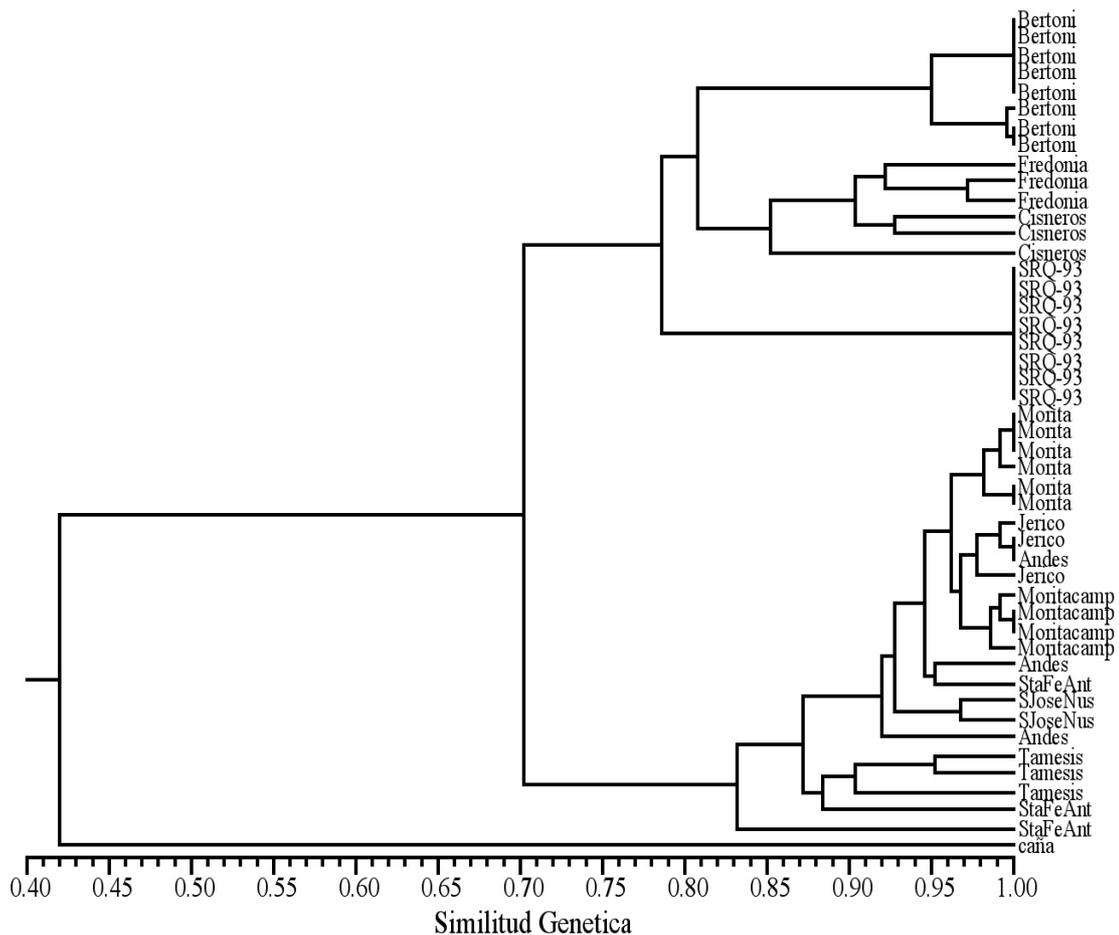


Figura 1. Dendrograma UPGMA de similitud genética calculada con el coeficiente de Dice para las variedades 'Bertoni' y 'Morita' de *Stevia rebaudiana*, considerando todas las combinaciones de iniciadores, y generado por NTsys pc2.

Al comparar los dos agrupamientos, en que fueron separadas las dos variedades, el análisis estableció una SG de 0.72 entre las dos variedades, siendo este un valor de coeficiente bajo, que no es indicativo de una relación estrecha. Cervera *et al.* en 1998, propusieron que si el número de AFLP analizados es suficientemente grande, y las muestras en estudio mostraban más de un 90% de similitud podrían ser considerados como de la misma variedad, representando que genotipos muy similares difieren únicamente en unos pocos loci. En este caso se generaron 923 bandas, siendo un número alto de loci considerados. Así, estos resultados permiten confirmar que 'Bertoni' y 'Morita' corresponden a variedades diferentes, lo que coincide con el registro de procedencia histórico suministrado por el Jardín Botánico de Medellín (variedad 'Bertoni') y el cultivador privado (variedad 'Morita').

La combinación de iniciadores *Eco RI-AGG / Tru 91-ATG* permitió obtener el mayor nivel de polimorfismo con un 55.47% (Tabla 1), por este motivo fue seleccionada para establecer su capacidad en

discriminar las dos variedades de manera independiente. El análisis de la matriz de datos generada con los AFLP obtenidos con esta combinación, estableció una SG de 0.62 entre las variedades 'Bertoni' y 'Morita'. La SG calculada para todas las muestras de la variedad 'Bertoni' fue de 0.95. Por su parte la variedad 'Morita' se agrupó con una SG de 0.96 (Figura 2). Es claro que esta combinación de iniciadores genera información que discrimina de manera eficiente las dos variedades, logra incluso establecer algunas diferencias existentes entre los individuos.

Estudios en otras especies han permitido estimar la variabilidad genética en especies cultivadas comercialmente en regiones determinadas como en el caso de caña de azúcar (Aitken *et al.*, 2005; Arencibia *et al.*, 2006), entre otros. Esto sugiere que puede usarse los iniciadores que presentan el mayor polimorfismo en las bandas generadas en la técnica de AFLP con el fin de diferenciar las variedades presentes en los cultivos de *Stevia* en el departamento de Antioquia.

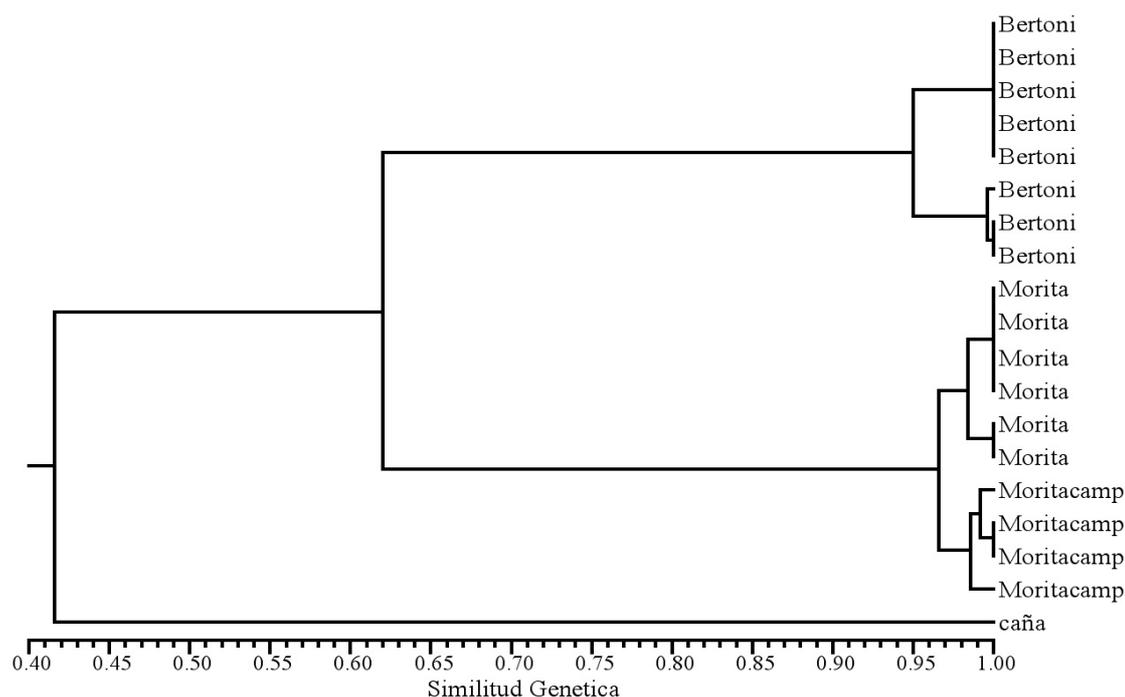


Figura 2. Dendrograma UPGMA de similitud genética calculada con el coeficiente de Dice para las variedades 'Bertoni' y 'Morita' de *Stevia rebaudiana* usando la combinación de iniciadores *Eco* RI-AGG / *Tru* 9I-ATG y NTsys pc2.

Distribución de las variedades de *Stevia* en el Departamento de Antioquia

Se lograron identificar las variedades cultivadas en diferentes localidades del departamento de Antioquia, las muestras procedentes de cada cultivo de *Stevia*, así como plantas *in vitro* (denominadas SRQ-93), mantenidas en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Antioquia y los referentes de 'Morita' y 'Bertoni', por la técnica AFLP, utilizando la combinación de iniciadores *Eco* RI-AGG / *Tru* 9I-ATG, (Figura 3).

Los resultados muestran dos grupos principales claramente definidos (Figura 4). Los análisis de los AFLP generados a partir de las muestras procedentes de las localidades de Tâmesis, Andes, Jericó, San José del Nus y Santa Fe de Antioquia se agruparon con la variedad 'Morita', con una SG superior a 0.83, este alto grado de similitud indica que se trata de la misma variedad (Tabla 2).

Las muestras de los cultivos de las localidades de Fredonia y Cisneros, se agruparon con la variedad 'Bertoni'. De acuerdo con la información suministrada por los propietarios, de los cultivos en dichas localidades, las plantas cultivadas allí, proceden de orígenes e importaciones diferentes a los materiales que fueron importados por la Secretaria de Agricultura de Antioquia quien introdujo la variedad 'Morita' y difieren también del origen de importación de la variedad 'Morita' de referencia para este estudio. Así, las muestras de 'Bertoni', SRQ-93, Cisneros y Fredonia se ubicaron en

un grupo (Tabla 2). Las procedentes de Fredonia y Cisneros presentaron una SG de 0.81 y SRQ-93 0.79 respecto a la variedad 'Bertoni', valores altos si se considera el uso de una sola combinación de iniciadores, lo que sugiere que puedan considerarse la misma variedad (Figura 4).

La presencia de la SRQ-93 en laboratorios de la Universidad de Antioquia, se deriva de materiales vegetales que ingresaron al país al inicio de los años 90, mucho antes de la introducción de la variedad 'Morita', estos materiales han sido propagados desde entonces en condiciones *in vitro* y estos resultados confirman su correspondencia con la variedad 'Bertoni'. Las variaciones encontradas en estas muestras pueden deberse no solo a las diferencias entre individuos si no también a la variación somaclonal posible, como resultado de la continua propagación *in vitro*. Variaciones en los análisis de AFLP, similares a las encontradas entre las muestras de diferentes localidades y también dentro de una misma localidad, han sido referidas en otras especies cuya propagación se realiza igual que en *Stevia*, de forma asexual, como el caso de *Coffea arabica* (Sánchez *et al.*, 2003), *Agave tequilana* (Gil-Vega *et al.*, 2006) e incluso se han encontrado variación entre plantas derivadas de la misma planta madre (Infante *et al.*, 2003). Esta variación si bien, puede ser importante como fuente de variabilidad genética en procesos de mejoramiento genético (Vaugh *et al.*, 2006) debe ser considerada de manera particular a fin de preservar las características agronómicas y de producción en cultivos comerciales.

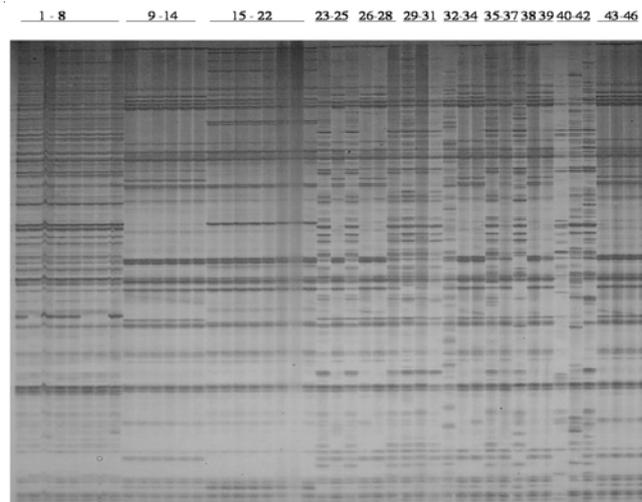


Figura 3. AFLP generado con la combinación de iniciadores *Eco* RI-AGG / *Tru* 9I-ATG para muestras procedentes de diferentes localidades en el Departamento de Antioquia. Carriles 1-8 'Bertoni', 9-14 'Morita', 15-22 SRQ-93, 23-25 Támesis, 26-28 Jericó, 29-31 Fredonia, 32-34 Andes, 35-37 Santa Fe de Antioquia, 38-39 San José del Nus, 40-42 Cisneros, 43-46 'Morita' (campo).

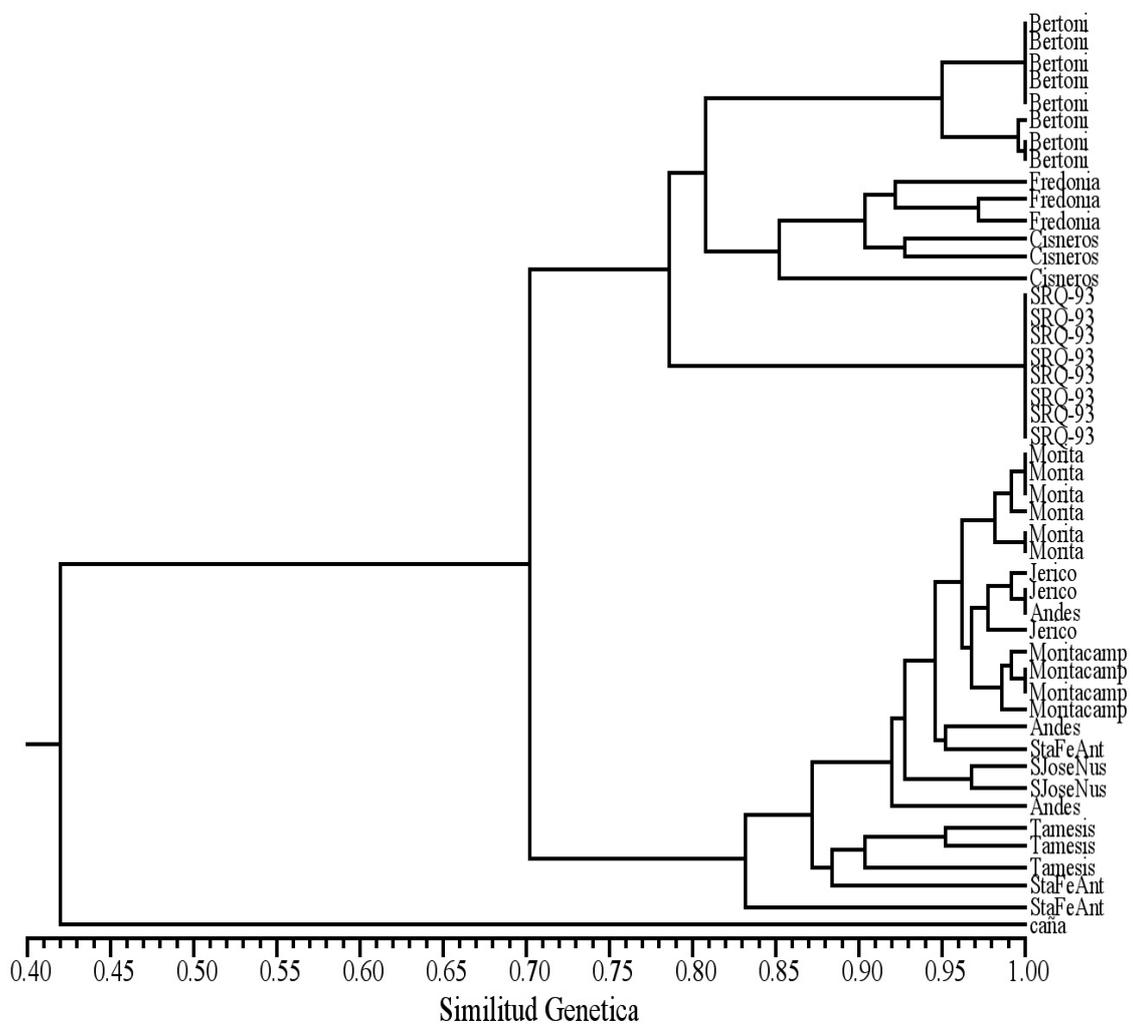


Figura 4. Dendrograma UPGMA de similitud genética calculada con el coeficiente de Dice para *Stevia rebaudiana* cultivada en el departamento de Antioquia, usando la combinación de iniciadores *Eco* RI-AGG / *Tru* 9I-ATG y NTsys pc2.

Tabla 2. Agrupamiento de las muestras de *Stevia rebaudiana* procedentes de diferentes localidades en el Departamento de Antioquia, como resultado de la información generada por AFLP.

	Procedencia de Muestras	Agrupamiento
1	SRQ-93	Bertoni
2	Támesis	Morita
3	Jericó	Morita
4	Fredonia	Bertoni
5	Andes	Morita
6	Santa Fe de Antioquia	Morita
7	San Jose del Nus	Morita
8	Cisneros	Bertoni
9	Barbosa	Morita

La técnica de AFLP permitió caracterizar los cultivos de *Stevia* existentes en Antioquia, discriminando las variedades 'Bertoni' y 'Morita'. La combinación de iniciadores EcoRI-AGG / Tru9I-ATG fue suficiente para diferenciar las variedades presentes en los cultivos de *Stevia* en las diferentes localidades consideradas lo cual respalda la información disponible acerca de algunas de ellas. La detección de posible variación somaclonal en los materiales vegetales, sugiere la realización de estudios posteriores encaminados a evaluar las características agronómicas y de producción de los mismos, además de su posible utilización en programas de mejoramiento genético o conservación.

Agradecimientos

Agradecimientos a la Doctora Lucia Atehortua y al laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Antioquia y al Instituto de Biotecnología de las Plantas (Santa Clara, Cuba).

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación de la RED ALFA-CARIBIOTEC, el Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI) de la Universidad de Antioquia y la cooperación de diferentes cultivadores de *Stevia* en el Departamento de Antioquia.

REFERENCIAS

Aitken K S, P A Jacson, C L Mac Intery (2005) A combination of AFLP and SSR markers provides extensive map coverage and identification of homo(eo)logous linkage groups in a sugarcane cultivars. Theor. App. Gen. 110:789-801

Arencibia, Ariel, Coto Orlando, Delgado Miladys, García Héctor, Jorge Héctor, Jorge Ibis (2006) Caracterización molecular de variedades cubanas de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) mediante AFLP. Revista Fitotecnia Mexicana 29 (1): 19-25

Brandle, J E, Rosa N (1992) Heritability for yield, leaf-stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. Can. J. Plant Sci. 72: 1263-1266

Cervera, MT, Cabezas JA, Sancha JC, Martínez de Toda F, Martínez Zapater JM (1998) Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). Theoretical and Applied Genetics 97(1-2): 51-59

Dice LR (1945) Measures of amount of ecologic association between species. Ecology 26: 297-302

Duke, J (1993) *Stevia rebaudiana*. En: J Duke (Ed.) CRC Handbook of alternative cash crops, pp. 422-424. CRC Press, Boca Raton, FL.

Gil-Vega K, Díaz C, Nava-Cedillo A, Simpson J (2006) AFLP análisis de *Agave tequilana* varieties. Plant Science. 170: 904-909.

Infante D, González G, Peraza-Echeverría L, Keb-Llanes M (2003) Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes*. Plant Sci. 164: 223-230

Jarma A, Rengifo T, Araméndiz-Tatis H (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

Jianjun Chen, Pachanoor S Devanand, David J Norman, Richard J Henny, And Chih-Cheng T Chao (2004) Genetic Relationships of *Aglaonema* species and cultivars Inferred from AFLP Markers. Annals of Botany 93: 157-166.

Morita T, Bu Y, Morita kagaku Kogyo Co, Ltd. (2000) Variety of *Stevia rebaudiana* Bertoni. United States Patent. Patent number 6,031,157.

Newbury, HJ, Howell EC, Crouch, JH Ford-Lloyd, BV (2000) Natural and culture-induced genetic variation in plantains (*Musa* spp. AAB group). Aust J Bot 48: 493-500.

Rohlf, FJ (1998) NTSYS pc: Numerical Taxonomy System, Version 2.02 Exeter Publishing, Setauket, NY.

Sánchez-Teyer, LF Quiroz-Figueroa F, Loyola-Vargas, Infante V D (2003) Culture-induced variation in plants of *Coffea arabica* cv. Caturra Rojo, regenerated by direct and indirect somatic embryogenesis. Mol. Biotechnol. 23: 107-115.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kupier M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23: 4407-4414.

Waugh, R, Leader, DJ, McCallum, N, Caldwell, D (2006) Harvesting the potential of induced biological diversity. Trends in Plant Science 11(2): 71-79

Williams, J, Kubelik A, Livak A, Rafalski J, Tingey S (1990) Nucleic Acids Res. 18: 6531

Yao Y, M Ban J Brandle (1999) A genetic linkage map for *Stevia rebaudiana*. Genome 42: 657-661