

## Micropropagación de plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni a partir de explantes *ex vitro*

Dionys González-Hernández<sup>1\*</sup>, Elizabeth Kairuz Hernández-Díaz<sup>1,2</sup>, Alina Capote<sup>1</sup>, Anabel Pérez<sup>1</sup>, Leonardo Rivero<sup>1</sup>, Borys Chong-Pérez<sup>3</sup>, Naivy Pérez-Alonso<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

<sup>2</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

<sup>3</sup>Sociedad de Investigación y Servicios BioTECNOS Ltda. Camino a Pangal km 2,5. San Javier. Linares. Chile. CP 3660000.

<sup>4</sup>Botanical Solutions SpA. Ave Quilin 3550. Macul. Santiago de Chile. Chile. CP 7810000.

\*Autor para correspondencia e-mail: dionys@ibp.co.cu

### RESUMEN

*Stevia rebaudiana* Bertoni es una especie reconocida a nivel mundial por sus propiedades medicinales. El objetivo de este trabajo fue micropropagar plantas de *Stevia* a partir de explantes *ex vitro*. Se seleccionaron brotes de plantas de esta especie crecidas en casa de cultivo. En el establecimiento *in vitro*, se evaluó el efecto del tiempo de desinfección y la concentración de hipoclorito de sodio sobre la supervivencia del explante. Los explantes establecidos se transfirieron a medio de cultivo de multiplicación, donde se determinó el efecto de los reguladores de crecimiento (6-bencilaminopurina y ácido indolacético) y el número de subcultivos, sobre el coeficiente de multiplicación. Luego, se evaluó la respuesta de las plantas en la fase de aclimatización, en comparación con plantas propagadas mediante corte de esquejes. El hipoclorito de sodio al 1% permitió la desinfección de los explantes con una supervivencia de 94.5%, independientemente del tiempo. Los reguladores de crecimiento no modificaron el coeficiente de multiplicación con subcultivos cada 15 días. Es posible emplear diferentes combinaciones de sustrato a base de zeolita y compost durante la aclimatización de las plantas micropropagadas. Estas desarrollaron mayor número de hojas y altura, que las propagadas mediante corte de esquejes.

Palabras clave: aclimatización, esteviósidos, multiplicación, rebaudiósidos, reguladores de crecimiento

### Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni plants from *ex vitro* explants

#### ABSTRACT

*Stevia rebaudiana* Bertoni is a species recognized worldwide for its medicinal properties. The objective of this work was to micropropagate *Stevia* plants from *ex vitro* explants. Shoots of plants of this specie growing at greenhouse were selected. In the *in vitro* establishment, the effect of disinfection time and the concentration of sodium hypochlorite on the survival of the explant were evaluated. The established explants were transferred to the multiplication culture medium, where the effect of the growth regulators (6-benzylaminopurine and indoleacetic acid) and the number of subcultures on the multiplication coefficient were determined. Then, the response of the plants in the acclimatization phase was evaluated, in comparison with plants propagated by cutting. Sodium hypochlorite at 1% allowed the disinfection of the explants with a survival of 94.5%, regardless of the time. The growth regulators did not modify the multiplication coefficient with subcultures every 15 days. It is possible to use different combinations of substrate based on zeolite and compost during the acclimatization of

micropropagated plants. These developed a greater number of leaves and height than those propagated by cutting.

Keywords: acclimatization, growth regulators, multiplication procedure, rebaudiosides, steviosides

## INTRODUCCIÓN

*Stevia rebaudiana* es una especie de la familia *Asteraceae*, nativa de la región tropical de Sudamérica. Su cultivo y consumo se han incrementado, por el alto contenido de edulcorantes naturales no calóricos (esteviósidos y rebaudiósidos) que presenta como metabolitos secundarios. Estos compuestos (glucósidos de esteviol), son de 200-300 veces más dulces que la sacarosa y se consideran la mejor fuente alternativa de azúcar, principalmente para pacientes diabéticos y personas con obesidad (Gantait *et al.*, 2017). Varios autores han enfocado sus estudios en el cultivo *in vitro*, como método para la propagación masiva de esta especie, debido, principalmente, a que la germinación de las semillas es generalmente pobre y a que su floración está condicionada por un gran descenso en la temperatura media (Shahid-Akba *et al.*, 2014).

Dentro de las técnicas clásicas de cultivo *in vitro* empleadas en *Stevia*, se encuentran: la propagación clonal *in vitro* por cultivo de hojas, de segmentos internodales, de ápices, de callos y el cultivo de anteras. Los protocolos más eficientes y a la vez más extendidos son aquellos que utilizan explantes vegetativos (Gantait *et al.*, 2014). Sin embargo, se refieren algunos problemas que aún no se han podido resolver del todo. Entre estos se mencionan la formación de estructuras callosas en las plántulas micropropagadas y los períodos de subcultivos superiores a tres semanas con bajos coeficientes de multiplicación (Vives *et al.*, 2017). Por ello es necesario continuar desarrollando u optimizando los protocolos de propagación *in vitro* de esta especie. El presente estudio se realizó con el objetivo de obtener plantas *in vitro* de *Stevia rebaudiana* a partir de la micropropagación de ápices de plantas cultivadas *ex vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se emplearon brotes de plantas madre de *S. rebaudiana*, provenientes del Banco de

Germoplasma del IBP, cultivadas en condiciones de campo. Estas tenían tres meses de cultivo y se mostraban sanas y vigorosas. A dichas plantas se les realizaba manejo cultural basado en limpieza de malezas y uso de fungicidas (Pande y Gupta, 2013).

### Desinfección y establecimiento *in vitro* de explantes de *Stevia rebaudiana*

Para el establecimiento *in vitro* de *S. rebaudiana*, se seleccionaron plantas con buenas condiciones fisiológicas, coloración y sanidad, con abundantes hojas, entre dos y cuatro tallos y con una altura superior a 30 cm. Luego se cortaron segmentos tallo con una longitud de 5.0 a 7.0 cm medida a partir de los ápices caulinares y se mantuvieron las hojas. Inmediatamente, fueron llevados al laboratorio, para realizar la desinfección.

Para ello, se tuvo en cuenta el protocolo propuesto por Alvarenga (2005) con modificaciones. Primero se lavaron los segmentos de tallo tres veces con agua corriente alternando con la acción de detergentes y enjuagues. Posteriormente, se sumergieron en una solución del fungicida Benomil (3.0 g l<sup>-1</sup>) durante 20 minutos y se enjuagaron tres veces con agua destilada. Luego se realizó una desinfección con etanol al 70% durante 5 segundos, seguida por tratamiento con Hipoclorito de Sodio.

Se realizó un primer ensayo para seleccionar el tiempo de exposición al desinfectante (10, 15 y 20 min) y luego con ese tiempo se probaron cuatro concentraciones (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0%) (v/v). Por último, se efectuaron tres enjuagues con agua destilada estéril.

El material vegetal fue fragmentado hasta obtener ápices caulinares de 2-3 cm de longitud y se colocaron individualmente y de forma vertical en tubos de ensayo (100 x 125 mm) que contenían 15 ml del medio de cultivo de establecimiento.

Se utilizó el medio de cultivo MS con tiamina ( $0.10 \text{ g l}^{-1}$ ), mio-inositol ( $100 \text{ mg l}^{-1}$ ), sacarosa ( $30 \text{ g l}^{-1}$ ), Gelrite ( $2.6 \text{ g l}^{-1}$ ) y  $1.0 \text{ g l}^{-1}$  de 6-Bencilaminopurina (6-BAP). El pH se ajustó a 5.7 previo a la esterilización en autoclave. Finalmente, los explantes se colocaron en cámara de crecimiento con luz solar a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  con un periodo luminoso de aproximadamente 13/11h de luz/oscuridad con un rango de densidad flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) entre  $48.0$  y  $62.5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Se utilizaron 30 explantes en cada uno de los tratamientos. A los 21 días de cultivo, se cuantificó el número de explantes contaminados, necrosados y explantes viables sin necrosis o libres de contaminación microbiana visible. Además se calculó el porcentaje de supervivencia.

#### Multiplicación *in vitro*

##### *Efecto de reguladores del crecimiento en la multiplicación de brotes in vitro*

Los explantes establecidos fueron colocados en frascos de vidrio (cinco explantes por frasco, 50 explantes por tratamiento) con capacidad de 250 ml con 30 ml del medio de cultivo de multiplicación de igual composición que el medio de cultivo de establecimiento, excepto las concentraciones de reguladores de crecimiento (Tabla 1). A los 15 días, se realizó el subcultivo, fragmentando cada explante en segmentos/brotes viables, de al menos una yema y se calculó el coeficiente de multiplicación (CM=segmentos totales/segmentos iniciales).

##### *Efecto del número de subcultivos en el coeficiente de multiplicación*

Una vez determinada la concentración de reguladores de crecimiento a emplear en el medio de cultivo para la multiplicación de los brotes, se realizaron cinco subcultivos cada 15 días. En cada uno se calculó el coeficiente de multiplicación.

#### Fase de aclimatización

Las plántulas regeneradas, con una altura entre 7-10 cm, presencia de varias raíces y al menos cuatro pares de hojas, fueron transferidas a bandejas de polipropileno de 28 alveolos con sustrato compuesto por diferentes porcentajes de zeolita y compost de cachaza (25:75, 75:25, 50:50, 0:100, 100:0). Las bandejas se ubicaron casa de cultivo (temperatura promedio durante el día de  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , humedad relativa 70%, intensidad luminosa entre  $224$  y  $457 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , frecuencia de riego de tres minutos de duración dos veces al día) para su aclimatización, donde permanecieron por 15 días.

Luego, según su crecimiento y presencia de un sistema radical bien desarrollado, fueron transferidas a bolsas de cultivo y mantenidas bajo las mismas condiciones. A los 15 días, se cuantificó el número de plantas que sobrevivieron y se calculó el porcentaje de supervivencia.

##### *Evaluación de variables morfométricas de las plantas en aclimatización*

Paralelamente a la transferencia de las plantas micropropagadas a bolsas con el sustrato

Tabla 1. Combinaciones de concentraciones de reguladores de crecimiento 6-bencilaminopurina (6-BAP) y ácido indoleacético (AIA) añadidas al medio de cultivo de multiplicación de *Stevia rebaudiana*.

No. Tratamiento	6-BAP ( $\text{mg l}^{-1}$ )	AIA ( $\text{mg l}^{-1}$ )
1	0	0
2	2	1
3	4	1
4	2	0
5	4	0

seleccionado se realizó el corte de esquejes a plantas cultivadas *ex vitro* a una altura de 15-20 cm, según las técnicas tradicionales.

En ambos casos se eligieron plantas con alturas similares (30 plantas por tratamiento) y se mantuvieron en las condiciones de cultivo previamente descritas. Luego de transcurridos 60 días se evaluaron las variables: altura de la planta (cm), número de hojas y número de tallos por planta.

#### Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico y la elaboración de los gráficos se empleó el software Statistica versión 10.0 para Windows. Para contrastar la normalidad del conjunto de datos obtenidos para cada variable, se utilizaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro Wilk con la corrección de Lilliefors. Para la comparación entre las medias se aplicó la prueba H de Kruskal-Wallis y de ser necesario se realizó la comparación de medias *a posteriori*, la prueba de U de Mann Whitney o Tablas de Contingencia 2x2. Además, se realizó un análisis de correlación de Spearman entre las variables tiempo de desinfección al desinfectante, concentración del desinfectante y número de explantes necrosados y contaminados. En cada análisis

se especifica el valor al cual se establecieron las diferencias.

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### Desinfección y establecimiento *in vitro* de explantes de *Stevia rebaudiana*

De los 360 explantes establecidos, el 56.9% se desarrollaron hasta una altura entre 10-15 cm y formaron brotes (Figura 1). No se encontraron diferencias significativas al comparar el efecto del tiempo de desinfección sobre el número de explantes necrosados y contaminados. No existió una correlación entre el número de explantes necrosados o contaminados y el tiempo de desinfección. Por ello, se consideró que es posible realizar la desinfección con hipoclorito de sodio entre 10 y 20 minutos, sin afectar la viabilidad de los explantes. Por esta razón seleccionó el tiempo de 15 minutos para continuar con los ensayos.

En contraste, la concentración de hipoclorito de sodio provocó diferencias significativas sobre el número de explantes necrosados y contaminados (Figura 2). Existió una correlación positiva entre el número de explantes necrosados y la concentración de hipoclorito de sodio (R de Spearman 0.927,  $p < 0.01$ ). Al aumentar la concentración del

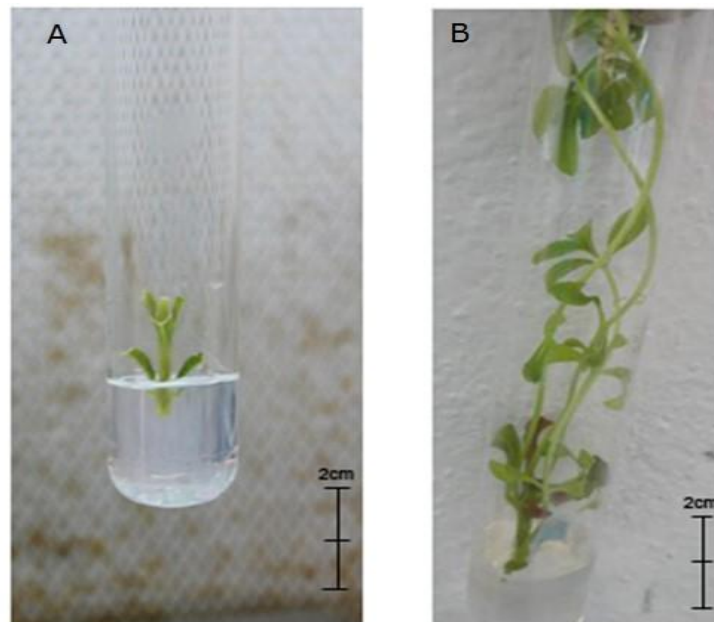


Figura 1. Explantes de *Stevia rebaudiana* en medio de cultivo para el establecimiento *in vitro*, luego del proceso de desinfección (A) y 21 días después del establecimiento *in vitro* (B).

desinfectante, aumentó el daño producido al tejido.

La mayor concentración a la cual se produjo menor mortalidad sobre los explantes fue la de 1.0% (v/v) de hipoclorito. Este efecto se invirtió al analizar el número de explantes contaminados, donde al incrementar las concentraciones de hipoclorito de sodio, se minimizó significativamente la contaminación microbiana (R de Spearman -0.9659,  $p < 0.01$ ). De acuerdo con los resultados de porcentaje de supervivencia (94.5%) y de desinfección (81.1%), se seleccionó el tratamiento con hipoclorito de sodio al 1.0% para la desinfección.

En la literatura científica referente a esta especie, se ha descrito el uso de NaOCl al 1.0% como agente de desinfección a diferentes tiempos de exposición en varios trabajos (Shatnawi *et al.*, 2011; Namdari *et al.*, 2015; Martínez-Rivillas *et al.*, 2016), en contraposición al uso de bicloruro de mercurio ( $HgCl_2$ ) (Modi *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2014). Estos últimos han referido haber alcanzado muy bajos índices de contaminación microbiana, pero es necesario mencionar que el  $HgCl_2$  es un producto altamente tóxico y difícil de eliminar de los explantes. Específicamente Martínez-Rivillas *et al.* (2016), obtuvieron con igual concentración

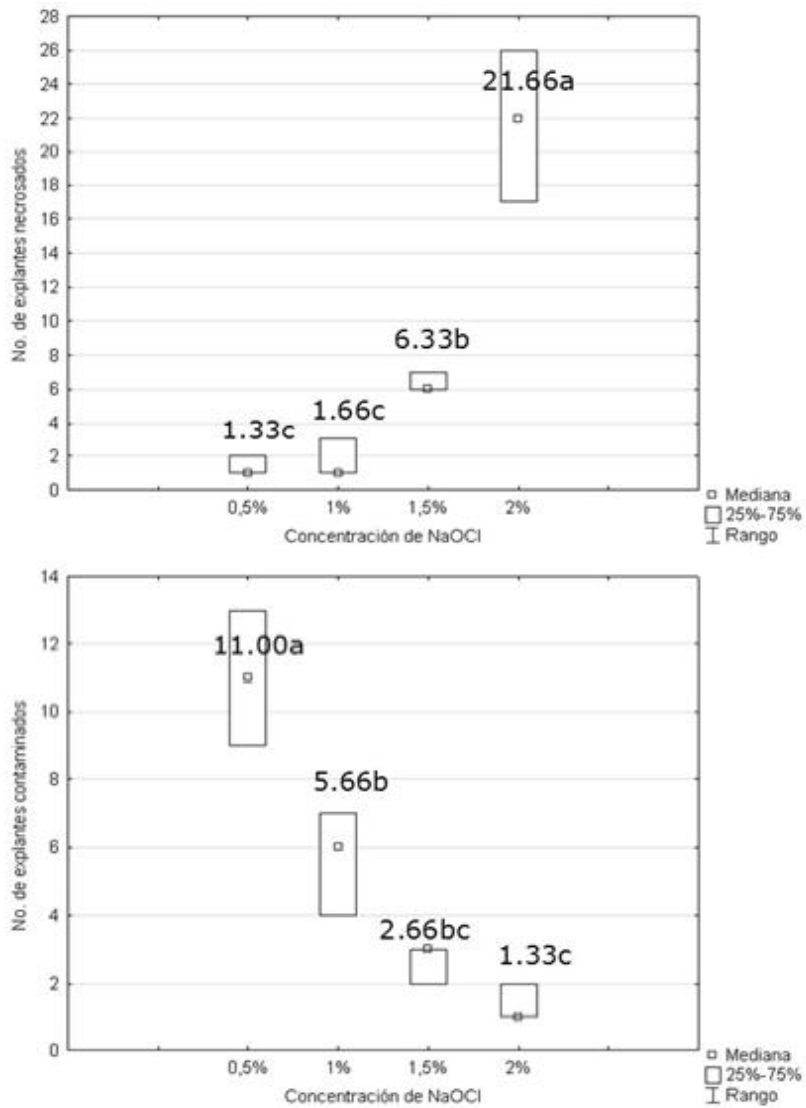


Figura 2. Efecto de la concentración de hipoclorito de sodio sobre el número de explantes necrosados y contaminados en el establecimiento *in vitro* de *Stevia rebaudiana*. Medias con letras desiguales difieren según Tablas de contingencia 2x2,  $p < 0.05$ .  $n = 30$ .

de NaOCl, pero menos tiempo de desinfección (5 min), una supervivencia de 83.33% y una desinfección del 66.67%, utilizando como explantes brotes jóvenes de *Stevia*. Los resultados del presente trabajo en este aspecto fueron numéricamente superiores.

#### Multiplicación *in vitro*

##### *Efecto de reguladores del crecimiento en la multiplicación de plantas in vitro*

No se encontraron diferencias significativas entre los coeficientes de multiplicación por tratamiento (Figura 3). El empleo de las combinaciones de reguladores de crecimiento evaluadas, no modificó el coeficiente de multiplicación.

Se observó una tendencia en los explantes a aumentar su longitud (7-10 cm) en lugar de formar nuevos brotes. Esto posiblemente esté relacionado, según Tamura *et al.* (1984), con el tamaño relativo del explante. En esa investigación se observó que en los ápices menores a 1.5 cm se indujeron con mayor frecuencia brotes múltiples, que en aquellos de mayor longitud. Este aspecto debe

corroborarse en investigaciones posteriores. Durante el segundo subcultivo de los explantes, los segmentos en medio de cultivo de multiplicación con reguladores de crecimiento (Tratamientos del 2-5), se tornaron delgados, hiperhídricos y en algunos casos despigmentados. En el tratamiento control sin reguladores del crecimiento (tratamiento 1), no se produjo afectación en el desarrollo de los brotes. Se decidió, por lo tanto, no emplear reguladores de crecimiento en la composición del medio de cultivo para la multiplicación en los siguientes subcultivos. En el estudio efectuado por Modi *et al.* (2012), también se empleó efectivamente un medio de cultivo MS modificado con sacarosa, agar y sin reguladores de crecimiento para la multiplicación, y se observó la aparición de raíces y la inducción de hiperhidricidad y otras deformaciones en los explantes después de algunos subcultivos, debido a la presencia de los reguladores de crecimiento.

Asimismo, la investigación de Condori-Laurente (2013) mostró que la adición de reguladores de crecimiento no influyó significativamente en la supervivencia, ritmo de crecimiento ni en el número de hojas por planta. A su vez, Martínez-

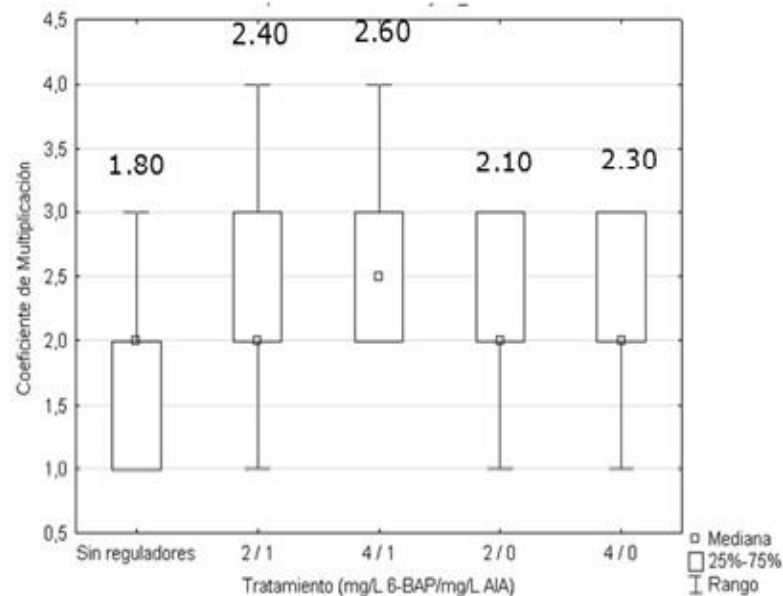


Figura 3. Efecto de la concentración de 6-bencilaminopurina y ácido indolacético sobre el coeficiente de multiplicación de brotes de *Stevia rebaudiana*, luego de 15 días en medio de cultivo de multiplicación. Los valores medios por tratamiento no fueron significativamente diferentes, de acuerdo con la prueba H de Kruskal Wallis,  $p > 0.05$ .  $n = 50$ .

Rivillas *et al.* (2016) expusieron que se produjo una disminución del tamaño foliar y un acortamiento de los tallos de explantes tras el tercer subcultivo en medio de cultivo con reguladores de crecimiento. Características que desaparecían tras subcultivar los explantes en uno libre de estos. Dichos resultados apoyan la posibilidad de no emplear reguladores del crecimiento para el proceso de multiplicación *in vitro*.

*Efecto del número de subcultivos en el coeficiente de multiplicación*

El número de segmentos viables obtenidos de cada brote, no fue significativamente diferente durante los subcultivos 1, 2, 4 y 5 (Figura 4). No obstante, en el tercer subcultivo se produjo un incremento significativo de este coeficiente. Luego del quinto subcultivo se apreciaron daños en el estado fisiológico del material vegetal con brotes delgados, marchitez en las hojas y en los brotes nuevos. Sin embargo, no se apreció la formación de estructuras callosas en la base de los explantes que ha sido una de las problemáticas descritas que limita la micropropagación de la especie (Tamura *et al.*, 1984; Preethi *et al.*, 2011).

Atendiendo a estos resultados no se continuaron los subcultivos en la fase de

multiplicación después del quinto. En *Stevia* se ha estudiado poco el efecto del número máximo de subcultivos sobre la multiplicación. Se ha prestado más atención, sin embargo, al período en que estos se realizan que es principalmente de 28 días (Modi *et al.*, 2012), 30 días (Preethi *et al.*, 2011) y de 30-45 días (Jiménez, 2011). Cabe destacar que estos autores utilizan medios de cultivo con reguladores de crecimiento y que logran la inducción de brotes múltiples, en contraste con los resultados de esta investigación. El tiempo de subcultivo cada 15 días utilizado coincide con lo informado por Laribi *et al.* (2012) y Martínez-Rivillas *et al.* (2016).

Se destaca que las plantas obtenidas luego del quinto subcultivo, presentaban raíces lo cual permitió prescindir de la fase de enraizamiento y transferir a la fase de aclimatización aquellas plantas con altura entre 7 y 10 cm, presencia de varias raíces y más de cuatro pares de hojas.

Fase de aclimatización

Las condiciones de manejo agronómico de las plantas y los sustratos utilizados en este trabajo, permitieron alcanzar entre 80 y 85% de supervivencia en las combinaciones de sustratos, y 90% en los sustratos puros, sin diferencias significativas entre los tratamientos. Atendiendo a ello la

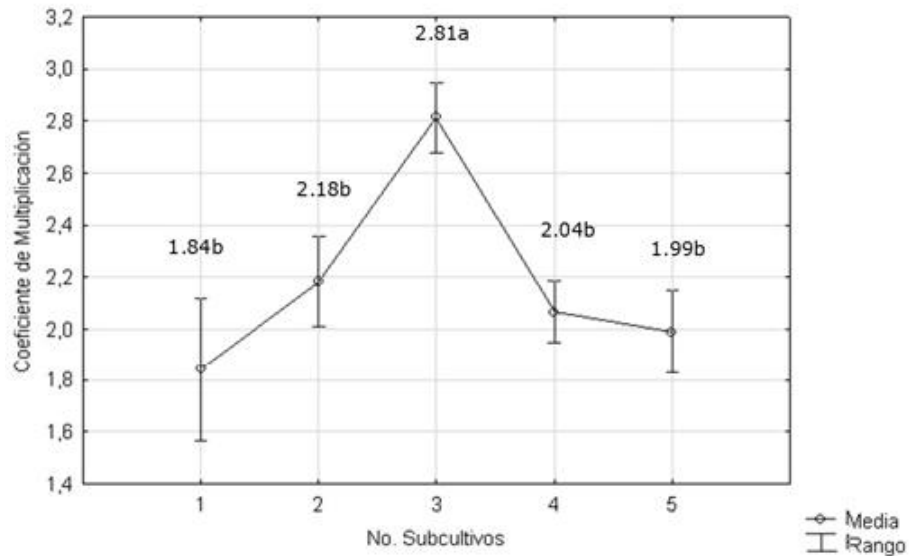


Figura 4. Efecto del número de subcultivos sobre el coeficiente de multiplicación de *Stevia rebaudiana*. Medias con letras desiguales difieren según las pruebas H de Kruskal-Wallis y comparación de medias a posteriori, p<0.05.

supervivencia de las plantas no fue dependiente de la composición del sustrato. Luego, es posible emplear todas las combinaciones valoradas en este trabajo, durante la fase de aclimatización.

Según Aguirre-Dávila (2008), *Stevia* ha sido cultivada en una amplia gama de suelos, con diferentes características fisicoquímicas (tanto arenosos como orgánicos) con porcentajes de supervivencia variables. En este sentido, Cifuentes-Hidalgo (2003) alcanzó un promedio de 13% de supervivencia con un sustrato de 25% Promix y 75% Arena, mientras Aguirre-Dávila (2008) utilizó un sustrato compuesto por humus de lombriz, pomina y fibra de coco con una relación de 2:1:1, y la supervivencia alcanzó 96%. Por otra parte, Khan *et al.* (2014) evaluaron varias combinaciones de tierra, Soilrite y vermiculita y la mejor proporción 2:1:1 alcanzó una supervivencia de 75%. Sin embargo, en el presente trabajo, los valores de supervivencia se mantuvieron por encima de 80% en todos los tratamientos.

Es una ventaja que la especie en cuestión cuente con plasticidad para crecer en diferentes sustratos y mantenga, según los resultados alcanzados, altas tasas de

supervivencia en medios diferentes. Esto permite transferir a las plantas hacia la fase de aclimatización, con independencia del sustrato. Es posible utilizar el sustrato más económico, o de mayor disponibilidad, indistintamente sin afectar la supervivencia y de acuerdo con las condiciones del lugar donde se ejecute.

#### *Evaluación de variables morfológicas de las plantas en aclimatización*

La altura (Figura 5) y el número de hojas (Figura 6) de las plantas micropropagadas, fueron significativamente superiores a los observados en las plantas propagadas por corte de esquejes. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de plantas para el número de tallos. Los valores alcanzados por esta variable oscilaron entre 5.30 y 4.54. Generalmente, el desarrollo de protocolos de propagación *in vitro* solo comprende, hasta la evaluación de la supervivencia en la transferencia a fase de aclimatización. Sin embargo ya se ha establecido que las plantas cultivadas *in vitro* muestran superioridad a las plantas propagadas por métodos tradicionales (Figura 7) debido al rejuvenecimiento y al saneamiento (Jiménez, 1998).

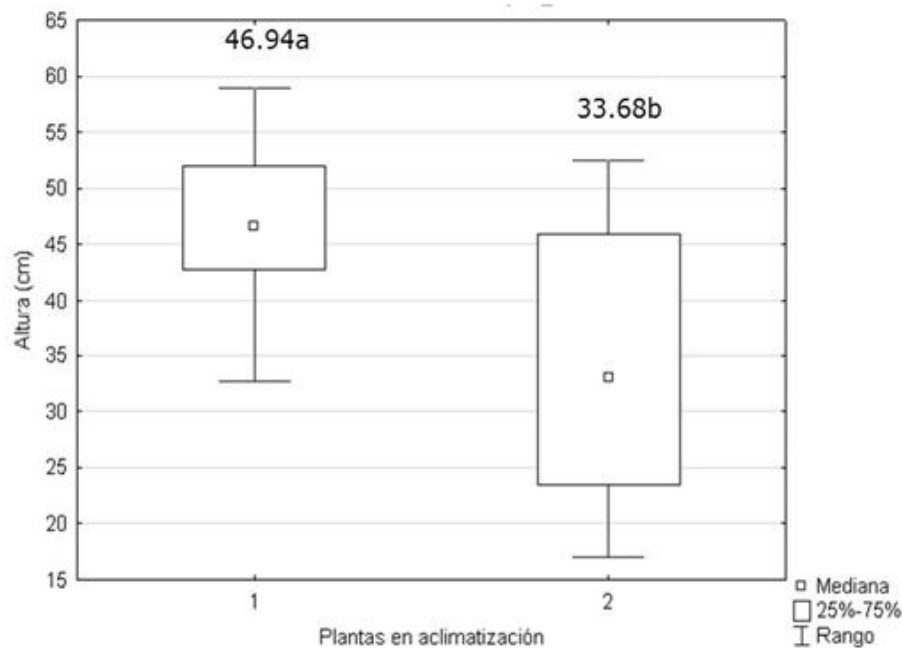


Figura 5. Altura de plantas de *Stevia rebaudiana* micropropagadas (1) y propagadas por cortes de esquejes (2) a los 60 días en casa de cultivo. Medias con letras desiguales difieren según prueba U de Mann Whitney,  $p < 0.05$ .  $n = 30$ .



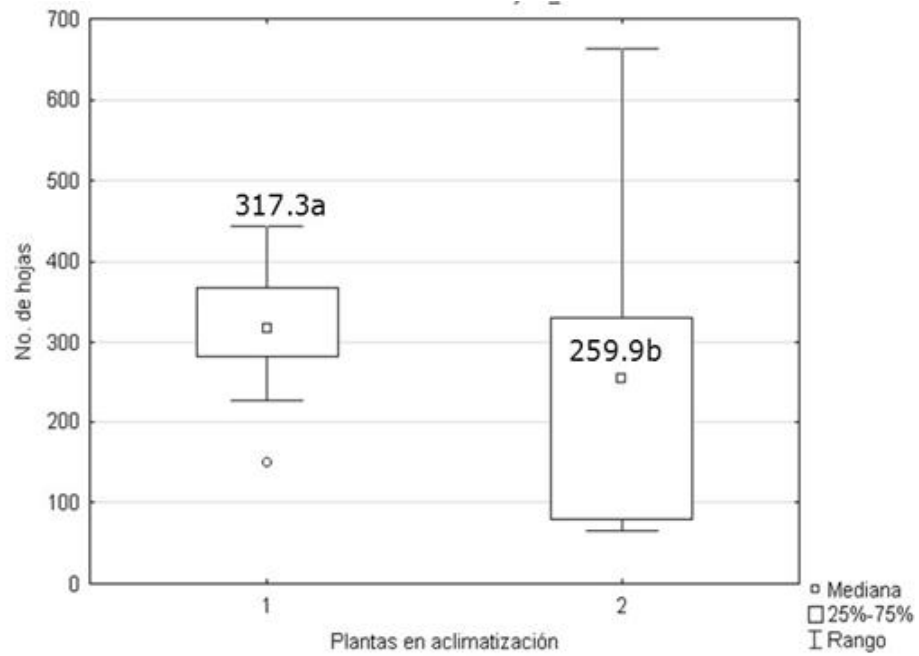


Figura 6. Número de hojas de plantas de *Stevia rebaudiana* micropropagadas (1) y propagadas por cortes de esquejes (2) a los 60 días en casa de cultivo. Medias con letras desiguales difieren según prueba U de Mann Whitney,  $p < 0.05$ .  $n = 30$ .



Figura 7. Plantas de *Stevia rebaudiana* a los 60 días en casa de cultivo. Micropropagadas (A y B) y propagadas por cortes de esquejes (C y D).

A partir de los ensayos realizados se estableció la micropropagación de *S. rebaudiana* mediante organogénesis con ápices de plantas cultivadas *ex vitro* como explante inicial, desinfección con NaClO al 1% durante 15 minutos (más de 90% de supervivencia), multiplicación *in vitro* de las plantas en medio de cultivo semisólido sin reguladores del crecimiento, durante cinco subcultivos (coeficiente de multiplicación 2.0-2.8 y presencia de raíces), sin necesidad de

fase de enraizamiento y aclimatización en combinaciones de sustratos con zeolita y compost de cachaza. Se destaca la ausencia de callo basal en las plantas *in vitro* y supervivencia por encima de 80% en la fase de aclimatización.

#### CONCLUSIONES

Con las condiciones experimentales empleadas en este trabajo se obtienen plantas *in vitro*

de *Stevia rebaudiana* micropropagadas a partir de ápices de plantas cultivadas *ex vitro*.

Conflicto de interés

Los autores no declaran conflicto de interés.

## REFERENCIAS

Aguirre-Dávila XD (2008) Evaluación de un sistema de producción *in vitro* y en invernadero de plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Tesis de Licenciatura, Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador

Alvarenga S (2005) Optimización del cultivo y procesamiento de *Stevia rebaudiana* para la obtención de un edulcorante natural. CONICIT, San José, Costa Rica

Cifuentes-Hidalgo EM (2003) Enraizamiento *in vitro* y aclimatación de *Stevia rebaudiana* B.. Tesis de Licenciatura, Zamorano, Zamorano, Honduras

Condori-Laurente K (2013) Efecto de dosis de Bencilaminopurina (BAP) y el Ácido naftalemacético (ANA) en la producción *in vitro* de estevia (*Stevia rebaudiana* B.) en Acobamba. Tesis de Ingeniería, Universidad Nacional de Huancavelica, Acobamba, Huancavelica, Perú

Gantait S, Das A, Mandal N (2014) *Stevia*: A Comprehensive Review on Ethnopharmacological Properties and *In vitro* Regeneration. Sugar Tech 17(2): 95-106; doi: 10.1007/s12355-014-0316-3

Gantait S, Das A, Banerjee J (2017) Geographical Distribution, Botanical Description and Self-Incompatibility Mechanism of Genus *Stevia*. Sugar Tech 20(1): 1-10; doi: 10.1007/s12355-017-0563-1

Jiménez E (1998) Cultivo de ápices y meristemas. En: Pérez Ponce JN (eds). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología, pp. 45-46. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Villa Clara

Jiménez KM (2011) Evaluación del desarrollo *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni con el empleo de sistemas de micropropagación semisólido, inmersión temporal RITA y biorreactor de burbujeo. Tesis de Ingeniería, Escuela de Biología Instituto Tecnológico de Costa Rica, San José, Costa Rica

Khan MK, Misra P, Sharma T, Shukla PK, Ramteke PW (2014) Effect of adenine sulphate on *in vitro* mass propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Journal of Medicinal Plant Research 8(13): 543-549; doi: 10.5897/JMPR2013.5217

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

Martínez-Rivillas D, Urrea A, Jiménez E, Atehortua L (2016) Estrategia para la propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Biotecnología Vegetal 16(3): 131 – 142

Modi AR, Patil G, Kumar N, Singh AS, 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 Tech 14(4): 391-397; doi: 10.1007/s12355-012-0169-6

Namdari N, Shooshtari L, Qaderi A (2015) *In vitro* micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Biological Forum 7(1): 1750-1754

Pande SS, Gupta P (2013) Plant tissue culture of *Stevia rebaudiana* (Bertoni): A review. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy 5(1): 26-33; doi: 10.5897/JPP13.0258

Preethi D, Sridhar T, Naidu C (2011) Direct Shoot Organogenesis from Leaf Explants of *Stevia rebaudiana*. Journal of Phytology 3(5): 69-73

Shahid-Akba K, Roshan Z, Nisar A (2014) Selection of suitable propagation method for consistent plantlets production in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Saudi Journal of Biological Sciences 21(6): 566-573; doi: 10.1016/j.sjbs.2014.02.005

Shatnawi MA, Shibli RA, Abu-Romman SM, Al-Mazraawi MS, Al Ajlouni ZI, Shatanawi WA, Odeh WH (2011) Clonal propagation and cryogenic storage of the medicinal plant *Stevia rebaudiana*. Spanish Journal of Agricultural Research 9(1): 213-220

Singh P, Dwivedi P, Atri N (2014) *In vitro* shoot multiplication of *Stevia* and assessment of

stevioside content and genetic fidelity of the regenerants. Sugar Tech 16(4): 430-439; doi: 10.1007/s12355-013-0292-z

Tamura Y, Nakamura S, Fukui H, Tabata M (1984) Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni by stem-tip culture. Plant Cell Reports Japan 3: 183-185; doi: 10.1007/BF00270195

Vives K, Andújar I, Lorenzo JC, Concepción O, Hernández M, Escalona M (2017) Comparison of different *in vitro* micropropagation methods of *Stevia rebaudiana* B. including temporary immersion

bioreactor (BIT). Plant Cell Tissue Organ Cult 131(1): 195-199; doi: 10.1007/s11240-017-1258-8

Recibido: 20-11-2018

Aceptado: 28-01-2019

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/> Está permitido su uso, distribución o reproducción citando la fuente original y autores.