

## Efecto de la poda en la producción de biomasa y contenido de esteviolglucósidos de *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Morita II

Marielys González<sup>1</sup>, Marcos Daquinta<sup>1</sup>, Danilo Pina<sup>1</sup>, Nayansi Portal<sup>3</sup>, Osbel Mosqueda<sup>1</sup>, Ivan Andújar<sup>1</sup>, Luzgrey González<sup>1</sup>, Susett González<sup>2</sup>, Lianny Pérez<sup>2</sup>, Yarianne Lezcano<sup>1</sup>, Oscar Concepción<sup>1</sup>, Maritza Escalona<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos, Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila Máximo Gómez Báez. Carretera a Morón km 9. Ciego de Ávila. Ciego de Ávila. Cuba. CP 69450.

<sup>2</sup>Laboratorio de Ingeniería Metabólica, Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila Máximo Gómez Báez. Carretera a Morón km 9. Ciego de Ávila. Ciego de Ávila. Cuba. CP 69450.

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias, Ciego de Ávila, Universidad de Ciego de Ávila Máximo Gómez Báez. Carretera a Morón km 9. Ciego de Ávila. Ciego de Ávila. Cuba. CP 69450.

\* Autora para correspondencia e-mail: marielys@bioplasmas.cu

### RESUMEN

Para la producción de hoja seca de *Stevia rebaudiana* Bertoni en las condiciones climáticas de Cuba es necesario identificar las variables agrotécnicas de mayor impacto en el rendimiento. Por ello, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la frecuencia de poda en la producción de biomasa y contenido de esteviolglucósidos. Se emplearon plantas de *S. rebaudiana* var. Morita II cultivadas durante 180 días en cantero. Se ensayaron tres frecuencias de poda: cada 30, 60 y 90 días. Como control se emplearon plantas sin podar. Las variables evaluadas fueron altura de la planta, número de ramas por planta, número de hojas por planta, masa fresca y seca de las hojas y los tallos por planta y el porcentaje de floración. Además, se estimó el rendimiento de masa seca por hectárea y se determinó el contenido de esteviolglucósido. Los resultados revelaron que la mejor frecuencia de poda de las plantas de *S. rebaudiana* fue cada 60 días. Los resultados de las variables agronómicas evaluadas fueron superiores a los obtenidos con las podas cada 30 y 90 días, con excepción de la altura de la planta y el porcentaje de floración. Con podas cada 60 días el rendimiento fue 1.19 t ha<sup>-1</sup> y el contenido de esteviolglucósidos alcanzó 255.39 mg g<sup>-1</sup> de masa seca. Los resultados demostraron que la frecuencia de poda influye en la producción de biomasa y en los principales componentes del rendimiento de biomasa, así como en el contenido de esteviolglucósidos en extractos acuosos clarificados de *S. rebaudiana* var. Morita II cultivada en condiciones de cantero.

Palabras clave: cantero, frecuencia de poda, hierba dulce

### Effect of pruning in biomass production and steviol glycosides contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Morita II

#### ABSTRACT

For the production of dry leaf of *Stevia rebaudiana* Bertoni under the Cuban climatic conditions, it is necessary to identify the agrotechnical variables with the greatest impact on its yield. Therefore, the objective of this work was to determine the effect of pruning frequency on biomass production and steviolglycoside content. Plants of *S. rebaudiana* var. Morita II grown for 180 days in the stonecutter were employed. Three pruning frequencies were tested: every 30, 60 and 90 days. As a control, plants without pruning were used. The variables evaluated were the height of the plant, the number of branches per plant, the number of leaves per plant, the fresh and dry mass of the leaves and stems per plant and the percentage of flowering. In addition, the yield of dry mass per hectare was estimated and the content of

steviolglycoside was determined. The results revealed that the best pruning frequency of *S. rebaudiana* plants was every 60 days. The results of the agronomic variables evaluated were higher than those obtained with pruning every 30 and 90 days, with the exception of the height of the plant and the percentage of flowering. With pruning every 60 days the yield was 1.19 t ha<sup>-1</sup> and the steviolglycoside content reached 255.39 mg g<sup>-1</sup> of dry mass. The results showed that the pruning frequency influences the production of biomass and the main components of the biomass yield, as well as the content of steviolglycosides in clarified aqueous extracts of *S. rebaudiana* var. Morita II grown under conditions of stonecutter.

Keywords: pruning frequency, stonecutter, sweet grass

## INTRODUCCIÓN

*Stevia rebaudiana* Bertoni es una planta herbácea de la familia *Asteraceae* y originaria del Paraguay. Es conocida como el único edulcorante natural no calórico y es aproximadamente 300 veces más dulce que la sacarosa. Su importancia es especialmente relevante en las condiciones de la sociedad actual donde la demanda se mueve hacia los alimentos más naturales y por otro lado al incremento mundial de enfermedades asociadas a desorden nutricional como *Diabetes mellitus* (Landázuri y Tigrero, 2009; Ritu y Nandini, 2016; Hossain *et al.*, 2017; Ruiz *et al.*, 2017).

Esta planta se propaga naturalmente por semillas. Sin embargo, el bajo nivel de germinación de las semillas y la pérdida de la viabilidad son factores limitantes para el cultivo de esta especie a gran escala (Khalil *et al.*, 2014; Kilam *et al.*, 2015; Shahverdi *et al.*, 2017).

La micropropagación y propagación por estacas o esquejes constituyen alternativas para contrarrestar estas desventajas. Son ampliamente utilizadas y poseen factibilidad desde el punto de vista económico, de calidad de los propágulos producidos y de satisfacción de la demanda de esta planta (Autade *et al.*, 2014; Oviedo-Pereira *et al.*, 2015). No obstante, es importante establecer la adecuada agrotecnia del cultivo y evaluar los rendimientos de biomasa bajo las condiciones naturales de calidad de los propágulos producidos (Pal *et al.*, 2013; Angelini y Tavarini, 2015).

En Cuba el cultivo de *Stevia rebaudiana* es reciente y existe muy poca información sobre el manejo agrotécnico necesario en las condiciones edafoclimáticas del país para la producción de hoja seca a escala industrial.

Por ello, se hacen necesarios los estudios relacionados con el cultivo de la planta a nivel de cantero y campo en especial de las variables agrotécnicas de mayor impacto en el rendimiento.

Por consiguiente, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la frecuencia de poda en la producción de biomasa y contenido de estevioglicósidos de *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Morita II en las condiciones edafoclimáticas en cantero, en la provincia de Ciego de Ávila.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se desarrolló en el área de Adaptación del Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila Máximo Gómez Báez.

### *Material vegetal*

Como material vegetal se utilizaron esquejes (brotes con una longitud de aproximadamente 8-10 cm), procedentes de plantas madre de *S. rebaudiana* de origen *in vitro* con 120 días de cultivo, las cuales fueron previamente cultivadas en bolsas de polietileno de 1.2 litros de capacidad, que contenían como sustrato una mezcla de suelo rojo y humus de lombriz (1:1 v/v) (Figura 1).

Efecto de la frecuencia de poda en la producción de biomasa vegetal

El experimento se realizó en el mes de octubre de 2018. Para esto se utilizó un cantero de 1.0 x 25.0 x 0.6 m (ancho x largo x profundidad) con suelo Ferralítico Rojo Compactado (Hernández *et al.*, 1999), enriquecido con cachaza en dosis estimada de 20 ton ha<sup>-1</sup>. El suelo fue mullido manualmente y cubierto en su superficie con polietileno negro para asegurar el control de las plantas indeseables.



Figura 1. Plantas madre de *Stevia rebaudiana* procedentes del cultivo *in vitro*, utilizadas para la obtención de esquejes.



Figura 2. Preparación de cantero para la siembra y distancia de plantación utilizadas en esquema tres bolillo.

Previo a la plantación, los esquejes se pusieron en contacto por la base con polvo enraizador compuesto por Ácido Naftalen Acético (ANA) más Ácido Indol Butírico (AIB) ( $2000 \text{ mg kg}^{-1}$  c/u) de manera individual e inmediatamente se enterraron en el sustrato a una profundidad de 1-2 cm aproximadamente.

Los esquejes se plantaron en el cantero a doble hilera, en disposición tres bolillo a una distancia de 30 x 35 cm para un total de 165 plantas por cantero y una densidad estimada de  $95\,238 \text{ plantas ha}^{-1}$  (Figura 2). El riego se realizó cada tres días por aspersión por un tiempo de 2-3 horas (Reis *et al.*, 2016).

Se seleccionaron al azar 40 plantas por tratamiento. Se identificaron los tratamientos

que consistieron en diferentes frecuencias de poda:

1. Plantas no podadas (Control)
2. Plantas podadas cada 30 días.
3. Plantas podadas cada 60 días.
4. Plantas podadas cada 90 días.

Las evaluaciones se realizaron durante un ciclo de cultivo de 180 días. Con la frecuencia de poda cada 30 días se realizaron seis podas, tres podas para el tratamiento cada 60 días y dos para cada 90 días. Las plantas no podadas se usaron como control. Se evaluaron un total de 160 plantas, 40 plantas para cada tratamiento ( $n=40$ ). Para las podas se cortaron las plantas (ramas y tallos) a una distancia de 10 cm del suelo (Figura 3).



Figura 3. Plantas de *Stevia rebaudiana* propagadas en cantero listas para la poda.

Las evaluaciones se realizaron en cada poda y se describen a continuación:

*Altura de la planta:* se midió la altura de la planta a partir de los 30 días del corte del ápice para la formación de brotes laterales. Se utilizó una cinta métrica y el resultado se expresó en centímetros (cm).

*Número de ramas:* se cuantificó el número de ramas por planta.

*Porcentaje de floración:* se observó la presencia o no de flores por planta por tratamiento para el cálculo del porcentaje de plantas con flores durante un año con frecuencia mensual.

*Número de hojas:* se cuantificó el número de hojas por rama por planta.

*Masa fresca de las hojas y los tallos por planta:* las hojas se separaron de las ramas de la planta. Se determinó la masa de las hojas y de los tallos en balanza SARTORIUS TE 412. Se expresó en gramos (g) por planta.

*Masa seca de las hojas y los tallos por planta:* el total de las hojas de cada planta y los tallos se secaron en estufa (HS 62A) a 70°C durante 72 h. Se determinó la masa en balanza SARTORIUS TE 412 y se expresó en gramos (g) por planta.

*Rendimiento de masa seca por hectárea:* se estimó a partir de la variable masa seca de las hojas por planta y la cantidad de plantas por hectárea. Se expresó en toneladas por hectárea ( $t\ ha^{-1}$ ).

Efecto sobre el contenido de esteviolglucósidos

*Extracción y cuantificación de extractos ricos en esteviolglucósidos*

Se cuantificó el contenido de esteviolglucósidos en hojas secas de *S. rebaudiana* recolectadas en cada poda y tratamiento. Las hojas se secaron en la estufa (HS 62A) a 70°C durante 72 h y trituraron en un molino (modelo Mikro-Feinmuhle-Culatti, MFC). Se realizó un extracto acuoso clarificado para cada tratamiento. Se calentaron 10 ml de agua destilada hasta 100 °C y se le añadió 1 g del polvo de hojas secas, con un tamaño de partículas de 0.7  $\mu m$  y se mantuvieron las proporciones masa/volumen: 1:10 (m/v).

La extracción se realizó durante 3 h en estático. Luego se centrifugó a 21 891 g durante 20 min (centrífuga modelo Heal Force). El precipitado se desechó y el sobrenadante se clarificó con carbón activado (2%) (Arguello-Valle, 2017), para eliminar pigmentos que pudieran interferir en la determinación de esteviolglucósidos. Se agitó por 20 min en agitador vortex (modelo IKA GENIUS3) y se centrifugó a 21 891 g durante 20 min. Esta operación se realizó tres veces. Se utilizaron tres réplicas por poda y tratamiento.

Posteriormente, a 210 nm se determinó la absorbancia de los extractos crudos acuosos clarificados. Las muestras se diluyeron 400 veces. Se realizaron tres determinaciones por cada réplica. Posteriormente estos valores de absorbancia se extrapolaron en una curva de calibración realizada a 210 nm para la mezcla

de patrones de esteviósido y rebaudiósido A. El resultado se expresó en mg esteviolglicósidos g<sup>-1</sup> MS.

#### Procesamiento estadístico

En el procesamiento de los datos se emplearon las pruebas estadísticas de Kolmogorov-Smirnov y la prueba de Levene para comprobar los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas, respectivamente. Al cumplirse estos supuestos, se aplicó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de efectos fijos y al encontrarse diferencias significativas se aplicó la prueba de comparaciones múltiples DHS de Tukey para  $p < 0.05$ . En todos los casos se utilizó como procesador estadístico el *Statistical Package for Social Sciences* versión 21.0.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la frecuencia de poda en la producción de biomasa vegetal

Las plantas de *S. rebaudiana* podadas presentaron tallos más robustos y un follaje más exuberante con un mayor número de ramas que las plantas control. Sin embargo, éstas últimas alcanzaron mayor altura y una ligera tendencia a inclinarse.

La altura de la planta de *S. rebaudiana* mostró diferencias significativas con respecto al control (Figura 4 A). La poda cada 90 días demostró que las plantas de *S. rebaudiana* bajo las condiciones y época de estudio alcanzan una altura de 47.0 cm, significativamente superior a los otros tratamientos. Sin embargo, las plantas no podadas o control alcanzaron mayor crecimiento, con 58 cm de altura. Las plantas podadas cada 30 y 60 días no mostraron diferencias significativas. La frecuencia de poda realizada a las plantas cada 30 y 60 días después de plantadas, constituyó un factor limitante para esta variable agronómica.

Respecto al número de ramas por planta, de *S. rebaudiana* (Figura 4 B) se observó el mayor resultado con la poda cada 60 días (33.8 ramas/planta). Este valor alcanzado fue significativamente superior al resto de los tratamientos. Sin embargo, el tratamiento de poda cada 30 días y el tratamiento control no presentaron diferencias significativas.

Con las podas realizadas cada 60 días (tres podas en total) se pudieron apreciar los mayores valores, con 4000 hojas por planta (Figura 4 C). Cifra significativamente superior al resto de los tratamientos evaluados y al control. Considerando que el esteviósido, se extrae de las hojas de las plantas de *Stevia* (Montoro *et al.*, 2013; Ahmad *et al.*, 2016; Hinojosa *et al.*, 2017), esta variable puede ser relevante. Además, en las evaluaciones del crecimiento y desarrollo de las plantas, una de las variables más importantes es el número de hojas y el área foliar, ya que se encuentran muy relacionados con la eficiencia fotosintética de los cultivos. Sin embargo, las expresiones fenotípicas de las plantas pueden afectarse por factores ambientales como radiación solar, precipitaciones y temperaturas ya que inciden en los procesos de fotosíntesis, transpiración, alargamiento celular y crecimiento. También influyen la densidad de plantas, así como, la variación de la época de siembra (Angelini y Tavarini, 2015).

En correspondencia con el resultado anterior, la poda cada 60 días fue la más efectiva con valores de 164.73 g de masa fresca por planta (Figura 4 D). La poda realizada cada 30 días no fue positiva para variable agronómica de masa fresca de las hojas por planta, y alcanzó los menores valores con 113.27 g, sin diferencia significativa con el control.

Similares resultados a los anteriores se lograron en la variable masa fresca de los tallos por planta (Figura 4 E). La frecuencia de poda cada 60 días generó los mejores resultados (161.31 g por planta). Del mismo modo, no se evidenciaron diferencias significativas cuando se compararon los resultados del control con la frecuencia de poda cada 30 días.

La masa seca de las hojas es una variable dependiente del número de hojas por planta, de la masa fresca y de la hidratación de las plantas (Kumar *et al.*, 2016). Las respuestas de los resultados de esta variable fueron similares a las mencionadas (Figura 4 F). Los mayores valores se obtuvieron con la frecuencia de poda cada 60 días con valores de 12.5 g por planta, seguida por la frecuencia de poda cada 90 días con valores de 10.20 g por planta y sin diferencias significativas la frecuencia de poda cada 30 días y el control, con los menores valores.

En cuanto a la masa seca de los tallos por planta de *S. rebaudiana* en condiciones de cantero (Figura 4 G) se pueden apreciar valores significativamente superiores con la frecuencia de poda cada 60 días con 16.57 g por planta. Esta variable es dependiente del número de tallos por planta y de la masa fresca de los tallos (Suárez y Quintero, 2015).

La frecuencia de poda cada 60 días, resultó superior al resto de los tratamientos. Lo cual no se correspondió con los resultados informados por Hossain *et al.* (2017) los cuales plantean el momento de poda cada 90 días. Sin embargo, Almaguer *et al.* (2018) señalaron que la poda debe estar entre 40-60 días.

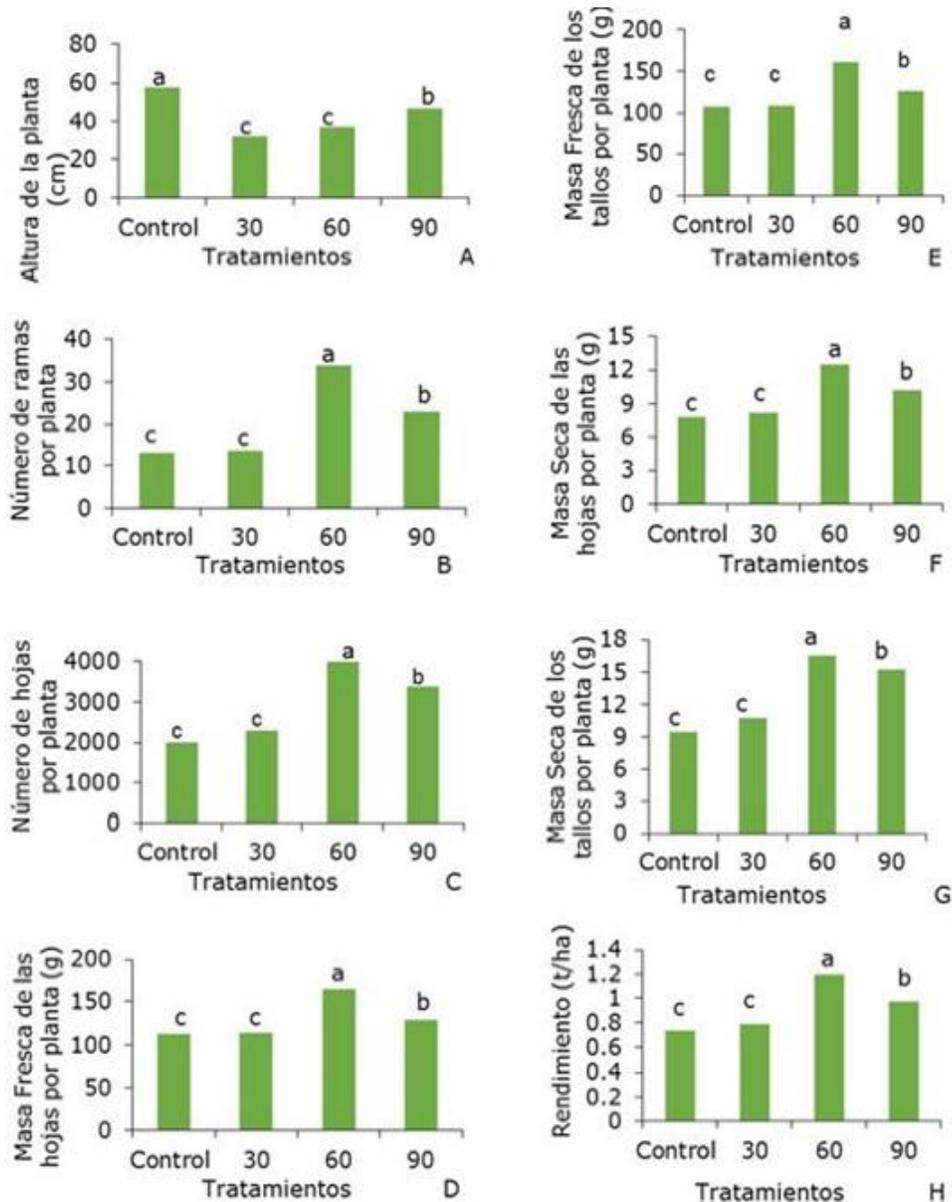


Figura 4. Efecto de la frecuencia de poda en la producción de biomasa vegetal de *Stevia rebaudiana* var. Morita II en condiciones de cantero. A) Altura de la planta. B) Número de ramas por planta. C) Número de hojas por planta. D) Masa fresca de las hojas por planta. E) Masa seca de las hojas por planta. F) Masa fresca de los tallos por planta. G) Masa seca de los tallos por planta. H) Rendimiento de hojas secas por hectárea. Barras con letras diferentes indican diferencias significativas según pruebas de ANOVA y Tukey DHS para  $p \leq 0.05$  y  $n = 40$

Según los cálculos establecidos a partir de la densidad de plantas por hectárea (ha) y la masa seca de hojas cosechadas por planta en cada uno de los tratamientos se pudo calcular el rendimiento de masa seca por hectárea (Figura 4 H). El rendimiento más alto se alcanzó con el tratamiento de poda cada 60 días con valores de  $1.19 \text{ t ha}^{-1}$ , seguido del tratamiento de poda cada 90 días con valores de  $0.97 \text{ t ha}^{-1}$ . De manera general, los rendimientos que se alcanzaron se aproximaron a los señalados por Moraes *et al.* (2013) quienes, en la Universidad de Misisipi, EEUU, alcanzaron rendimientos de hoja seca en una primera cosecha con intervalo de 60 y 90 días con un valor de  $1104.04 \text{ kg ha}^{-1}$  y  $1444.54 \text{ kg ha}^{-1}$ , respectivamente.

La floración en las plantas control se comenzó a observar a partir del mes de noviembre de 2018 hasta el mes de febrero de 2019. En los tratamientos se observó una disminución del número de meses en los cuales las plantas florecieron (Tabla 1). Sin embargo, el mayor porcentaje de floración se alcanzó cuando las plantas se podaron cada 90 días. El resultado puede estar relacionado con el tiempo que tuvieron las plantas para su recuperación, es decir, para su crecimiento y desarrollo. No obstante, la floración solo se observó en los meses de noviembre a febrero en los que los días son más cortos, las noches son más largas y las temperaturas son más frías. La floración es independiente de la frecuencia de poda, siendo más dependiente del fotoperiodo, de la época del año y de las bajas temperaturas (Shahid-Akba *et al.*, 2014). Cuando la planta presenta mayor

incidencia de floración el desarrollo vegetativo es menor porque va energéticamente hacia la floración y no al desarrollo de la biomasa (Singh *et al.*, 2014).

#### Efecto sobre el contenido de esteviolglucósidos

Los mejores resultados en cuanto al contenido de esteviolglucósidos se obtuvieron en el tratamiento de plantas podadas cada 60 días ( $255.39 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ ), con diferencias significativas respecto a la frecuencia de poda cada 30 y 90 días y al tratamiento control sin podar (Tabla 2, Figura 5). Estos resultados se correspondieron con los alcanzados en las variables masa fresca y seca de las hojas. Los esteviolglucósidos, en esta planta se encuentran concentrados en las hojas. En este sentido, Jiménez *et al.* (2010) evaluaron el contenido de esteviósido y rebaudiósido A en una población de *S. rebaudiana* cultivada comercialmente y refirieron valores promedios de  $91.14 \text{ mg}$  de esteviósido por gramo de masa seca y entre  $31.10$  a  $90.02 \text{ mg}$  de rebaudiósido por gramo de masa seca. Bayraktar *et al.* (2016) han referido que la cantidad de esteviolglucósidos por planta en campo es de  $23.06 \text{ mg}$  por gramo de masa seca. Atendiendo a lo anterior los resultados de este trabajo podrían considerarse elevados. No obstante, *S. rebaudiana* presenta una alta variabilidad en el contenido de esteviósido y rebaudiósido A debido a que este es un carácter poligénico (Jiménez *et al.*, 2010). Estos efectos de variabilidad pueden ser mitigados cuando se propaga asexualmente (esquejes, micropropagación).

Tabla 1. Efecto de la frecuencia de poda sobre el porcentaje de floración de *Stevia rebaudiana* var. Morita II en condiciones de cantero. Las columnas de los meses noviembre, diciembre, enero, febrero, marzo y abril se corresponden con la evaluación de los indicadores morfológicos (n= 40).

Trat.	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct
Control	20	70	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0
30	30	40	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60		70		10		0		0		0		0
90			90			0			0			0

Tabla 2. Efecto de la frecuencia de poda en el contenido de estevioglicósidos en extractos acuosos clarificados de *Stevia rebaudiana* var. Morita II en condiciones de cantero.

Tratamientos	Estevioglicósidos (mg g <sup>-1</sup> MS)
Control	150.45 c
30	146.95 c
60	255.39 a
90	190.63 b
X	185.86
ET	0.65

Medias con letras diferentes indican diferencias significativas según ANOVA y prueba de Tukey DHS para  $p \leq 0.05$  y  $n = 40$ . MS masa seca



Figura 5. Plantas de *Stevia rebaudiana* sembradas en el cantero y podadas cada 60 días.

Los resultados revelaron que la mejor frecuencia de poda de las plantas de *S. rebaudiana* fue cada 60 días. Los resultados de las variables agronómicas evaluadas fueron superiores a los obtenidos con las podas cada 30 y 90 días, con excepción de las variables altura de la planta y porcentaje de floración.

En Cuba, la planta de *S. rebaudiana* es poco conocida y poco usada como edulcorante natural. Sin embargo, las condiciones ambientales son propicias para su producción. Se ha informado de su cultivo en la Estación Experimental de Plantas Medicinales de San Antonio de los Baños, provincia Mayabeque (Rodríguez *et al.*, 2007).

## CONCLUSIONES

La frecuencia de poda influye en la producción de biomasa y en los principales componentes del rendimiento de biomasa, así como en el contenido de estevioglicósidos en extractos acuosos clarificados de *S. rebaudiana* var. Morita II cultivada en condiciones de cantero.

## Conflicto de interés

Los autores no declaran conflictos de intereses.

## REFERENCIAS

Ahmad N, Abdur R, Nisar A (2016) Light-induced biochemical variations in secondary

- metabolite production and antioxidant activity in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *J Photochem Photobiol B* 15(4): 51–56
- Almaguer Y, Terry E, González D (2018) Respuesta de *Stevia rebaudiana* Bertoni a la aplicación del producto bioactivo Pectimorf. *Cultivos Tropicales* 39(4): 71-77
- Angelini LG, Tavarini S (2015) Crop productivity, steviol glycoside yield, nutrient concentration and uptake of *Stevia rebaudiana* Bert. under Mediterranean field conditions. *Commun Soil Sci Plant Anal* 45(3): 2577–2592
- Arguello-Valle F (2017) Optimización del blanqueamiento de un extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* B. con carbón activado y Celite 545. Escuela Agrícola panamericana, Zamorano Honduras
- Autade R, Fargade S, Borhade P, Udmale S, Choudhary R (2014) *In vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Cell and Tissue Research* 14(3): 4659-4664
- Bayraktar M, Naziri E, Akgun IH, Karabey F, Ilhan E, Akyol B, Bedir E, Gurel A (2016) Elicitor induced stevioside production, *in vitro* shoot growth, and biomass accumulation in micropropagated *Stevia rebaudiana*. *Can J Plant Sci* 127(2): 289-300
- Hernández JA, Ascanio GM, Morales MD (1999) Nueva versión de clasificación genética de los suelos. MINAG, Cuba
- Hinojosa JJ, Tun A, Canul A, Ruiz C, Rocha JA, Betancur D (2017) Extracción de glucósidos edulcorantes de *Stevia rebaudiana* Bertoni por métodos de fluidos supercríticos. *Journal of Negative and No Positive Results* 2(5): 202-209
- Hossain MF, Islam MT, Islam MA, Akhtar S (2017) Cultivation and uses of *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Afr J Food Agric Nutr Dev* 17(4): 12745-12757
- Jiménez T, Cabrera G, Álvarez E, Gómez F (2010) Evaluación del contenido de esteviósido y rebaudiósido A en una población de *Stevia rebaudiana* Bertoni (kaâ heê) cultivada comercialmente. *Mem Inst Investig Cienc Salud* 8(1): 47-53
- Khalil SA, Zamir R, Ahmad N (2014) Selection of suitable propagation method for consistent plantlets production in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Saudi J Biol Sci* 21(6): 566-573
- Kilam D, Saifi M, Abdin MZ, Agnihotri A, Varma A (2015) Combined effects of *Piriformospora indica* and *Azotobacter chroococcum* enhance plant growth, antioxidant potential and steviol glycoside content in *Stevia rebaudiana*. *Can J Plant Sci* 66(3): 149-156
- Kumar R, Sharma S, Sood P, Dubey YP (2016) Bioorganic nutrient source effect on growth, biomass and quality of natural sweetener plant *stevia* and soil fertility in the Western Himalayas. *Commun Soil Sci Plant Anal* 46(2): 1170–1186
- Landázuri PA, Tigrero JO (2009) *Stevia rebaudiana* Bertoni, una planta medicinal. Cap 1 Generalidades. En: Landázuri PA, Tigrero JO (Eds). *Bol Téc Edición Especial*, pp. 1-34. Escuela Politécnica del Ejército (ESPE), Sangolquí–Ecuador
- Montoro P, Molfetta I, Maldini M, Ceccarini L, Piacente S, Pizza C, Macchia M (2013) Determination of six steviol glycosides of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) from different geographical origin by LC-ESI-MS/MS. *Food Chem* 14(1): 745-753
- Moraes RM, Donega MA, Cantrell CL, Mello SC, McChesney JD (2013) Effect of harvest timing on leaf production and yield of diterpene glycosides in *Stevia rebaudiana* Bert: A specialty perennial crop for Mississippi. *Ind Crop Prod* 51(1): 385-389
- Oviedo-Pereira D, Alvarenga S, Evangelista S, Sepúlveda G, Rodríguez-Monroy M (2015) Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un Cultivo Promisorio para México. *Biotecnología* 19(2): 14-27
- Pal P, Prasad R, Pathania V (2013) Effect of decapitation and nutrient applications on shoot branching, yield, and accumulation of secondary metabolites in leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *BMC Plant Biol* 17(1): 1526–1535
- Reis M, Coelho L, Santos G, Kienle U, Beltrão J (2016) Yield response of *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni) to the salinity of irrigation water. *Agric Water Manag* 15(2): 217–221

- Ritu M, Nandini J (2016) Nutritional composition of *Stevia rebaudiana*, a sweet herb, and its hypoglycaemic and hypolipidaemic effect on patients with non insulin dependent diabetes mellitus. J Sci Food Agri 96(12): 4231-4234
- Rodríguez GH, Acosta LL, Hechevarría SI, Rivera AM, Rodríguez FC, Sanchez GE, Milanés FM (2007) Comportamiento del cultivo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) en Cuba. Revista Cubana de Plantas Medicinales 12(4): 1-5
- Ruiz J, Moguel Y, Segura M (2017) Biological activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni and their relationship to health. Crit Rev Food Sci 57(12): 2680-2690
- 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
- Shahverdi MA, Omidi H, Tabatabaei SJ (2017) Effect of nutri-priming on germination indices and physiological characteristics of *Stevia* seedling under salinity stress. Journal of Seed Science 39(4): 353-362
- 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/s12355-013-0292-2
- Suárez I, Quintero I (2015) Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un endulzante natural a través de explantes con meristemas pre-existentes. Rev Colombiana Biotecnología 3(1): 29-33

Recibido: 20-05-2019

Aceptado: 03-07-2019

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.