

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO  
NARRO**

**UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS**



**Germinación de semillas de Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), con  
aplicación de Ácido Giberélico en diferentes concentraciones.**

**POR**

**DAVID MARROQUÍN HERNÁNDEZ**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO  
DE:**

**INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA**

**TORREÓN, COAHUILA**

**DICIEMBRE, 2017**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA  
DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

Germinación de semillas de Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) con aplicación  
de Ácido Giberélico en diferentes concentraciones

POR:  
DAVID MARROQUÍN HERNÁNDEZ

TÉISIS

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR,  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA

APROBADA POR:

PRESIDENTE

DR. ESTEBAN FAVELA CHAVEZ

VOCAL

Ph.D. PEDRO CANO RIGGS

VOCAL

ING. JUAN DE DIOS RUÍZ DE LA ROSA

VOCAL

M.Sc. EMILIO DUARTE AYALA

M.E. VÍCTOR MARTÍNEZ CUETO

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

TORREÓN, COAHUILA

DICIEMBRE 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA  
DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

Germinación de semillas de Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) con aplicación  
de Ácido Giberelico en diferentes concentraciones

POR:  
DAVID MARROQUÍN HERNÁNDEZ

TÉSIS

QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL COMITÉ DE ASESORÍA, COMO  
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA

APROBADA POR:

ASESOR PRINCIPAL

DR. ESTEBAN FAVELA CHÁVEZ

ASESOR

DR. PEDRO CANO RÍOS

ASESOR

DR. LUCIO LEOS ESCOBEDO

ASESOR

ING. JUAN DE DIOS RUÍZ DE LA ROSA

M.E. VÍCTOR MARTÍNEZ CUETO

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

TORREÓN, COAHUILA

DICIEMBRE 2017



## **AGRADECIMIENTOS**

**A Dios** por haberme dado y conservado con vida, por estar conmigo en todo momento, ser mi compañero y amigo fiel, por fortalecerme en cada caída e iluminarme en cada triunfo, por brindarme lo mejor y darme la dicha de conocer aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

**A Mi Alma Mater.** La Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, por ser mi segunda casa y en ella poder culminar mi Carrera Profesional.

**Al Dr. Esteban Favela Chávez,** por su grandiosa amistad incondicional, por dirigir y asesorar el proyecto de tesis dedicando parte de su tiempo.

**AL Dr. Lucio Leos Escobedo,** por haber aceptado ser mi asesor para la elaboración de este trabajo de investigación, por su valiosa aportación y disposición que siempre mostró, por su comprensión y sugerencias en cada una de las revisiones y, sobre todo por su apoyo incondicional.

**AL Ph D. Pedro Cano Ríos,** por su aportación de información y disposición de tiempo en el desarrollo para este trabajo.

**Al M.Sc. Emilio Duarte Ayala,** por haber aceptado estar de Jurado Examinador en la presentación del proyecto.

**Al Departamento de Horticultura,** por el apoyo brindado durante toda mi formación académica y profesional.

**A los profesores,** a todos aquellos que me impartieron clases y compartieron sus conocimientos y experiencias para mi formación personal y profesional.

**A la generación 2013 – 2017 de Horticultura,** por todo el compañerismo y amistad mostrada en todo momento.

**A mis compañeros y amigos,** Jaqueline, Niño, Alex fly, Yair, Lucia, Rudy, Aveduth, por compartir parte de su tiempo y amistad en cada momento.

Gracias.

## DEDICATORIAS

Este trabajo va dedicado con mucho cariño y respeto a todas las personas que de alguno u otra forma han contribuido tanto en mi formación personal como profesional.

**A mi madre.** Dedico este trabajo con especial respeto y amor a Adomi Carmen Marroquín Hernández, que en paz descansa, por darme el regalo tan hermoso de existir, por su infinito amor y confianza que en mi depósito, por su inagotable lucha y esfuerzo que realizó, por ser el motivo de mi superación personal y lograr cada una de mis metas. Que Dios me la cuide y la tenga en su Santa Gloria.

**A mis Abuelos,** Profeta Hernández Ramírez y Wilfrido Jairo Marroquín Pérez, por cuidar de mí desde niño, por darme el amor de padre y madre, brindarme todo el apoyo incondicional durante toda mi vida, por sus sabios consejos que me motivaron a salir adelante y lograr cada una de mis metas. Que Dios padre me los cuide y bendiga siempre.

**A mis tíos,** Alba, Lety, Bety, Meli, Elva, Juan, Esaú, Pablito, Geyler, Hugo y Enrique, dedico a cada uno de ustedes este logro como muestra de mi gran cariño y respeto que les tengo, por tomarme en cuenta como hermano carnal, permitirme crecer a su lado. Por todo el apoyo tanto económico como moralmente, por brindarme cada uno de los momentos de alegría, tristezas, además demostrarme unidad y humildad. Dios me los bendiga.

**A Yareli Gonzáles,** por el gran amor, apoyo incondicional, paciencia en cada momento y por compartirme parte de su vida.

**A la familia Gonzáles,** por abrirme las puertas de su hogar y por el apoyo incondicional que me brindaron en todo momento.

## RESUMEN

Los productos dulces han sido consumidos por el hombre desde el inicio de su historia y el azúcar, ha sido el edulcorante de mayor consumo. En los últimos años

la biotecnología ha introducido en el mercado mundial los edulcorantes artificiales, bajos en calorías a base de componentes químicos los cuales surgieron para satisfacer las necesidades de personas con limitaciones respecto al consumo de azúcar y calorías en su dieta. El presente trabajo de investigación, se realizó en el Laboratorio de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, ubicada en la Ciudad de Torreón, Coahuila con el fin de lograr un mayor porcentaje de germinación de semillas de Stevia, utilizando concentraciones de Ácido Giberelico (AG<sub>3</sub>). La metodología para hacer germinar la semilla de Stevia fue la establecida por Baskin y Baskin (2001), quienes mencionan que utilizando cajas Petri, se debe de colocar en el fondo una doble capa de papel filtro (papel secante) y agua destilada, después se aplican las concentraciones de Ácido Giberelico como medio de germinación. Las semillas fueron colocadas en hileras de 50 unidades por caja Petri haciendo revisiones de forma diaria. La etapa experimental tuvo una duración de 25 días y se utilizaron cuatro concentraciones de Ácido Giberelico (0, 200, 400 y 600 ppm) las que fueron los tratamientos de estudio con nueve repeticiones, generándose 1800 unidades experimentales esto bajo un diseño experimental completamente al azar. Las variables evaluadas fueron: Numero de semillas germinadas, Porcentaje de germinación de la semilla, Longitud de Plúmula y Longitud de Radícula. Cada tratamiento fue conformado por 450 semillas de Stevia y 50 semillas por repetición. En los resultados encontrados se obtuvo que para las variables número de semillas germinadas, porcentaje de germinación de la semilla, longitud de plúmula y longitud de radícula, se encontró significancia estadística al 0.05. Sin embargo el tratamiento 4 (600 ppm de AG<sub>3</sub>) presentó 12.22 semillas germinadas. En el porcentaje de germinación el tratamiento 4 (600 ppm de AG<sub>3</sub>) presentó un 24% de germinación y para longitud de Plúmula, se encontró que el tratamiento 2 (200ppm de AG<sub>3</sub>) presentó un valor de 4.55 cm, mientras que para la longitud de radícula el tratamiento 2 (200 ppm), con 2.33 cm. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la respuesta en la germinación de semillas de Stevia a cuatro concentraciones de Ácido Giberelico.

Palabras clave: Germinación, AG<sub>3</sub>, longitud de radícula, semillas de Stevia

## **INDICE DE CONTENIDO**

## Página

AGRADECIMIENTOS.....	ii
DEDICATORIA.....	ii
RESUMEN.....	iii
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	iv
INDICE DE FIGURAS.....	viii
INDICE DE ANEXOS.....	ix
I. INTRODUCCION.....	1
1.1. OBJETIVOS.....	3
1.2. HIPÓTESIS.....	3
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Antecedentes de la planta de <i>Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni)</i> .....	4
2.2. Origen y distribución.....	4
2.3. Taxonomía de la planta de <i>Stevia</i> .....	5
2.4. Importancia de la planta de <i>Stevia</i> .....	6
2.4.1. Importancia económica.....	6
2.4.2. Importancia en la alimentación.....	6
2.4.3. Importancia mundial de <i>Stevia</i> .....	7
2.5. Morfología.....	9
2.5.1. Raíz.....	9
2.5.2. Tallo.....	10
2.5.3. Hojas.....	10
2.5.4. Flores.....	10
2.5.5. Fruto y semilla.....	11
2.6. Concepto de semilla.....	11
2.6.1. Calidad de las semillas.....	12
2.6.2. Clasificación de las semillas.....	13
2.6.2.1. Semillas duras.....	13
2.6.2.2. Semillas latentes.....	13
2.6.2.3. Semillas muertas.....	13
2.6.3. Viabilidad de las semillas.....	13
2.6.4. Dormancia en la semilla.....	14
2.6.4.1. Dormancia primaria.....	14

2.6.4.2. Dormancia exógena.....	15
2.6.4.3. Dormancia endógena.....	15
2.6.4.4. Dormancia secundaria. ....	16
2.7. Germinación.....	17
2.7.1. Tipos de germinación. ....	18
2.7.1.1. Germinación epigea.....	18
2.7.1.2. Germinación hipogea.....	18
2.8. Latencia. ....	19
2.9. Factores que afectan la germinación.....	19
2.9. 1. Factores internos.....	19
2.9.1.1. Madures de las semillas .....	19
2.9.2. Factores externos.....	20
2.9.2.1. Agua.....	20
2.9.2.1.1. Fase I. ....	20
2.9.2.1.2. Fase II. ....	20
2.9.2.1.3. Fase III. ....	20
2.10. Contenidos de O <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub> .....	20
2.11. Temperatura.....	21
2.12. Luz.....	22
2.13. Polinización.....	23
2.14. Uso de la Stevia.....	25
2.15. Propagación de la planta de Stevia.....	27
2.15.1. <i>Propagación sexual</i> .....	27
2.15.2. Propagación asexual.....	29
2.15.3. Micro propagación.....	30
2.15.3.1. Micro propagación por yemas axilares. ....	31
2.16. Aspectos agronómicos.....	31
2.16.1. Ambiente.....	31
2.16.2. Variedades.....	32
2.17. Requerimientos del cultivo. ....	33
2.17.1. Condiciones del clima.....	33
2.17.2. Condiciones de suelo.....	34
2.17.3. Fertilización.....	35
2.17.4. Riegos .....	36



2.17.5. Malas hierbas.....	36
2.18. Plagas.....	37
2.19. Enfermedades.....	37
2.19.1. Septoriosis o mancha foliar ( <i>Septoria steviae</i> ).....	37
2.19.2. Alternariosis o mancha negra ( <i>Alternaria steviae</i> ).....	38
2.19.3. Oídio ( <i>Oidium sp.</i> ).....	38
2.19.4. Roya blanca ( <i>Albugo sp.</i> ).....	38
2.19.5. Seda blanca ( <i>Sclerotium roffsi</i> ).....	38
2.20. Cosecha.....	38
2.20.1. Cosecha de hojas de la planta de Stevia.....	38
2.20.2. Cosecha de semillas.....	39
2.21. Rendimiento de cultivo.....	39
2.22. Postcosecha de semilla de Stevia.....	40
2.23. Generalidades del ácido giberélico.....	41
2.21.1. Funciones del ácido giberélico.....	42
2.22.2. Inducción de la germinación en semillas.....	43
III. MATERIALES Y METODOS.....	44
3.1. Localización del área de estudio.....	44
3.2. Localización del sitio experimental.....	44
3.3. Clima de la región.....	44
3.4. Obtención del material de propagación.....	44
3.5. Cosecha del material de Propagación a utilizar.....	44
3.5.1. Color de las semillas de Stevia.....	44
3.5.2. Tamaño de la semilla de Stevia.....	44
3.5.3. Porcentaje de germinación.....	44
3.6. Preparación del ácido giberélico.....	45
3.7. Colocación de las semillas de Stevia en remojo con soluciones de ácido giberélico.....	45
3.8. Establecimiento de las semillas de Stevia en el Laboratorio.....	45
3.9. Diseño experimental.....	46
3.10. Tratamientos de estudio.....	46
3.11. Variables evaluadas.....	46
3.11.1. Número de semillas germinadas.....	46
3.11.2. Porcentaje de germinación.....	47

3.11.3. Longitud de radícula.....	47
3.11.4. Longitud de plúmula.....	47
3.12. Análisis estadístico.....	47
3.13. Otro software utilizado.....	47
IV. RESULTADOS.....	48
4.1. Número de semillas germinadas.....	48
4.2. Porcentaje de germinación.....	50
4.3. Longitud de plúmula.....	51
4.4. Longitud de radícula.....	53
V. CONCLUSIONES.....	55
VI. RECOMENDACIONES.....	56
VII. APENDICE.....	57
VIII. LITERATURA CITADA.....	60

## INDICE DE FIGURAS

	Página
<b>2.1. Rango de distribución de Stevia (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) (Sumida, 1973).....</b>	5
<b>2.2. Esquema de una planta Stevia rebaudiana Bertoni.....</b>	9
<b>2.3. Esquema de las tres fases de la imbibición de agua por una semilla, medida mediante el incremento en peso fresco durante el proceso de germinación (Santamarina et al., 1997).....</b>	21
<b>3.4. Germinación de una semilla de Stevia.....</b>	46
<b>4.1. Número de semillas germinadas de Stevia con cuatro concentraciones de ácido giberélico .....</b>	48
<b>4.2. Porcentaje de semillas germinadas de Stevia con cuatro concentraciones de ácido giberélico .....</b>	51
<b>4.3. Longitud de plúmula en semillas germinadas de Stevia con cuatro concentraciones de ácido giberélico.....</b>	52
<b>4.4. Longitud de radícula en semillas germinadas de Stevia con cuatro concentraciones de ácido giberélico.....</b>	53



## INDICE DE ANEXOS.

	Página
<b>1. Análisis de varianza para la variable Número de semillas germinadas de Stevia, germinadas con cuatro concentraciones de ácido giberélico.....</b>	58
<b>2. Análisis de varianza para la variable porcentaje de germinación en semillas germinadas de Stevia, germinadas con cuatro concentraciones de ácido giberélico.....</b>	58
<b>3. Análisis de varianza para la variable longitud de plúmula en semillas germinadas de Stevia, germinadas con cuatro concentraciones de ácido giberélico.....</b>	59
<b>4. Análisis de varianza para la variable longitud de radícula en semillas germinadas de Stevia, germinadas con cuatro concentraciones de ácido giberélico.....</b>	59

## I. INTRODUCCION

Los productos dulces han sido consumidos por el hombre desde el inicio de su historia y el azúcar ha sido el edulcorante de mayor consumo. En los últimos años la biotecnología ha introducido en el mercado mundial los edulcorantes artificiales bajos en calorías a base de componentes químicos, los cuales surgieron para satisfacer las necesidades de personas con limitaciones respecto al consumo de azúcar y calorías en su dieta.

El consumo de bebidas azucaradas puede ser una de las causas dietarias de trastornos metabólicos como la obesidad. El sustituir el azúcar por edulcorantes bajos en calorías puede ser una estrategia eficaz de control de peso (Antón SD, *et al.*, 2010).

La industria de los edulcorantes, naturales y artificiales mueve cientos de millones de dólares ya sea como aditivos en alimentos o como suplementos dietéticos, en este orden, la especie *Stevia*, como familiarmente la llamamos (*Stevia rebaudiana* Bertoni), constituye una prometedora alternativa, en el rango de edulcorantes naturales, más aun cuando los endulzantes sintéticos están seriamente cuestionados por los efectos de su consumo a corto y largo plazo (Marín, 2004).

*Stevia rebaudiana* Bertoni produce una serie de glucósidos diterpenoides o steviósidos, los cuales tienen un poder endulzante considerablemente mayor que la glucosa. Dichos compuestos no son tóxicos, ni mutagénicos y son bajos en calorías (Soejarto y Kinghorn, 1982; Matsui, *et al.*, 1996).

En su forma natural es 10 a 15 veces más dulce que el azúcar común de mesa, mientras que los extractos de *Stevia* tienen un potencial endulzante de 100 a 300 veces mayor que la del azúcar. El extracto en su forma líquida tiene un poder endulzante aproximadamente 70 veces mayor que la sacarosa, mientras que los extractos refinados de *Stevia*, llamados esteviósidos son 200 a 300 veces más dulce que la sacarosa (Brandle, 2005).

El interés se ha reavivado en años más recientes, especialmente en el mundo desarrollado donde los consumidores conscientes de la dieta buscan un edulcorante natural de bajas calorías como una alternativa a los edulcorantes químicos. Los productos de la *Stevia* se utilizan comercialmente extensamente en Japón, usando las hojas secas de *Stevia* cultivadas localmente e importadas principalmente de China, donde representan alrededor del 40% de los edulcorantes sin sacarosa (Eafit, 2004).

En los EEUU, la Agencia de Alimentos y Drogas (FDA) aprobó en 2008, el uso de los glucósidos diterpenoides como edulcorantes naturales no calóricos en alimentos y bebidas (Jiménez, *et al.*, 2010), dando el cultivo una enorme expectativa, no solamente en lo que se refiere al mercado de los edulcorantes, sino también en la agricultura, ganadería, farmacéutica y cosmética.

En este documento se describe la metodología alternativa para cultivar Stevia en México bajo condiciones controladas, donde se espera que sirva como un indicador para que México pueda abrir el mercado nacional e internacional, fomentar la producción de hoja seca de esta planta en el país con base en investigación, enseñanza, asistencia técnica y extensión rural con sostenibilidad y de esta manera sea factible la implantación de la industria de Stevia, para la comercialización con vistas al beneficio económico, social, político y ambiental del país.

### 1.1. OBJETIVOS

- Evaluar el porcentaje de germinación de semillas de Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) bajo cuatro concentraciones de Ácido Giberelico (0, 200, 4000 y 600 ppm).
- Evaluar el número de semillas de Stevia germinadas aplicando ácido giberélico en condiciones controladas.

### 1.2. HIPÓTESIS

- La germinación en las semillas de Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) es incrementa aplicando Ácido Giberelico en diferentes concentraciones.
- Se logrará incrementar el porcentaje de germinación de semillas de Stevia con respecto a lo encontrado por diversos autores.



## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Antecedentes de la planta de Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni).

Desde hace varios siglos las hojas de Stevia han sido utilizadas como edulcorante para el mate o como té medicinal entre los indígenas del Paraguay, quienes la conocen como "Kaa hee" que significa hierba dulce (FAO/OMS, 2005).

En la época de la colonia en el siglo XVI, los españoles reportaron por primera vez el consumo de la Stevia, (por los nativos sudamericanos). Luego, a fines del siglo XVIII el botánico Moisés Bertoni, fue el primero en elaborar estudios y publicaciones sobre esta planta (FAO/OMS, 2005).

El cultivar *Stevia rebaudiana* apareció por primera vez en la literatura en 1905, acuñado por Moisés Santiago de Bertoni (Bertoni 1905). La cuenta de los acontecimientos que llevaron a la publicación de este nombre es dada por Bertoni en sus documentos de 1905 y 1918 (Bertoni 1905, 1918). *Stevia rebaudiana* (Bertoni) es una especie perenne de la familia de las Asteraceae, que generalmente crece hasta 1 m de altura (Mishra, *et al.*, 2010).

Posteriormente el químico paraguayo Ovidio Rebaudio aisló los principios activos de esta planta y fue así como se descubrió que los componentes endulzantes eran los glucósidos: esteviósido y rebaudiosido A. (FAO/OMS, 2005; Wallin, 2008).

### 2.2. Origen y distribución.

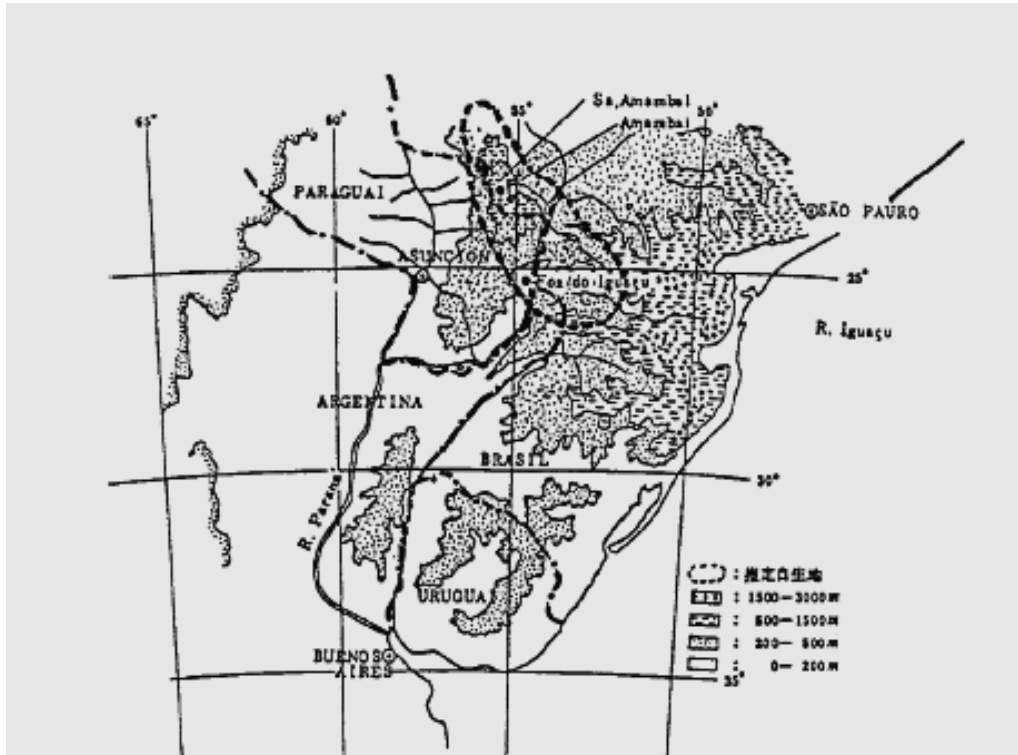
Es nativa de ciertas regiones de Sudamérica (Paraguay y Brasil). Se conoce comúnmente como "hierba dulce", "hoja dulce" y "hoja de miel" (Liu y Li, 1995; Chalapathi y Thimmegowda, 1997). La presencia nativa de *Stevia rebaudiana* se sitúa entre 22-24° S y 53-56° W en Paraguay y Brasil (Sumida, 1975)

Según Grashoff, (1974), se sabe que existen 81 especies en América al norte de la frontera Colombo-Panameña, de las cuales cerca de 70 se encuentran en México solamente. Los miembros del género comprenden hierbas (anuales y perennes) y arbustos encontrados principalmente a altitudes de 500-3000 m sobre el nivel del mar principal. Aunque por lo general crecen en terrenos montañosos semidesérticos, sus hábitats varían desde pastizales, bosques de matorrales, laderas boscosas de montaña, bosques de coníferas y vegetación subalpina. *S. rebaudiana* fue conocido por los europeos debido a su descubrimiento por Moisés Bertoni en 1888 y el químico Rebaudio fue el primero en estudiar sus características químicas (Felippe, 1977).

Entre los principales productores de Stevia a nivel mundial son Japón, China, Corea, Taiwán, Tailandia, Indonesia, Laos, Malasia y Filipinas; todos estos países representan el 95% de la producción mundial. Cabe destacar que Japón

es el país con mayor cantidad de fábricas procesadoras y extractoras de esteviósido (Schwebel, 2005).

En América es cultivada principalmente en Paraguay, Brasil, Argentina, Colombia, Perú y cultivos muy pequeños en Ecuador. Paraguay, en la actualidad es uno de los mayores productores de Stevia a nivel mundial; dedica aproximadamente 1,500 hectáreas a este cultivo, generando empleo directo a unas 10,000 personas en toda la cadena productiva (Andrés, 2011).



**Figura 2.1.** Rango de distribución de Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) Sumida, (1973).

### 2.3. Taxonomía de la planta de Stevia.

La planta es herbácea y perenne, con hojas simples, inflorescencia capitular y frutos denominados “aquenios” crece como arbusto salvaje en el suroeste de Brasil y Paraguay (Marín, 2004). Según Marín, (2004), la clasificación taxonómica para el cultivo de Stevia es la siguiente:

Reino	Angiosperma
Clase	Dicotiledónea
Grupo	Monoclamídea
Orden	Asterales
Familia	Asterácea
Subfamilia	Asteroidea
Tribu	Eupatorieae

Género	Stevia
Especie	rebaudiana

## **2.4. Importancia de la planta de Stevia.**

### **2.4.1. Importancia económica.**

El rápido desarrollo de la industria de los edulcorantes y la búsqueda de alternativas menos riesgosas que los edulcorantes artificiales; ha permitido que el cultivo de *S. rebaudiana* prospere en países como Brasil, China, Japón, Corea, Tailandia e Israel. China actualmente cultiva el 90 % de la producción global de esta planta.

En el mercado, la planta de Stevia se puede conseguir en diferentes presentaciones de productos, como una simple infusión de hojas secas o como líquido denso de color oscuro de característica líquido obtenido a través del macerado de las hojas en agua destilada o en una mezcla de licor alcohólico y agua. También se encuentra el steviosido en polvo, en líquido, en cristales solubles, pasando por extractos, lociones cosméticas y como aditivo en diversidad de alimentos, y cada una de estas tiene diferentes propiedades o aplicaciones en diferentes industrias (Marín, 2004).

### **2.4.2. Importancia en la alimentación.**

La hoja de Stevia en su estado natural, posee gran cantidad de nutrientes, que en orden de concentración son:

- 1.) Más del 50%: carbohidratos de fácil asimilación.
- 2.) Más del 10%: fibras, polipéptidos (proteínas vegetales).
- 3.) Más del 1%: lípidos, potasio.
- 4.) Entre el 0.3 y 1%: calcio, magnesio y fósforo.
- 5.) Menos del 0.01%: cromo, cobalto, hierro, manganeso, selenio, silicio, zinc.
- 6.) Indicios de ácido ascórbico, aluminio, beta caroteno C, estaño, riboflavina, vitamina B1.
- 7.) Varios aceites esenciales.

En cuanto a las aprobaciones necesarias para comercializar la Stevia, la FDA (Food and Drug Administration) 1995, anunció que la Stevia podría ser comercializada y consumirse como suplemento dietético y no como aditivo

alimenticio (endulzante). Así también, determinaron que la Stevia en su forma líquida podía ser vendida como producto para el cuidado de la piel (Gregersen, *et al.*, 2004).

Entre los glucósidos, se encuentra en mayor proporción el steviosido generalmente entre 5 a 10% del peso de la hoja y en menor medida, del orden de 2 a 3% rebaudiosido A, B, C, D, E, dulcósido A y B y esteviol biosido (Totté, *et al.*, 2000; Brandle, *et al.*, 2002; Geuns, 2003; Totté, *et al.*, 2003; Brandle, 2005).

Con respecto a la toxicidad de la Stevia, los investigadores Akashi y Yokoyama (1975) establecieron que la dosis de Stevia por vía oral que se requiere para la mortalidad a 50% de los sujetos (ratones), es de 15 g/kg de peso corporal, es decir, si se traslada esto a humanos, un adulto que pesa 60 kg debe consumir 900 g de steviósidos, lo que equivale a consumir aproximadamente 225 kg de azúcar de caña. Se puede deducir con amplia seguridad que difícilmente un humano va a consumir una cantidad similar para llegar a la toxicidad.

En los EEUU, la Agencia de Alimentos y Drogas (FDA) aprobó en 2008, el uso de los glucósidos diterpenoides como edulcorantes naturales no calóricos en alimentos y bebidas (Jiménez, *et al.*, 2010), dando el cultivo una enorme expectativa, no solamente en lo que se refiere al mercado de los edulcorantes, sino también en la agricultura, ganadería, farmacéutica y cosmética.

#### **2.4.3. Importancia mundial de Stevia.**

El consumo internacional de Stevia se concentra en la Unión Europea, EE.UU., China, Australia y específicamente Japón, este país cuenta con fábricas para la extracción de los steviósidos, es insuficiente para satisfacer su mercado interno donde se estima que el consumo anual de steviósidos es de 50 toneladas al año con un valor aproximado de \$240 millones de dólares americanos. Brasil por su parte, cuenta con la mayor cantidad de plantas para el tratamiento de hoja seca de Stevia para extracción del steviosido. Actualmente, se produce en mundo alrededor de 3000 toneladas de cristal de steviósidos los que son consumidos en su totalidad. Rusia y otros países Latinoamericanos han incorporado este nuevo edulcorante a su dieta (Eafit, 2004).

Entre los principales productores de Stevia a nivel mundial son Japón, China, Corea, Taiwán, Tailandia, Indonesia, Laos, Malasia y Filipinas; todos estos países representan el 95% de la producción mundial. Cabe destacar que Japón es el país con mayor cantidad de fábricas procesadoras y extractoras de esteviosido (Schwebel, 2005).

La mayoría de referencias coinciden en que el más grande productor de Stevia es China, con una superficie cultivada de aproximadamente 20,000 ha, comercializando el 50% de su producción en su mercado interno, 40% lo exporta a Japón y el 10% restante a Corea, Indonesia y Estados Unidos. Otros importantes productores de plantas y hojas secas de Stevia a nivel mundial son Israel, Tailandia, Paraguay y Brasil (Campusano, *et al.*, 2009).

Se estima que Japón es el país líder en Stevia industrializada con la mayor cantidad de fábricas procesadoras y extractoras seguida muy de cerca por Corea (Tigrero y Landázuri, 2009; Marín, 2004; Zubiarte, 2007).

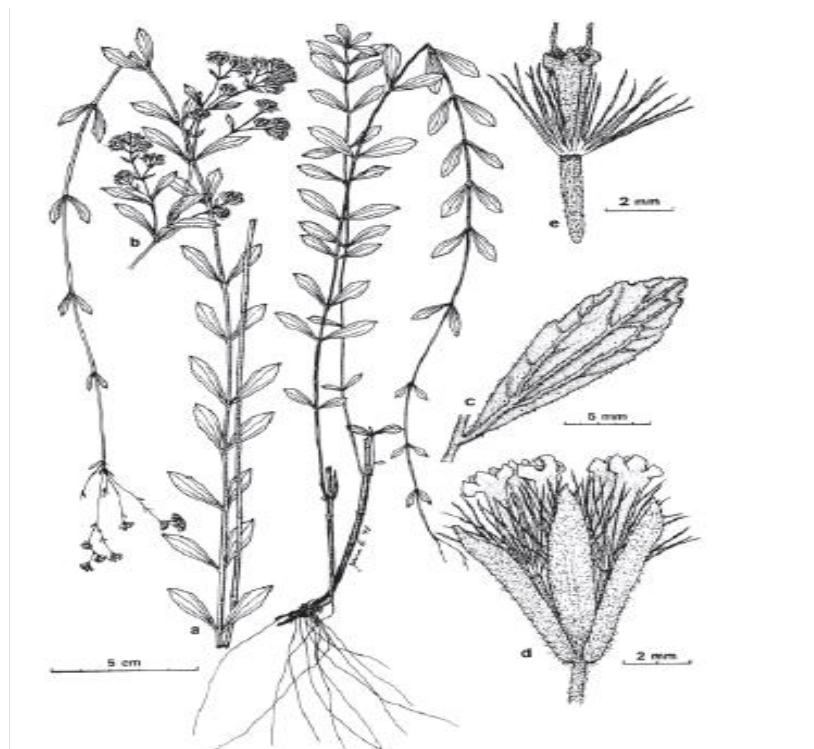
En América, el mayor productor de este cultivo es Paraguay con 1,500 hectáreas destinadas tanto para el consumo nacional como para la exportación, siendo Brasil el principal destino de las exportaciones (25%), seguido por Japón, Francia y Estados Unidos (Duarte, 2008).

La planta de Stevia había sido ignorada en gran parte del mundo hasta hace diez o quince años. Sin embargo, ahora existe un creciente interés por la planta de Stevia como una alternativa natural a los edulcorantes artificiales, ya que no sólo es un producto "natural" libre de calorías, sino que también tiene otras ventajas sobre los edulcorantes químicos usados actualmente, como la sacarina, el aspartame y el ciclamato. Como parte de este creciente interés, se han llevado a cabo varias revisiones en varios países, entre ellos: Brasil (Arkoll, 1988; Felipe, 1978), Japón (Sumida, 1980), Canadá (Brandle, *et al.*, 1998; Columbus, 1997), India (Chalpathi, *et al.*, 1997), Georgia (Gvasaliya, *et al.*, 1990), Alemania (Deininger, 1970), Rusia (Dzyuba, 1998), República Checa (Matejka, 1992), Corea (Kang, *et al.*, 1981), México (Fors, 1995), Suecia (Hallstrom, 1985), California (Shock, 1992). También se incluyó en una revisión de 1992 de posibles nuevos cultivos para Australia Occidental (Hoyle, 1992).

En los estudios de investigación de la *Stevia*, han incluido visitas a Paraguay para la recolección de semillas y material vegetal en su entorno natural y silvestre. (Bian, 1981; Grashoff, 1972; Shock, 1982; Soejarto et al, 1983; Suhendi, 1989; Tateo, et al, 1998).

## 2.5. Morfología.

El género *Stevia rebaudiana*, pertenece a la familia Asteráceae es una planta herbácea perenne, tallo erecto, subleñoso, pubescente; durante su desarrollo inicial no posee ramificaciones, tornándose multicaule después del primer ciclo vegetativo, llegando a producir hasta 20 tallos en tres a cuatro años; puede alcanzar hasta 90 cm de altura en su hábitat natural y en los trópicos puede llegar a tener alturas superiores a 100 cm (Jaramillo, 2009).



**Figura 2.2.** Esquema de una planta *Stevia rebaudiana* Bertoni.

### 2.5.1. Raíz

La raíz de esta planta es pivotante, filiforme, y no profundiza, distribuyéndose cerca de la superficie. La *Stevia rebaudiana* tiene hojas elípticas, ovales o lanceoladas, algo pubescentes; presentan disposición opuesta en sus estados juveniles, y alternas cuando las plantas llegan a su madurez fisiológica, previa a la floración (Bonilla et al., 2007).

Es fibrosa y perenne, formando una reserva abundante (Schmeling, 1967) que apenas se ramifica y no se profundiza, se distribuye a la superficie; Y es la única parte que no contiene esteviósido (Vargas, 1980).

Taiariol, (2004) ha informado que las raíces finas se congregan alrededor de la superficie del suelo y las raíces más gruesas en las zonas más profundas.

#### **2.5.2. Tallo.**

El tallo es quebradizo (Ching, 1999), subluxas, pubescentes con tendencia a reclinarsse (Sakaguchi y Kan, 1982).

#### **2.5.3. Hojas.**

Los primeros órganos fotosintéticos se forman después de la germinación de los dos cotiledones en la semilla. Son redondeados en forma. Stevia tiene un arreglo de hojas alternativas y hábito de crecimiento herbáceo con flores dispuestas en cabezas indeterminadas. Las hojas son pequeñas, lanceoladas, oblongas, serradas y dulces (Dwivedi, 1999).

#### **2.5.4. Flores.**

La flor es hermafrodita, pequeña y blanquecina; su corola es tubular, pentalobulada, en capítulos pequeños terminales o axilares, agrupados en panículas corimbosas (Shock, 1982).

Las flores son pequeñas y blancas (Dwivedi, 1999) con una garganta púrpura pálida. La planta es auto incompatible (protandria), por lo que la polinización es entomófila; se dice que es de tipo esporófitico y clasificada como apomíctica obligatoria (Monteiro, 1982).

Las cabezas de las flores están dispuestas sobre un conglomerado suelto en la punta de la rama o tallo (Goettemoeler y Ching, 1999).

Según Brandle, (2002), la floración en Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) es fotoperiodo-dependiente es mayor al reducirse la duración del día; sin embargo las respuestas de la floración y del contenido de steviósidos a la longitud del día parecen ser variables; algunos genotipos son de día corto en forma obligada, aunque a su vez, algunas líneas parecen ser insensibles al fotoperiodo.

### 2.5.5. Fruto y semilla

Lester, (1999), afirma que en la naturaleza, la reproducción se realiza principalmente a través de semillas, además indica que es necesaria una manipulación activa de las flores para lograr la polinización (Goettemoeller y Ching, 1999). En general, las semillas infértiles suelen ser pálidas o claras y las semillas fértiles son de color oscuro (Yadav, *et al.*, 2011).

Tiene dos tipos de semillas, semillas oscuras y de color canela. Las semillas de color oscuro son a menudo fértiles sin embargo, las semillas de bronceado suelen ser pálidas o claras. Oddone, (1997), considera que las semillas "claras" son infértiles.

Goylemoeller y Ching, (1999), hacen mención que la planta es auto incompatible y las semillas polinizadas y claras son infértiles. Monteiro, (1890) afirma que las semillas pueden ser claro (estéril) u oscuro (fértil) y es diseminado por el viento. Se clasifica como una planta de día corto, situando el fotoperiodo crítico de 12 a 13 horas según el ecótipo.

La recolección de la semilla es lenta y muy difícil, debido a que la floración no es uniforme, lo que afecta a la maduración de la semilla; además, el porcentaje de germinación es bajo entre el 10 y 38 % (Felippe, *et al.*, 1971 y Jordán, 1983).

Las semillas fértiles suelen ser de color oscuro, mientras que las semillas infértiles suelen ser pálidas (Felippe, 1978; Oddone, 1999). Las semillas son muy pequeñas de tal modo que 1,000 semillas pesan de 0.3 a 10g como resultado las plántulas se desarrollan lentamente, alcanzando un tamaño adecuado para su trasplante al campo entre los 45 - 60 días (Brandle, 1978; Colombus, 1997; Oddone, 1999). Las semillas generalmente se germinan en invernadero donde se ha probado una variedad de materiales de cama (Cameiro, 1997).

### 2.6. Concepto de semilla

Las semillas son estructuras complejas que consisten, en general, en: i) El embrión, que es el producto de la fusión entre el óvulo con el núcleo espermático. ii) El endospermo que provee de nutrientes al embrión para el desarrollo y el crecimiento de la plántula. iii) La testa de la semilla formada externamente por los integumentos que representan los tejidos maternos del óvulo (Finch-Savage y Leubner-Metzger 2006).



Bewley y Black, (1978), hacen mención que la semilla, es la manera de independencia de las siguientes generaciones de nuevas plantas, contienen la nueva planta en miniatura.

Ruiz, (1993), menciona que la semilla es el ovulo fecundado, transformado y maduro de las plantas fanerógamas, así mismo, es la parte de estos vegetales que tiene como función reproducir y perpetuar la especie. Sin embargo Camacho, (1994), indica que la semilla se describe de manera botánica, como un ovulo maduro que ha sido fecundado por la planta madre, que se ha madurado hasta generar una diferenciación y que tendrán la capacidad fisiológica para dar lugar a una nueva planta.

Moreno, (1996), reconoce a toda clase de granos, frutos, y estructuras que se utilizan en los terrenos agrícolas en México y en el mundo entero desde el punto de vista agronómico y comercial. Donde identifica al embrión como semilla verdadera en estado latente que a veces lo acompaña un tejido que lo nutre, y que además lo protege el epistemo.

#### **2.6.1. Calidad de las semillas.**

Molina, *et al.*, (1990), señalan que la calidad de una semilla para la siembra debe reunir ciertas características como mínimo, que son: pureza varietal, libres de semillas de malezas, libres de patógenos transmisibles por semilla, tener un mínimo de germinación y que varía de acuerdo a la especie.

Garay, *et al.*, (1992), afirman que la calidad de la semilla involucra cualidades básicas diferentes que están incluidas en cuatro componentes que son: físicos, fisiológicos, genéticos y sanitarios; por lo que concluye que el potencial productivo de la semilla estará en un máximo nivel, cuando en ella estén incluidos todos y cada uno de sus componentes mencionados anteriormente. A su vez, Moreno, (1996), indica que los términos como pureza física, pureza varietal, vigor, sanidad, poder germinativo y contenido de humedad, son características aceptadas para tener semillas de calidad.

## **2.6.2. Clasificación de las semillas.**

### **2.6.2.1. Semillas duras.**

Moreno, (1996), menciona que las semillas duras son aquellas que no han adsorbido agua como consecuencia de impermeabilidad de sus cubiertas, y por lo tanto permanecen duras después de la prueba de germinación como algunas de las familias Leguminosae y Malvaceae.

### **2.6.2.2. Semillas latentes.**

Hartmann y Kester, (1982), hacen referencia que las semillas viables que no germinan cuando las condiciones ambientales son favorables, se consideran latentes. Este estado de la semilla quizá se deba a causa físicas como cubierta dura, impermeable al agua, entre otros, también causas fisiológicas como los inhibidores químicos en el fruto, semilla, además de los embriones inmaduros.

Moreno, (1996), afirma que las semillas viables son diferentes a las semillas duras, aun cuando las condiciones sean favorables para ciertas especies, estas no germinan, y se les denomina semillas latentes. Para determinar la viabilidad de las semillas, existe la prueba de Tetrazolio, o bien, para acelerar la germinación puede ser por medio de la escarificación o aplicando sustancias promotoras para la germinación. Cuando se hacen pruebas de germinación, se debe registrar el porcentaje de las semillas latentes. Para Flores, (2004), la latencia es la capacidad que tiene las semillas para poder atrasar su germinación hasta que el tiempo y lugar sean favorables y lo representa como un mecanismo de sobrevivencia de las plantas.

### **2.6.2.3. Semillas muertas.**

Según Moreno, (1996), las semillas muertas son consideradas aquellas que no germinen, diferentes de las semillas latentes o duras. Además, el mismo autor (1976), dice que son las que presentan un aspecto descolorido y están blandas y frecuentemente están invadidas por mohos.

## **2.6.3. Viabilidad de las semillas**

Para los tecnólogos de semillas la viabilidad se refiere a la capacidad de la semilla para germinar y generar plántulas normales; mientras que desde la perspectiva fisiológica se refiere a si la semilla contiene o no cualquier tejido con actividad metabólica, y si posee reservas energéticas y enzimas para el funcionamiento de las células de la planta (Moreira, *et ál.*, 1992).

Mayer y Poljekff, (1982), afirman que la viabilidad de las semillas es retenida por considerables periodos de tiempo especialmente en semillas con cubierta dura e impermeables.

Por su parte, Salisbury, (1994), dice que la semilla pierde su viabilidad rápidamente cuando se almacena en aire húmedo y donde se tienen temperaturas de 35° C o aun así son más cálidas. Hay casos que la pérdida puede ser por algunos patógenos que la semilla presenta en su interior.

Santamarina, *et al.*, (1997), hacen mención que puede haber semillas que germinan, después de decenas o centenas de años; se da en semillas con una cubierta seminal dura como las leguminosas. El caso más extremo de retención de viabilidad es el de las semillas de *Nelumbo nucifera*, encontradas en Manchuria con una antigüedad de unos 250 a 400 años. En el extremo opuesto tenemos las que no sobreviven más que algunos días o meses, como es el caso de las semillas de Arce (*Acer*), sauces (*Salix*) y Chopos (*Populus*) que pierden su viabilidad en unas semanas; o los Olmos (*Ulmus*) que permanecen viables 6 meses. En general, la vida media de una semilla se sitúa entre 5 y 25 años.

En Japón, la viabilidad de las semillas es hasta 3 años si se almacena bajo condiciones de baja humedad y en la oscuridad (Kawatani, *et al.*, 1977). Esto contrasta con las afirmaciones de un almacenamiento óptimo a 0 grados que aún producen una pérdida de viabilidad del 50% después de 3 años (Brandle, 1998).

#### **2.6.4. Dormancia en la semilla**

La capacidad de las semillas para retrasar el proceso de germinación hasta que las condiciones ambientales sean ideales, que permitan los mecanismos de sobrevivencia de las plántulas, es conocida como dormancia (Coopeland y McDonald, 1995). La dormancia puede ser clasificada en primaria y en secundaria (Fenner, 2000).

##### **2.6.4.1. Dormancia primaria.**

Es el tipo de dormancia más común en el que se puede encontrar las semillas, está dado por factores exógenos y endógenos (Fenner, 2000).

#### **2.6.4.2. Dormancia exógena.**

Fenner, (2000), menciona que la dormancia exógena hace referencia a las condiciones ambientales básicas que determinan el proceso de germinación como disponibilidad de agua, luz y temperatura por su parte Bewley y Black, (1994); Finch-Savage y Leubner-Metzger, (2006); afirman que la absorción de agua por parte de la semilla está directamente influenciada por la presencia de la testa y la permeabilidad que ésta tenga al intercambio gaseoso algunas. Familias como Fabaceae, Malvaceae, Chenopodiaceae y Liliaceae presentan problemas de permeabilidad del agua y son conocidas como semillas duras (Coopeland y McDonald, 1995). El efecto de la testa puede ser mecánico, o químico debido a la presencia de inhibidores fenólicos, impidiendo el flujo necesario de agua y oxígeno para la germinación.

#### **2.6.4.3. Dormancia endógena.**

Es el tipo de dormancia que es inherente a las características internas de la semilla, entre estos se encuentran: dormancia por embriones rudimentarios, dormancia por inhibición metabólica y dormancia por inhibición osmótica.

i). Dormancia por embriones rudimentarios. En algunas especies el proceso de maduración morfológica del embrión ocurre después del proceso de dispersión, lo cual se convierte en un tipo de dormancia porque el embrión inmaduro es incapaz de germinar, algunas especies como *Ranunculus*, *Plantago*, *Fraxinus*, *Viburnum*, *Ilex* y *Pinus* presentan este tipo de dormancia que se caracteriza por la maduración del embrión días o semanas después del proceso de dispersión (Coopeland y McDonald, 1995).

ii). Inhibición metabólica. Algunos compuestos presentes en las semillas inhiben vías metabólicas específicas; por ejemplo, la presencia de cianuro en algunas semillas actúa inhibiendo la germinación debido a que bloquea la cadena de transporte de electrones en el proceso respiratorio; sin embargo, en muy bajas concentraciones el cianuro promueve el proceso de germinación (Coopeland y McDonald, 1995).

iii) Inhibición osmótica: Algunas sustancias poseen alta presión osmótica que inhiben el proceso de germinación en semillas. Compuestos como azúcares o sales en concentraciones altas pueden ser buenos competidores por la

disponibilidad de agua con las semillas lo cual lleva a que el proceso de imbibición en las semillas no se complete y esta no pueda germinar. Ejemplos de este tipo de dormancia son encontrados en los frutos de remolacha azucarera en donde la alta concentración de azúcares y sustancias inorgánicas inhiben la germinación de las semillas (Coopeland y McDonald, 1995).

#### **2.6.4.4. Dormancia secundaria.**

Algunas semillas no dormantes encuentran condiciones que generan posteriormente la inducción de la dormancia. Este tipo de situaciones puede ser causado por la exposición de las semillas a condiciones que favorecen la germinación junto con la exposición a un factor que bloquea y restringe el proceso de germinación. Este tipo de dormancia es reportado en semillas de variedades de trigo de Primavera y cebada de Invierno en la que la dormancia secundaria puede ser inducida luego de una exposición de las semillas deshidratadas a temperaturas entre 50°C a 90°C, o el almacenamiento durante siete días de semillas de trigo de primavera en condiciones de alta humedad (Coopeland y McDonald, 1995).

Otros casos son en semillas de *Ulmus*, al someter las semillas a tratamientos de oscuridad continua en el que se generó un descenso en el porcentaje de germinación que no pudo ser corregido con tratamientos de alternancia de temperatura (Nomiya, 2010).

Aunque los mecanismos de dormancia secundaria pueden estar dados por el efecto de factores térmicos (temperatura), por presencia o ausencia de luz; este tipo de dormancia puede también ser inducida por exceso o ausencia de agua, compuestos químicos y gases. Algunos investigadores sugieren dos hipótesis para explicar el modo de acción de la dormancia secundaria: la primera es la imposición o bloqueo de puntos control en los procesos metabólicos que hacen parte del proceso de germinación, y la segunda hace referencia a la inducción por algún factor (exceso o déficit de agua, luz, temperatura y gases) de sustancias que inhiben la germinación contra sustancias que promueven el proceso (Coopeland y McDonald, 1995).

## 2.7. Germinación.

La germinación es un proceso que consiste en la absorción de agua, la reactivación del metabolismo y la iniciación del crecimiento del embrión de una semilla (Bidwell, 1990)

Thomson (1979), dicen que el embrión dentro de la semilla es una planta miniatura, y que está vivo y respira lentamente, y cuando las condiciones son favorables para el crecimiento vegetal, el embrión empieza su desarrollo provocando la ruptura de las cubiertas de la semilla y la emergencia de una nueva planta.

El proceso de germinación está influenciado tanto por factores internos como externos. Dentro de los factores internos están la viabilidad del embrión, la cantidad y calidad del tejido de reserva y los diferentes tipos de dormancia. Algunos de los factores externos que regulan el proceso son el grosor de la testa, disponibilidad de agua, temperatura y tipos de luz. El estudio de la biología y fisiología de las semillas es de vital importancia para el hombre, ya que la mayoría de las especies cultivadas como los cereales son propagadas a partir de semillas sexuales (Russo, *et ál.*, 2010).

Jiménez, (1990), afirma que la germinación es el conjunto de eventos que llevan a la semilla a mostrar un aumento marcado de la actividad metabólica en general y a iniciar la formación de la plántula a partir del embrión, mediante la adición de agua.

Moreno, (1996), describe a la germinación como la emergencia y desarrollo de las estructuras que son esenciales, provenientes del embrión, y donde la semilla, propicia la capacidad para producir una planta normal en condiciones favorables. Así mismo, Camacho, (1994), menciona que la germinación es el proceso mediante el cual un embrión adquiere el metabolismo necesario para reiniciar el crecimiento y transcribir las porciones del programa genético que la convertirán en una planta adulta.

Las tasas de germinación para *Stevia rebaudiana* Bertoni varían mucho. Pueden pasar de 4 a 6 días para alcanzar los dos tercios de la germinación final del 62 - 90% a 25° C (Cameiro, 1993; Chen, 1995; Shock, 1982; Takahashi, 1996). La

germinación requiere al menos 20 ° C y, a menudo, más de 25 grados; la luz generalmente aumenta la germinación. El envejecimiento acelerado (40 grados en papel húmedo) durante menos de 24 horas puede acelerar la germinación pero reducir la germinación total (Tanaka, 1985).

### **2.7.1. Tipos de germinación.**

Las semillas, atendiendo a la posición de los cotiledones respecto a la superficie del sustrato, pueden diferenciarse en la forma de germinar. Así, podemos distinguir dos tipos diferentes de germinación: epigea e hipogea (Santamarina *et al.*, 1997).

#### **2.7.1.1. Germinación epigea.**

En las plántulas denominadas epigeas, los cotiledones emergen del suelo dado un considerable crecimiento del hipocótilo (porción comprendida entre la radícula y el punto de inserción de los cotiledones). Posteriormente, en los cotiledones se diferencian cloroplastos, transformándolos en órganos fotosintéticos y actuando como si fueran hojas. Finalmente, comienza el desarrollo del epicótilo (porción del eje comprendida entre el punto de inserción de los cotiledones y las primeras hojas). Presentan este tipo de germinación las semillas de cebolla, ricino, judía, lechuga, mostaza blanca, etc.

#### **2.7.1.2. Germinación hipogea.**

En las plántulas hipogeas, los cotiledones permanecen enterrados; únicamente la plúmula atraviesa el suelo. El hipocótilo es muy corto, prácticamente nulo, en tanto que el epicótilo se alarga, apareciendo las primeras hojas verdaderas, que son en este caso, los primeros órganos fotosintetizadores de la plántula. Este tipo de germinación lo presentan las semillas de los cereales, guisante, haba, robles.

Otros autores señalan que la germinación epigea ocurre cuando los cotiledones salen de las semillas y se exponen fuera del suelo, mientras que la germinación hipogea se refiere a los cotiledones que permanecen dentro de la testa de las semillas y no emergen a la luz (Zevallos y Flores, 2003).

## 2.8. Latencia.

Según Hartley, (1993), el periodo de latencia es afectado por varios factores como la humedad, la luz, la concentración de gases y de otras sustancias, que en ocasiones pueden ser manipulados para alterar este estado.

Salisbury y Ross (1994), definen latencia como la condición que la semilla al no poder germinar, aun teniendo una humedad determinada externa, y además expuesta a condiciones atmosféricas que tienen los suelos bien aireados y a temperaturas ideales para cierta especie en su actividad fisiológica. A su vez, Thompson, (1979), menciona que latencia es uno de los métodos naturales de preservar las especies y que es debida, en parte al menos, a sustancias inhibitoras que se desarrollan durante la maduración en el campo y la cantidad de inhibidor parece estar afectado por las condiciones ambientales. En tiempo seco y cálido se produce relativamente poca cantidad de sustancias inhibitoras. La latencia se puede superar por medio del raspado de las paredes externas de la testa, lo cual implica el riesgo de dañar el embrión.

## 2.9. Factores que afectan la germinación.

Başbağ, *et al.*, (2009), señalan que los determinantes genéticos y los factores ambientales están relacionados con la germinación.

Camacho, (1994), hace referencia que para que se lleve a cabo la germinación en las semillas se necesita que: a) la semilla sea viable, o sea, que tenga un embrión vivo capaz de crecer, b) se tenga la temperatura, aireación y humedad adecuada para el proceso y c) se eliminen los bloqueos fisiológicos presentes en las semillas, que impiden la germinación.

Los factores que afectan a la germinación los podemos dividir en dos tipos, factores internos propios de la semilla como la madurez y viabilidad de las semillas; factores externos que dependen del ambiente como el agua, temperatura y gases.

### 2.9. 1. Factores internos.

#### 2.9.1.1. Madures de las semillas

Santamarina, *et al.*, (1997), mencionan que una semilla es madura cuando ha alcanzado su completo desarrollo desde el punto de vista morfológico como fisiológico. La madurez morfológica se consigue cuando las distintas estructuras



de la semilla han completado su desarrollo. Aunque la semilla sea morfológicamente madura, muchas de ellas pueden seguir siendo incapaces de germinar porque necesitan experimentar una serie de transformaciones fisiológicas. Donde requieran la pérdida de sustancias inhibitoras de la germinación o la acumulación de sustancias promotoras de crecimiento. En general, necesitan reajustes en el equilibrio hormonal de la semilla y/o en la sensibilidad de su tejido para las distintas sustancias activas.

## **2.9.2. Factores externos.**

### **2.9.2.1. Agua.**

El primer paso para que se inicie la germinación es el proceso de absorción de agua, llamado imbibición de la semilla. La hidratación de una semilla se produce en tres fases (Santamarina, *et al.*, 1997).

**2.9.2.1.1. Fase I:** Se lleva a cabo la absorción inicial del agua (imbibición) y es consecuencia de las membranas celulares y de las fuerzas ejercidas por los contenidos; ocurre tanto si la semilla está viable como si no lo está, si está latente o no. Es independiente de la actividad metabólica de la semilla, aunque ésta se inicia rápidamente con la entrada del agua (Santamarina, *et al.*, 1997).

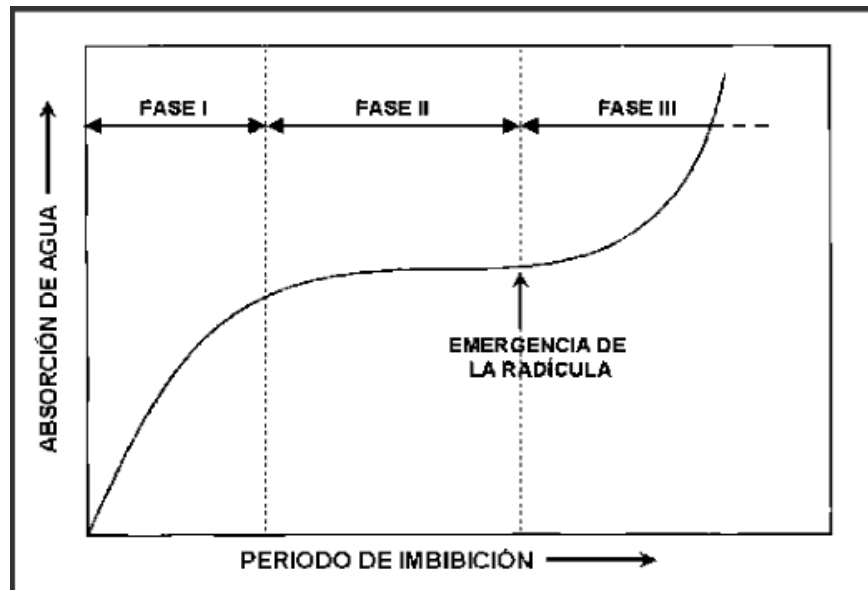
**2.9.2.1.2. Fase II:** Corresponde a un periodo de rezago. Las semillas muertas y las latentes mantienen este nivel de hidratación. Para las semillas que no están latentes es un periodo de metabolismo activo que prepara la germinación; para las semillas latentes también es un periodo de metabolismo activo y para las muertas es un periodo de inercia (Santamarina, *et al.*, 1997).

**2.9.2.1.3. Fase III:** Está asociada con la germinación y sólo la presentan las células viables, no latentes. Durante esta fase obviamente hay actividad metabólica, incluyendo el inicio de la movilización de las reservas almacenadas (Moreno, 1996). Cabe mencionar que, el agua es necesaria para la rehidratación de las semillas, un exceso de la misma actuaría desfavorablemente para la germinación, pues dificultaría la llegada de oxígeno al embrión (Santamarina, *et al.*, 1997).

## **2.10. Contenidos de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>.**

La mayor parte de las semillas requieren para su germinación un medio suficientemente aireado que permita una adecuada disponibilidad de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>.

De esta forma el embrión obtiene la energía imprescindible para mantener sus actividades metabólicas.



**Figura 2.3.** Esquema de las tres fases de la imbibición de agua por una semilla, medida mediante el incremento en peso fresco durante el proceso de germinación (Santamarina *et al.*, 1997).

### 2.11. Temperatura.

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que determinan el éxito de la germinación y todas las semillas necesitan la temperatura adecuada para la germinación. En general, las bajas temperaturas retrasaron significativamente la germinación (Pourreza y Bahrani, 2012). Kumar y Sharma, (2012), informaron que la germinación de la semilla de *Stevia rebaudiana* Bertoni se ve obstaculizada por la baja temperatura.

Probert, (2010), menciona que la temperatura está frecuentemente asociada con el proceso de germinación por afectar el porcentaje de germinación, la tasa diaria de germinación, la tasa de absorción de agua, la velocidad de las reacciones enzimáticas y el transporte de las sustancias de reserva

Samaniego, *et al.*, (2002), afirman que la temperatura es un factor decisivo en el proceso de la germinación, ya que influye sobre las enzimas que regulan la velocidad de las reacciones bioquímicas que ocurren en la semilla después de la rehidratación; además, afecta la actividad metabólica celular, la absorción de

agua y nutrientes, el intercambio gaseoso, la producción y gasto de carbohidratos y los reguladores del crecimiento, entre otros

Sharma, (1976), determinó que aunque las altas temperaturas (> 30 °C) son desfavorables para la germinación y causan daños a las semillas y las plántulas, las temperaturas más bajas (<15 °C) también son inhibitoras pero no causan daño permanente a las semillas. Por su parte, Pourreza y Bahrani, (2012), dicen que a veces la germinación puede verse afectada negativamente por temperaturas más altas.

Roberts, (1988), hace mención que la temperatura óptima es considerablemente importante para la tasa de germinación de las semillas de Stevia. Puede disminuir a temperaturas más altas o más bajas que la temperatura óptima. Señala que un gran porcentaje de plántulas mueren después de la germinación y se tornan negras a temperaturas superiores a 30 °C, mientras que a 40°C, las semillas sufren daño permanentemente. Este caso explica por qué el porcentaje de germinación se reduce a 30°C., Kawatani, *et al.*, (1976) hacen referencia que la temperatura óptima para la germinación de la semilla de Stevia es de 20 ° C. En otro estudio, Takahashi *et al.*, (1996), compararon la germinación de semillas de Stevia a diferentes temperaturas (20, 25, 30 ° C) donde encontraron que la máxima germinación ocurrió a 25 ° C con 90.3% del contenido de la humedad relativa.

### **2.12. Luz.**

Takaki, (2001), hace referencia que los requerimientos de luz necesarios para el proceso de germinación, las semillas se clasifican en tres grupos. El primer grupo corresponde o involucra a las semillas fotoblásticas positivas, ellas germinan como respuesta a la luz. En el segundo grupo están las fotoblásticas negativas, en él las semillas sólo germinan en oscuridad. En el tercer grupo están las semillas insensibles a la luz, germinan indistintamente bajo condiciones de luz u oscuridad. Por su parte, Piedrahita, (1997), menciona que algunas semillas presentan fotoblastismo, es decir si la luz estimula la germinación (fotoblastismo positivo), pero si es inhibida en presencia de la luz entonces se habla de fotoblastismo negativo.

La presencia de luz puede influir en algunas semillas para germinar, pero en otras puede provocar inhibición (Abdullateef y Osman, 2011). Muchas semillas silvestres tienen comportamientos diferenciales con respecto a la luz. Existen aquellas que sólo germinan en la oscuridad y aquellas que sólo germinan bajo luz continua, otras que requieren de un periodo breve de iluminación para germinar, otras son indiferentes a la presencia de luz u oscuridad. Al igual que en el caso de las temperaturas alternantes, las semillas encuentran en la naturaleza ambientes lumínicos muy diversos: bajo la vegetación, bajo tierra (Moreno, 1996).

La luz es un factor de gran importancia, determina la posición en el suelo donde va a germinar la semilla; además controla la germinación bajo el dosel de las ramas de los árboles, y al interactuar con la temperatura participa en el control estacional del rompimiento de la latencia. Algunas semillas sólo requieren luz para germinar cuando están recién colectadas, mientras que en otras este efecto persiste hasta por un año y en otras más, se desarrollan durante el almacenamiento. Por lo tanto, es un factor en el cual la edad de la semilla también es determinante (Moreno, 1996).

La luz o, más exactamente, la radiación fotosintéticamente activa suministra energía a las plantas para la producción de fotosíntesis. Es bastante obvio que la cantidad de luz interceptada depende principalmente de la superficie foliar del cultivo, y se expresa normalmente como índice de área foliar (Fronza y Folegatti, 2003).

### **2.13. Polinización.**

Hein, (2009), define que la polinización es un sistema que proporciona transferencia de información genética entre las plantas a través del polen. La producción de polen se produce en abundantes órganos masculinos y debe pasar al estigma para la fertilización (Delaplane y Mayer, 2000). Paalhaar *et al.*, (2008), menciona que las especies de plantas auto incompatibles necesitan polinizadores para la producción de semillas. En general, cinco mecanismos de polinización; el viento (anemofilia), el agua (hidrofilia), las aves (ornitofilia), los mamíferos (zoofilia) y los insectos (entomofilia) se encuentran en las plantas (Isagi, 2011).

Ingrouille y Eddie, (2006), afirma que la polinización por viento está muy extendida en las comunidades de plantas, pero existen propiedades negativas de la polinización eólica, donde es menos abundante por la deposición de polen sobre los estigmas homólogos en comparación a la polinización con insectos (Rosas, *et al.*, 2011). Delaplane y Mayer, (2000), consideran que el polen puede ser demasiado pesado para la polinización por el viento. Por lo tanto, la polinización de insectos es el método de polinización más acertado (Cerena, 2004). En la actualidad, las abejas melíferas son el polinizador más importante de las plantas (Corbet, *et al.*, 1991; Klein, *et al.*, 2009).

Monteiro, (1982), hace referencia que la polinización de *Stevia rebaudiana* Bertoni es entomófila (Por insectos), auto incompatible (tiene barreras genéticas y fisiológicas que impiden la germinación del propio polen o el desarrollo del tubo polínico), protandria (fenómeno reproductivo de las plantas en las cuales ocurre la maduración de los gametos masculinos antes que los gametos femeninos); de tipo esporofítico o con polinización cruzada entre dos variedades o biotipos de distinta época de floración.

Hein, (2009), menciona que la polinización es un sistema que proporciona transferencia de información genética entre las plantas a través del polen. La producción de polen se produce en abundantes órganos masculinos y debe pasar al estigma para la fertilización (Delaplane y Mayer, 2000).

Las especies de plantas auto incompatibles necesitan polinizadores para la producción de semillas como *Stevia* (Paalhaar, *et al.*, 2008). En general, son los cinco mecanismos de polinización. Para Viento (anemofilia), por el agua (hidrofilia), por las aves (ornitofilia), por los mamíferos (zoofilia) por insectos (entomofilia) (Isagi, 2011).

La polinización por viento está muy extendida en ciertas comunidades de plantas (Ingrouille y Eddie, 2006), encontrando ciertas propiedades negativas en la polinización eólica (Ingrouille y Eddie, 2006

Además, a veces, el polen puede ser demasiado pesado para la polinización del viento (Delaplane y Mayer, 2000). Por lo tanto, la polinización de insectos es el método de polinización más común (Cerena, 2004). En la actualidad, las abejas

melíferas son el polinizador más importante de plantas con flores en la tierra (Corbet, *et al.*, 1991; Klein, *et al.*, 2009). Con las referencias anteriores se podría manejar la polinización mecánica para el género *Stevia* debido a que la floración de la planta es muy variadas.

Se ha encontrado que la planta de *Stevia* presenta un bajo porcentaje de germinación de semillas por lo que (Midmore y Rank, 2002); (Yadav, *et al.*, 2011), por su parte mencionan que para producir semillas con alta tasa de germinación es posible utilizar métodos de polinización más adaptados.

Monteiro, (1982) quien menciona que la polinización es entomófila (Polinización cuyos agentes son los insectos), auto incompatible (tiene barreras genéticas y fisiológicas que impiden la germinación del propio polen o el desarrollo del tubo polínico), protandria (fenómeno reproductivo de las plantas en las cuales ocurre la maduración de los gametos masculinos antes que los gametos femeninos); de tipo esporofítico o con polinización cruzada entre dos variedades o biotipos de distinta época de floración.

#### **2.14. Uso de la *Stevia***

Los usos establecidos para los productos de la planta de *Stevia* cubren todos los edulcorantes artificiales de baja en calorías. Así como la mayoría de los otros fines para los cuales se puede usar azúcar. El uso principal es como un edulcorante para mejorar la palatabilidad de los alimentos y bebidas. A diferencia del aspartame, los edulcorantes de la planta de *Stevia* son estables al calor hasta 200 °C, son estables a los ácidos y no fermentan, haciéndolos adecuados para su uso en una amplia gama de productos, incluyendo alimentos cocidos al horno, alimentos a través de la mejora de los sabores y olores (Ikan, *et al.*, 1993)

Los productos obtenidos de *Stevia*, también tienen usos benéficos como hierbas, productos medicinales y para otros usos más inusuales. En extractos fermentado de *Stevia*, han encontrado actividad bactericida contra bacterias transmitidas por los alimentos, incluyendo *E. coli* (Tomita, *et al.*, 1997). Algunos de los usos aceptados son: edulcorante de mesa para té, café, bebidas sin alcohol, jugos de frutas, helados, yogures, sorbetes, tortas, galletas, pasteles, tartas, mermeladas, salsas, encurtidos, jaleas, postres, chicles, caramelos, confiterías, mariscos, verduras, dietas de peso, dietas para diabéticos,

mejoradores de sabor, color y olor, con fuentes de antioxidantes y potenciador de bebidas alcohólicas.

Como usos medicinales: Pasta de dientes, enjuagues bucales, precursor de caries, cuidado de la piel, control del acné, agente de curación rápida, alimento para diabéticos, tratamiento para la hipertensión y control de la presión arterial, antagonista de Calcio y agente bactericida. Finalmente como otros usos: Producción de reguladores de crecimiento de plantas.

Dentro de las características que hacen de la planta de Stevia una especie potencialmente valiosa e importante se encuentra la amplia adaptabilidad a climas diversos, su forma perenne en la naturaleza (Andolfi, *et al.*, 2002), su capacidad única de regeneración después de las lesiones por heladas (Singh y Kaul, 2005), su hoja es la parte económica más importante, su forma de propagación vegetativa (Chalapathi, *et al.*, 1997b), la obtención de 3-4 cosechas por año (Donalisio, *et al.*, 1982) y su fácil propagación a través de semillas, tallos y división de raíces (Singh y Kaul, 2005).

En otras características se tienen: su sensibilidad a la longitud de día, actuando como planta de día corto (Lester, 1999; Valio y Rocha, 1966), es sensible al exceso de agua, la baja resistencia a moderada a la sequía (Jia, 1984), su poco crecimiento temprano (Borie, 2000). Sin embargo presenta algunas desventajas como: La gran competencia por malezas en las primeras etapas (Andolfi *et al.*, 2002), su sensibilidad a las heladas, su pobre germinación de semillas (Barathi, 2003; Carneiro *et al.*, 1997; Duke, 1993; Shock, 1982), su período corto de potencial germinativo (Marcavillaca, 1985), su pobre tolerancia al pH alto del suelo (Shock, 1982), su madurez asincrónica de las semillas.

La planta de Stevia es considerada apta para personas con problemas diabéticos e hipotensora (recomendada para personas con tensión alta, donde la reduce), útil en el cuidado facial, en acidez de estomacal, adecuada para bajar el nivel de acidez de la sangre y de la orina, además ayuda a bajar de peso, no tiene calorías y no produce daño alguno por el azúcar que contiene, alta solubilidad en agua fría o caliente, no contiene nutrimentos, sin calorías, se puede hornear (es estable a los 200°C), no se fermenta, no crea placa dental, es anti-caries, y no tiene efectos tóxicos. (Brandle, 2005).

En Paraguay, la Stevia sin refinar se usa naturalmente como bactericida inhibiendo el crecimiento de bacterias, sobre todo las que producen las caries y los problemas de encías, también para aliviar el problema de la garganta irritada, las encías sangrantes, una de las complicaciones más comunes de la diabetes (Barriocanal, *et al.*, 2008).

Los tallos secos de la Stevia tienen un alto porcentaje de antioxidantes y son requeridos en la industria japonesa. También se los puede utilizar como fuente de materia orgánica, como fibra para la alimentación de animales o como cobertura para la misma plantación (Zubiate, 2007).

Esta planta puede reemplazar los otros edulcorantes en comidas, tortas y bebidas en general. Usualmente es agregado a bebidas de bajo contenido calórico (refrescos), caramelos, goma de mascar, pastelería, yogurt, dulces, encurtidos, salsas, productos medicinales y de higiene bucal (en China se emplea en las formulaciones de pastas dentales (De Paula, *et al.*, 2010).

## **2.15. Propagación de la planta de Stevia**

### **2.15.1. Propagación sexual.**

La propagación sexual de las plantas se da por medio de las semillas, las cuales tienen la función de multiplicar y perpetuar la especie (Bradford y Nonogaky, 2007).

En la naturaleza, la planta de Stevia se regenera a partir de la semilla, del enraizamiento de los tallos de las plantas que tocan el suelo y de la regeneración en la base de la planta (división de la corona). La germinación de la semilla es notablemente muy pobre, comúnmente debido a la semilla infértil. Algunas variedades / selecciones de plantas no producen prácticamente ninguna semilla viable para su auto compatibilidad.

Ferreira y Handro, (1988), señalan que la planta de Stevia se propaga principalmente por medio de semillas, que resultan de la polinización cruzada. Esta forma de reproducción implica recombinación genética y por lo tanto alta heterogeneidad en las semillas resultantes que se reflejan tanto en su crecimiento como en la producción de steviósidos.



Esta planta se reproduce sexualmente por achenios, por lo que se obtiene heterogeneidad de las poblaciones resultantes. Es de polinización cruzada, lo cual se manifiesta en plantas con gran variabilidad genética y como consecuencia, disparejas en tamaño, niveles de azúcares totales y rendimiento. La floración tampoco es uniforme al igual que la maduración de la semilla, siendo su recolección lenta y difícil. Además otra desventaja agronómica de este tipo de propagación es el bajo porcentaje de germinación (10 a 38%) que se reduce con el tiempo; se demuestra que éste método no es el más adecuado para el cultivo de la Stevia (Suárez y Salgado, 2008; Tamayo, 2009; Zubiarte, 2007).

Sakaguchi y Kan, (1982), Addullateef, *et al.*, (2012); Monteiro, (1980); Raina, *et al.*, (2013), afirman que esta especie tiene muy bajo porcentaje de germinación por lo que Taware, *et al.*, (2010).mencionan que la germinación de la semilla no es adecuada, la propagación a través de las semillas es reducida. Por lo que Abdullateef y Osman, (2011), reconocen que la propagación es a través de esquejes de tallo.

Brandle, *et al.*, (1998a), afirman que la hierba dulce se puede propagar tanto en semillas como en esquejes. Sin embargo, la capacidad de germinación de las semillas es generalmente baja, a veces la germinación no ocurre.

Shock, (1982), Duke, (1993), y Carneiro, *et al.*, (1997b), habían reportado un porcentaje pobre de semillas viables en Stevia. La baja tasa de germinación de semillas es un problema para el establecimiento a gran escala de este cultivo, ya actualmente se multiplica por medio de estacas, lo que implica un alto costo.

Las razones de la baja fertilidad de las semillas señalada por algunos autores como Monteiro, (1980); Chalapathi, *et al.*, (1997); Oddone, (1997); Maiti y Purohit, (2008) informan autoincompatibilidad esporofítica, mientras que otros difieren con lo encontrado (Goettemoeler y Ching, 1999).

La reproducción sexual de la planta de Stevia, presenta ciertas desventajas que pueden afectar de forma negativa la eficiencia del cultivo, así como causar alta heterogeneidad de las poblaciones resultantes, baja eficiencia de germinación debido al alto porcentaje de semillas estériles y la ineficiencia en la recolección de la semilla por la desuniformidad en la floración y la maduración de la misma.

Además, la variabilidad genética y fenotípica de la planta de Stevia, también podría afectar el contenido de glucósidos diterpenicos (Tamura, *et al.*, 1984; Molinas, 1989; Ferreira y Handro, 1988).

El uso de semillas para establecer cultivos de Stevia es más exitoso en climas tropicales donde no existe una restricción climática en la duración de la temporada de crecimiento. La germinación y el establecimiento a partir de la semilla a menudo son pobres y algunas veces no tienen éxito (Shaffert, 1998). Las flores de Stevia necesitan fertilizarse con polen de otra planta para producir semillas viables. Se recomienda una alta densidad de abejas (3-4 colmenas por hectárea) para una buena producción de semillas. La recolección de semillas inmaduras también puede contribuir a una mala germinación (Colombus, 1997). En Australia, la gama limitada de clones de plantas muestra una pobre fertilidad y germinación de las semillas, de modo que los viveros afirman que las plantas no se pueden cultivar a partir de semillas (Martelli, 1985). Solo la propagación vegetativa se utiliza para satisfacer la demanda de especímenes de plantas.

#### **2.15.2. Propagación asexual.**

Debido a las desventajas que presenta la propagación sexual, se ha propiciado el uso de la reproducción asexual, que implica el empleo de partes vegetativas de la planta original (Hartmann y Kester, 1998). Jordán, (1983), señalan que la propagación asexual puede llevarse a cabo por hijuelos, estacas, esquejes, injertos y por cultivo de tejidos.

Se ha aplicado un considerable esfuerzo de investigación a la propagación vegetativa, incluido el cultivo de tejidos / multiplicación de invitro. Los esquejes de tallos y brotes nuevos se pueden propagar con éxito (Gvasaliya, 1990; Lee, 1979; Nishiyama, 1991; Shock, 1982) y el enraizamiento de esquejes puede estimularse, pero no siempre, mediante el uso de reguladores de crecimiento, algunos reguladores del crecimiento a veces pueden influir (aumentar) la concentración de esteviósidos en las hojas (Acuna, 1997; Chen, 1993).

La propagación asexual puede llevarse a cabo por hijuelos, estacas, esquejes, injertos y por cultivo de tejidos (Jordán, 1983).

Otra forma de propagación vegetativa es la micropropagación in vitro en donde se usa el meristemo y se puede obtener una cantidad masiva de plantas. El

cultivo de tejidos *in vitro* vía organogénesis representa una buena alternativa para aumentar las tasas de multiplicación de vegetales (Suárez y Salgado, 2008). Sin embargo, la adaptación al campo suele ser muy pobre e ineficaz.

El tamaño (número de hojas) de los esquejes y la duración del día durante el corte pueden influir en el enraizamiento y el crecimiento (Zubenko, 1991). Los esquejes tomados a fines del invierno (agosto en Brasil) se enraizaron mejor que los tomados en otros momentos (Carvalho, 1995) La ubicación en la planta de la cual se toman los esquejes también puede afectar el crecimiento y el enraizamiento, los esquejes de la mitad superior y los cuatro entrenudos que rinden mejor (Tirtoboma, 1988).

Para la propagación de tejidos cultivados, muchas partes diferentes de la planta se pueden utilizar con éxito: hojas, brotes auxiliares, brotes de raíz en el cuello, primordios de brotes, explantes internodales (Yang, 1997). La multiplicación de *in vitro* se ha utilizado con frecuencia para multiplicar clones individualmente seleccionados o criados, y se han documentado procedimientos exitosos (Bondarev, 1998; Cameiro, 1997). Las variaciones de los medios de micropropagación estándar se han estudiado para maximizar las tasas de supervivencia de la planta de Stevia (Bespalhok Filho, 1993). Se ha evaluado una gama de medios de multiplicación y enraizamiento. Se han desarrollado técnicas y equipos para la propagación masiva a gran escala, especialmente en Japón (Akita, *et al.*, 1994).

Para la siembra de cultivos comerciales, la cual no está exenta de problemas debido a las bajas tasas de multiplicación por estacas, lo que ha obligado a la utilización de técnicas de cultivo de tejidos para hacer más eficiente el proceso de multiplicación ya que entre otras cosas permite la multiplicación masiva de plantas con características uniformes (micropropagación) (Taiariol, 1995; Cassacia y Alvarez, 2006; Suárez, *et al.*, 2008).

### **2.15.3. Micro propagación.**

Una de las aplicaciones del cultivo de tejidos es la micropropagación, que consiste en regenerar plantas a partir del cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos. La micropropagación se ha aplicado con éxito en especies hortícolas, ornamentales y especies leñosas (Orozco, 2006 y Levitus, 2010).

Entre las ventajas que la micropropagación ofrece están, el incremento acelerado del número de plantas derivadas de un genotipo seleccionado, la reducción del tiempo de multiplicación, la posibilidad de obtener grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, con bajos costos y tiempos económicamente costeables, así como mayor control sobre la sanidad del material que se propaga, facilidad para transportar el material in vitro de un país a otro, con una menor restricción (Orozco, 2004, Levitus, 2010).

#### **2.15.3.1. Micro propagación por yemas axilares.**

La micro propagación de una especie puede ser posible a partir de células meristemáticas preexistente como los meristemos apicales o yemas laterales que se encuentran en las axilas de las hojas, a partir de estructuras con función meristemáticas obtenidas a partir de células especializadas. La micropropagación mediante yemas axilares consiste en cultivar en un medio nutritivo un segmento nodal que lleva una yema a partir de la cual se desarrolla un vástago, mientras que la micropropagación de *Novo* implica que las células especializadas sufran un proceso de desdiferenciación, inducción y rediferenciación previo a la formación de las plantas (morfogénesis) (Pierik, 1990).

La producción de plantas por medio de la proliferación de brotes axilares, ha demostrado ser un método confiable y aplicable en un gran número de especies (George, 1993).

### **2.16. Aspectos agronómicos.**

#### **2.16.1. Ambiente**

El hábitat natural de la planta de Stevia es subtropical se desarrolla en ambientes semihúmedos en el Trópico de Capricornio (22 a 23° Latitud S), a 200-400 metros sobre el nivel del mar, con 1,500 - 1,800 mm de lluvia y temperaturas extremas de -6°C a más 43°C. Crece naturalmente en áreas bajas sobre suelos ácidos arenosos pobres adyacentes a pantanos, y así se adapta y requiere constantemente pies mojados o capas freáticas poco profundas (Colombus, 1997). En suelos más fértiles, cuando la planta ha madurado puede alcanzar hasta 1.8 m con hasta 20 ramas por planta (Jia, 1984).

### 2.16.2. Variedades.

El género *Stevia*, se extiende desde el suroeste de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina, a través de México, América Central, los Andes y las Tierras Altas Brasileñas, en ecosistemas localizados entre 1000 y 2000 m sobre el nivel del mar. Se estima que el número de especies dentro del género es de 300, de las cuales más de 80 se encuentran en Norte América, y de éstas, 70 especies son nativas de México (Grashoff, 1972).

En el país de Ecuador se han encontrado cultivares como *S. anisostemma* y *S. bertholdii*, en las regiones de Chimborazo e Imbabura los cultivares *S. crenata*, en la región de la Loja la *S. bertholdii*, en la localidad la Pichincha *S. anisostemma*, *S. crenata* y *S. dianthoidea* y en la localidad de Tungurahua la especie *S. tunguraguensis* (Valencia, et al., 2000). Existen otras especies como: *Stevia eupatoria*, *S. obata*, *S. plummerae*, *S. salicifolia*, *S. serrata* (Brandle, et al., 2000, Ramesh, et al., 2006).

En el estado de Hidalgo, las condiciones climáticas y fisiográficas tan diversas de la Sierra de Pachuca, propician la existencia de un considerable número de hábitats, favoreciendo el establecimiento de distintas comunidades vegetales, entre las cuales se encuentran 21 especies de *Stevia*: *S. eupatoria*, *S. hirsuta* DC. Var *hirsuta*, *S. iltisiana*, *S. jorul lensis*, *S. latifolia*, *S. lucida*, *S. micrantha*, *S. aff. Monardifolia*, *S. monardifolia*, *S. nepetifolia*, *S. ovata*, *S. ovata* var. *Ovata*, *S. pilosa*, *S. porphyrea*, *S. purpusii*, *S. rhombifolia* var. *Typica*, *S. saücifolia*, *S. salicifolia* var. *salicifolia*, *S. serrata*, *S. tephra* y *S. tomentosa* (Manitto, 1981).

De las 21 especies encontradas en el Estado de Hidalgo, únicamente se han descrito en estudios fitoquímicos 10 de ellas (Hernández, 1998; Álvarez, et al., 2005).

Debido a que el género *Stevia* es uno de los más grandes y reconocidos de la tribu *Eupatorieae*, este taxón, morfológicamente tiene una amplia diversidad en su composición química. De los estudios fitoquímicos realizados en aproximadamente 70 especies, se han encontrado metabolitos tales como aceites esenciales y otros constituyentes volátiles como borneol, cineol, pulegona, geraniol, acetato de linalol, chamazuleno, ahumuleno, cariofileno, etc. Derivados de la acetofenona, benzofurano y cromeno. Como ejemplos de estos

compuestos se encuentran: phidroxiacetofenona, un derivado del benzofurano y el derivado del cromeno (Álvarez, *et al.*, 2005).

A pesar de la amplia capacidad de adaptación de *S. rebaudiana*, se ha reportado que la cantidad glucósidos que constituyen la hoja, especialmente el steviosido y el Rebaudiosido A, los dos principales glucósidos; dependen en gran medida del genotipo, las condiciones ambientales (Gardana, *et al.*, 2010), la nutrición (Das, *et al.*, 2007) y el riego (Fronz y Folegatti, 2003) entre otros. Este último puede llegar a aumentar los rendimientos de hoja seca por hectárea de 2000 a 3000 kg y el contenido de glucósidos a 15 a 20 % (Barathi, 2002)

Existen otras especies como: *Stevia eupatoria*, *S. obata*, *S. plummerae*, *S. salicifolia*, *S. serrata*. En Ecuador se han determinado *S. anisostemma* y *S. bertholdii* en Chimborazo e Imbabura: *S. crenata*; en Loja *S. bertholdii*; en Pichincha, *S. anisostemma*, *S. crenata*, *S. dianthoidea*., en Tungurahua *S. tunguraguensis* (Valencia, *et al.*, 2000).

Cabe señalar que la especie *Stevia rebaudiana*, cuenta con más de 144 variedades a nivel mundial, destacando a Morita 2; además esta especie presenta numerosos ecótipos; también la variedad Ariete es actualmente muy cultivada debido a su mayor edulcorancia (Taiariol y Molina, 2010).

La variedad Morita 2, fue desarrollada en Japón por Toyosigue Morita, la ventaja de esta variedad es que presenta mayores rendimientos de hoja seca y mejor contenido químico que las otras variedades (Soejarto, *et al.*, 1983).

Mitsubishi, (1975), haciendo selección de 28 ecótipos diferentes basándose principalmente en sus características morfológicas y determinó que el contenido de esteviósido en hojas varió de 2.07 y 18.34%.

## **2.17. Requerimientos del cultivo.**

### **2.17.1. Condiciones del clima.**

La región de Paraguay, crece naturalmente la *Stevia* en clima subtropical, semihúmedo, con precipitaciones de 1400 a 1800 mm, que se distribuyen regularmente durante todo el año y según Sakaguchi, (1982), la temperatura más apropiada para *Stevia* es de 15 a 30°C con un límite inferior de -3°C.

El cultivo requiere de 1,400 a 1,800mm de lluvia por año. No soporta sequías muy prolongadas. Requiere una alta luminosidad y de temperaturas superiores a los 13°C, idealmente entre los 18 y 24°C (15), y según Tigrero (2004), 24 a 28°C, aunque resiste y prospera hasta los 43°C acompañados de precipitaciones frecuentes. Las temperaturas entre 5° y 15°C no matan a la Stevia, aunque inhiben o detienen su adecuado desarrollo foliar, mientras que las inferiores a 5°C sí lo hacen. El requerimiento de humedad relativa oscila entre 75 y 85% (Tigrero y Landázuri, 2009).

### **2.17.2. Condiciones de suelo.**

Respecto a los suelos, son óptimos aquellos con pH 6.5–7, de baja o nula salinidad, con buen contenido de materia orgánica, de textura franco arenosa a franco y con buena permeabilidad y drenaje (Vergara, *et al.*, 2003).

Las condiciones más favorables se dan en suelos franco arenosos o franco arcillosos con un pH entre 5.5 y 7.5 (Cassacia y Alvarez, 2006; Tigrero y Landázuri, 2009; Zubiarte, 2007). No son recomendables suelos salinos ni suelos muy ácidos, pudiendo estos últimos ser enmendados con cal.

Exige una muy buena preparación del terreno, debido a que su sistema radicular es moderadamente superficial. La planta se mantiene varios años en el mismo sitio y además es buena competidora con malezas. Asimismo, existen estudios enfocados al reconocimiento de enfermedades limitantes en el cultivo y causales de bajos rendimientos, las cuales son causadas por: *Sclerotium*, *Fusarium*, *Choanephora*, *Curvularia* y *Corynespora* (Jarma, 2008).

En áreas con precipitaciones altas se recomienda que el terreno tenga buena aireación y una ligera pendiente para evitar encharcamientos, ya que esta planta no tolera suelos con exceso de humedad, principalmente por problemas fúngicos concomitantes. También es recomendable cultivar en curvas de nivel. (Cassacia y Alvarez, 2006; Tigrero y Landázuri, 2009).

Para la realización de esta plantación se requerirá de la elaboración de camas de 0.20m de alto por 1.00m de ancho y 17.5m de largo, sembrando a distancias de 3cm entre plantas y 7.5cm entre hileras, para obtener un total aproximado de 7,500 plantas por cama (Villegas, 2010).

La planta de Stevia se desarrolla bien en una amplia gama de suelos dado un suministro constante de humedad y drenaje adecuado; Las plantas cultivadas pueden alcanzar hasta un metro o más en la altura (Shock 1982).

### **2.17.3. Fertilización.**

Los requerimientos de fertilizantes son moderados para la Stevia, en parte debido a su adaptación a suelos de mala calidad. Los ensayos de fertilizantes muestran reducciones de rendimiento a altas tasas de fertilizante (Goenadi, 1985; Kornienko, *et al*, 1995; Lee, J.I., 1979; Lee, J.I., *et al*, 1980).

La planta no es muy exigente en macro y micronutrientes, pero se recomienda aplicar materia orgánica como humus de lombriz, guano vacuno o de caballo. No es recomendable el estiércol de aves porque facilita la infestación de nemátodos. Además se recomienda evitar el uso de fertilizantes y otros productos sintéticos con el fin de lograr un cultivo orgánico y desarrollar un producto natural con el cual se va a conseguir un mayor precio (Zubiate, 2007).

Aunque el uso teórico de nutrientes de la Stevia podría ser de 105 kg de N, 23 kg de P, 180 kg de K por hectárea en función de la eliminación de nutrientes durante la cosecha, se sugieren tasas máximas de NPK 40-20-30 para la India (Chalpathi, 1997)

A pesar de esto se debe tener en cuenta que en ciertas condiciones, en especial cuando hay altos requerimientos nutricionales del suelo puede ser aconsejable aplicar a la siembra y después de cada cosecha fertilizantes químicos (Cassacia y Alvarez, 2006; Marín, 2004; Villegas, 2010).

No parece haber requerimientos inusuales para elementos menores y los síntomas de deficiencia de nutrientes son típicos de otros cultivos (Limo Filho, *et al.*, 1997; Lima Filho, 1997; Sheu, *et al.*, 1987; Utumi, 1999; Utumi, *et al.*, 1999; Zhao, 1985).

Puede haber interacción variable entre algunos nutrientes en diferentes disponibilidades. Los requerimientos de fertilizantes para ensayos en maceta también se han establecido y no son altos (Angkapradipta, *et al.*, 1986; Goenadi, 1985).



La mayoría de los sistemas culturales involucran plántulas trasplantadas y, por lo tanto, generalmente se recomiendan densidades menores que las óptimas para ahorrar costos. Por lo general, se recomiendan densidades de 80 a 100,000 plantas por hectárea en espaciamentos de hileras de 45 a 65 cm (Columbus, 1997; Donalisio, *et al*, 1982; Oddone, 1999; Gvasaliya, 1990) con densidades de hasta 160,000 sugeridas para rendimientos más altos.

En su primer año, los cultivos pueden alojarse fácilmente y los tallos se rompen; sin embargo, los cultivos de retoño tienen tallos más fuertes y no sufren de alojamiento (Sumita, 1980).

#### **2.17.4. Riegos**

Por lo general, se asume que el riego suplementario es esencial para evitar el estrés hídrico en las plantas a menos que el área de cultivo tenga lluvias confiables durante la mayor parte del año. Se sugirió el riego por aspersión (Oddone, 1999), pero esto podría alentar las enfermedades de las hojas y reducir el número de semillas (cuando se requiere semilla). Oddone, (1999)

La planta requiere de riegos frecuentes para mantener un contenido de humedad del suelo por encima del punto o tan alto como el 80% en la capacidad de campo. Cualquier estrés de humedad puede reducir la producción de hojas (Goenadi, 1983)

La tolerancia al exceso de humedad podría ser la razón por la cual el cultivo en sitios planos da rendimientos más altos que en las laderas (Hallstrom, 1985; Hatano, *et al.*, 1994).

#### **2.17.5. Malas hierbas.**

El crecimiento lento cuando se establecen plántulas de Stevia son muy susceptibles a la competencia de malezas hasta un excelente establecimiento. El control de malezas antes y después del trasplante es más importante, esto no es difícil cuando el cultivo se desarrolla en países con bajos costos de mano de obra. Los herbicidas que son importantes para la producción mecanizada puede ser posible (Brandle, 1998).

El mantillo de plástico negro y la siembra de muy alta densidad (hasta 200,000 / ha) también han demostrado ser efectivos para el control de malezas (Basuki y Sumaryono, 1990).

### **2.18. Plagas.**

Los insectos no parecen ser un problema. La planta de Stevia ha demostrado una clara resistencia a los áfidos: el sabor dulce es un posible elemento disuasivo para los insectos (Metivier, 1979).

Aphidae, Cicadellidae, Curculionidae, Acetta, Formicidae y el molusco de la familia Limicidae (Cassacia y Alvarez, 2006). En el Ecuador se han registrado plagas de la familia Chrisomelidae, Pseudococcidae, además la *Trialeurodes vaporarium*, y algunos homópteros (Landázuri y Tigrero, 2009). Se han encontrado que atacan a nuevos retoños aun después de la latencia invernal (Shock, 1982)

### **2.19. Enfermedades**

Las enfermedades tampoco parecen ser un problema importante, aunque hay informes que afirman que registran la primera incidencia conocida de *Sclerotinia*, *Septoria foliar* e infecciones por *Alternaria* de punto negro (Chang, 1982; Ishiba, 1982; Ishiba, *et al.*, 1982; Lovering, 1996).

En Rusia, las enfermedades observadas en plantas de Stevia durante un período de 50 años incluyeron *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium* y *Rhizoctonia* (Zubenko, 1990)

Las muestras de Glasshouse en Gatton, Queensland llevaron a enfermedades fúngicas no identificadas. En Paraguay, las enfermedades potenciales se identifican como *Alternaria steviae* (manchas negras grandes), *Septoria steviae* (pequeñas manchas oscuras), *Rhizoctonia solani* (manchas del tallo y marchitez de las hojas) y *Sclerotinia rolfsii* ("seda blanca" alrededor del tallo de la planta). La fumigación por control a veces se lleva a cabo (Oddone, 1999)

#### **2.19.1. Septoriosis o mancha foliar (*Septoria steviae*).**

Es un hongo que produce manchas foliares de color marrón de forma irregular y un contorno amarillento en plantas de Stevia, se presenta generalmente bajo

condiciones de humedad y temperaturas elevadas, acompañadas por un mal drenaje (Cassacia y Alvarez, 2006; Zubiato, 2007 Tigrero y Landázuri, 2009;).

#### **2.19.2. Alternariosis o mancha negra (*Alternaria steviae*).**

En plantas de Stevia presenta manchas similares a las de Septoria pero de mayor tamaño, que se empiezan a desarrollar en el borde de la hoja y llegan al tallo y órganos florales, culminando con el desprendimiento de las hojas, principalmente de las inferiores. De igual manera, los factores predisponentes de este proceso son la humedad y temperaturas elevadas (Cassacia y Alvarez, 2006; Zubiato, 2007).

#### **2.19.3. Oídio (*Oidium sp.*).**

La patogenicidad de este hongo en la planta de Stevia, se inicia por un crecimiento blanco en la superficie foliar y de ramas adyacentes, seguido por amarillamiento y necrosis de las hojas (Cassacia y Alvarez, 2006).

#### **2.19.4. Roya blanca (*Albugo sp.*).**

Se manifiesta a manera de pústulas de color blanco amarillento en el envés de la hoja de Stevia, alterando así la calidad de la misma.

#### **2.19.5. Seda blanca (*Sclerotium roffsi*).**

Ataca a las plantas adultas de Stevia produciendo una mancha algodonosa alrededor del cuello de la planta. El hongo sobrevive en el suelo por largos periodos de tiempo y la transmisión se da por implementos agrícolas (Zubiato, 2007).

### **2.20. Cosecha.**

#### **2.20.1. Cosecha de hojas de la planta de Stevia**

Para la cosecha se deben utilizar únicamente tijeras. Se debe realizar el corte en botón floral o hasta el 10% de floración (flor abierta) que es cuando se obtiene el máximo nivel de edulcorante, de 5 a 7cm sobre el nivel del suelo (Cassacia y Alvarez, 2006; Zubiato, 2007).

El momento óptimo de la cosecha de hojas depende del cultivar y de la estación de crecimiento. Las hojas se cosechan aproximadamente cuatro meses después de la siembra cortando las plantas en cajón de 5 a 10 cm del nivel del suelo (Donalizio, *et al.*, 1982).

Dado que el cultivo es altamente sensible a baja temperatura, en áreas frías, el cultivo puede ser cosechado antes o al inicio del invierno (Columbus, 1997).

Durante la floración, el esteviósido se disipa en las hojas (Bian, 1981; Hoyle, 1992), por lo que las hojas deben ser cosechadas en el momento de la floración (Dwivedi, 1999) o antes de la floración (Barathi, 2003).

En climas más fríos (con inviernos severos), solo es posible una cosecha por plantación. Bajo estas circunstancias, la cosecha es cuando el rendimiento es mayor y puede ser al comienzo del clima frío (Colombus, 1997); la cosecha temprana reducirá el rendimiento total (ShuPing y Shizhen, 1995).

### **2.20.2. Cosecha de semillas**

La cosecha inmadura de semillas causa una germinación de semillas muy baja, Madan, *et al.*, (2010), señalan que las condiciones ambientales son importantes en la producción de semillas de Stevia; tal es el caso, las lluvias intensivas reducen el rendimiento de semilla y la capacidad de germinación de la semilla.

El problema más importante sobre la producción de semillas de Stevia es la autoincompatibilidad de las flores, por lo que necesita una polinización cruzada para la producción de semillas (Midmore y Rank, 2002).

El rendimiento de semillas hasta 8,1 kg ha<sup>-1</sup> es posible (Carneiro, 1990). Sin embargo, los requerimientos climáticos, tanto de longitud como de temperatura, son diferentes para la producción vegetativa máxima y para la floración máxima y la producción de semillas (Hoyle, 1992), ya que el cultivo es desencadenado a floración bajo condiciones de días largos.

La producción de semillas que se obtiene en el hemisferio Norte es considerada la más adecuada y se localiza entre 20° y 30 ° de Latitud Norte. El peso de semillas de Stevia oscila entre 0,15 y 0,30 g (Brandle, *et al.*, 1998).

### **2.21. Rendimiento de cultivo**

Las cifras en rendimiento comercial señalan una producción de 1,600 - 2,000 kg de hojas secas por año. Los rendimientos experimentales sugieren que los sistemas con cosechas múltiples al año darán mayores rendimientos y, donde se cultivan Lúpulos, es probable que la cosecha en el segundo y tercer año, sean

mayores que en los cultivos que requieren replantación cada año (Miyazaki , 1978).

Los productores comerciales a gran escala deben esperar solo del 50 al 70% de los rendimientos experimentales. Los rendimientos de los cultivos de segundo año (retoño) pueden ser mayores que los de los cultivos de primer año (Miyazaki, 1978).

Las cantidad total de semilla viable producida en un año son inciertas. Sin embargo un rendimiento de semilla se obtienen hasta 8 kg por hectárea, que al 50% de germinación, cantidad suficiente para 250 hectáreas de cultivo (Lester, 1999). Otra referencia sugiere que en el Norte de China es posible un rendimiento de semilla de 67 kg por ha además un rendimiento de hoja seca de 1387 kg por ha.

El rendimiento de la producción de semillas asociado con el último tiempo de corte del tallo, la densidad de siembra y el número de florecencia (Macchia, *et al.*, 2007).

## **2.22. Postcosecha de semilla de Stevia.**

Inmediatamente posterior al corte, se debe realizar una limpieza de las ramas y la separación de las hojas basales (negras y cafés), evitando de esta manera, afectar la calidad final de la materia prima (Villegas, 2010).

El procedimiento común es cosechar todo el cultivo en verde y transportarlo a instalaciones de secado, después al sol en hornos de secado (artificiales). En el secado al sol, colocar una capa delgada de plantas cosechadas con una duración de 10 horas, para reducir el contenido de humedad de la planta que contiene alrededor del 80% (Miyazaki, 1978).

Sin embargo el secado en horno puede demorar hasta dos días (Colombus, 1997), el secado rápido es probable que dé hojas secas de mejor calidad. Si el material vegetal cortado no se seca rápidamente, la calidad de la hoja puede deteriorarse por oxidación, perdiendo hasta un tercio del contenido de esteviósido después de tres días (Miyazaki, 1978).

En temperaturas altas durante el secado artificial también puede conducir a la pérdida de contenido. Un color de hoja seca verde es deseable y representa una buena calidad.

Después del secado, las hojas se quitan de los tallos a mano o con un separador mecánico antes de empacar las hojas para su transporte a una instalación de procesamiento. Los tallos de las plantas de Stevia contienen pocos o ningún edulcorante, aunque se sugiere que pueden contener algunos potenciadores del sabor, odoradores y otros agentes de uso potencial para mejorar los alimentos o las bebidas alcohólicas (Miyazaki, 1978).

### **2.23. Generalidades del ácido giberélico.**

Los procesos de crecimiento y desarrollo de los vegetales están controlados básicamente por tres tipos de factores: génicos, hormonales y ambientales (García, *et al.*, 2004).

Según Barceló, *et al.*, (1992), los cambios en el tamaño de las plantas producidos al aplicar giberelinas, hace que nos planteemos la cuestión de que si estos resultados son cambios en el número de células, en el tamaño de las mismas o combinación de ambos. Hoy está demostrado que el último caso es la consecuencia del tratamiento con giberelinas. La influencia de las giberelinas sobre el crecimiento puede efectuarse a través de cada una de las regiones del tallo que contribuyen al crecimiento longitudinal: el meristemo apical, el subapical y la zona de elongación.

Cada vez existen estudios que apoyan la hipótesis de que las fitohormonas tienen un papel importante en la regulación de la dormancia en las semillas. Estudios basados en la aplicación exógena de hormonas, así como establecimiento de los niveles hormonales endógenos, se ha observado su relación con un determinado estado de dormancia (Santamarina, *et al.*, 1997).

Cuando la planta germina, comienzan a actuar las fitohormonas que regulan su crecimiento desde una fase temprana. Las llamadas giberelinas, son las que gobiernan varios aspectos de la germinación; sin embargo cuando la planta emerge a la superficie, se forman las llamadas auxinas, las que aceleran su crecimiento vertical, y, más tarde, comienzan a aparecer las Citocininas,

encargadas de la multiplicación de las células y que a su vez ayudan a la ramificación de la planta (Parra, 2002). Rojas en 1987, encontró que existe evidencia suficiente para postular dos hechos básicos sobre la acción fundamental de las fitohormonas.

A). Las fitohormonas no actúan directamente a nivel del organismo sino de la célula, por ejemplo sobre la mitosis, el alargamiento celular entre otros.

B). La acción básica de las fitohormonas ocurre sobre los ácidos nucleicos a nivel de la transcripción del mensaje (ADN → ARN) o de su traducción (ARN → Aminoácido).

Las giberelinas incrementan el crecimiento potencial del embrión, además, hacen que un embrión con una radícula más fuerte penetre un endospermo debilitado, lo cual genera una germinación más rápida y acelera el crecimiento de la plántula (Ogawa, *et al.*, 2003).

Azcón-Bieto y Talón, (2000); Taiz y Zeiger, (2002), a aplicación de ácido giberélico incrementa el tamaño de la zona meristemática al aumentar el número de células que entran en división celular. Estas células contribuyen posteriormente a la elongación del tallo, crecimiento de hojas y raíces.

### **2.21.1. Funciones del ácido giberélico**

Las funciones que llevan a cabo las fitohormonas en la planta, se pueden resumir en los siguientes puntos (Santamarina, *et al.*, 1997).

- a) Incrementan el crecimiento en los tallos
- b) Interrumpen el periodo de dormancia de las semillas, haciéndolas germinar y movilizan las reservas en azúcares
- c) Inducen la brotación de yemas
- d) Promueven el desarrollo de los frutos
- e) Estimulan la síntesis de RNAm.
- f) Sustituyen las necesidades de frío o de día largo requeridas por muchas especies para la floración
- g) Inducen la partenocarpia en algunas especies de frutales.
- h) Retrasan la maduración de ciertos frutos, especialmente los cítricos

### **2.22.2. Inducción de la germinación en semillas.**

Entre las fitohormonas del crecimiento que presentan las semillas, están las Giberelinas que inducen la germinación (Ramírez, *et al.*, 2003). Específicamente, las giberelinas aumentan la elongación celular, haciendo posible que las raíces puedan atravesar las cubiertas de la semilla (Santamarina, *et al.*, 1997).

Las giberelinas tienen una función clave en el control de la germinación de las semillas y por ello son ampliamente utilizadas para promover o inducir la germinación de semillas en diversas especies de plantas (Ikuma y Thimann, 1963; Lewak y Khan, 1977; Mehanna *et al.*, 1985; Karssen *et al.*, 1989; Baskin y Baskin, 1998; Tigabú y Odén, 2001).

Son importantes también para inducir rompimiento de la latencia después de la imbibición de las semillas, permitiendo la germinación y crecimiento del embrión (Siobhan y McCourt, 2003).



### III. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Localización del área de estudio.

El área de estudio se localiza en la región de la Comarca Lagunera, ubicada en el municipio de Torreón, en el estado de Coahuila.

#### 3.2. Localización del sitio experimental.

El trabajo de investigación se realizó en el área de laboratorio del Departamento de Horticultura en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, la que se encuentra ubicada al Oriente de la ciudad de Torreón, Coahuila, entre las coordenadas geográficas 103° 25' 57" Longitud Oeste y 25° 31' 11" Latitud Norte, con una altitud de 1123 m., (CNA, 2002).

#### 3.3. Clima de la región.

La región de la Comarca Lagunera, específicamente el municipio de Torreón, presenta un clima extremoso con lluvias escasas durante el año que van desde los 100 a 300 mm anuales. Las temperaturas oscilan entre 30° y 40°C. (Santibáñez, 1992).

#### 3.4. Obtención del material de propagación.

Las semillas de Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), se obtuvieron de la empresa Stevia Mexico.Org. ®. La que se encuentra ubicada en Texcoco, estado de México.

#### 3.5. Cosecha del material de Propagación a utilizar.

La obtención de semillas para la evaluación fue de la cosecha realizada tres meses antes, presentando la semilla ciertas características.

##### 3.5.1. Color de las semillas de Stevia.

Respecto al color que presentaron las semillas de Stevia, fue un color canela y un color oscuro.

##### 3.5.2. Tamaño de la semilla de Stevia.

Las semillas presentaron un tamaño de entre 2 a 4 mm de longitud.

##### 3.5.3. Porcentaje de germinación.

Las semillas de Stevia utilizadas en el trabajo de investigación, presentaron entre un 10% a 38% de germinación de acuerdo a datos proporcionados por la empresa Stevia México. Org. ®.

### **3.6. Preparación del ácido giberélico.**

Para preparar las tres soluciones de ácido giberélico en concentraciones de 200, 400 y 600 ppm, se hicieron cálculos obteniendo así las cantidades correspondientes. El producto que contiene el ácido giberélico (en concentración de 10 gr), utilizado es de la marca Distingo®. Después, en una balanza digital se pesaron las cantidades para cada una de las concentraciones a preparar. En seguida se conectó a una toma de corriente una parrilla eléctrica con agitación a una temperatura de 35°C. En tres vasos de precipitado se vaciaron 500 ml de agua destilada y se fueron colocando por separado cada uno de ellos y cuando se alcanzó la temperatura correspondiente se agregaron las cantidades de ácido giberélico al agua contenida en el vaso de precipitado, agregando un magneto mediano para obtener una solución homogénea. El tiempo de homogenización fue de 5 minutos. Finalmente se llevó la solución a temperatura ambiente y se transfirió a frascos de plástico cubiertos con papel canela, colocado en refrigeración a una temperatura de 4.5°C hasta ser utilizada dicha solución.

### **3.7. Colocación de las semillas de Stevia en remojo con soluciones de ácido giberélico.**

Las semillas de Stevia, utilizadas en el trabajo de investigación presentaron color canela y oscuro. Cuando fueron puestas en remojo en concentraciones de ácido giberélico de 200, 400, 600 ppm, se utilizaron charolas de poliuretano, colocando en el fondo papel secante (tipo sanita) en el que se colocaron 50 semillas por caja plástica, acomodadas en hileras de 10 semillas cada una, esto en cada uno de los cuatro tratamientos de estudio, y las 9 repeticiones, durante 24 horas, después se realizó un lavado con agua estilada y se colocaron para observar la germinación.

### **3.8. Establecimiento de las semillas de Stevia en el Laboratorio.**

Las semillas de Stevia de los cuatro tratamientos y sus nueve repeticiones correspondientes fueron llevadas a las mesas de trabajo del laboratorio de Horticultura, para hacer la toma de datos correspondientes. Además se utilizó un estereoscopio electrónico donde se apreció la aparición de la radícula y plúmula, esta última es lo que da origen al desarrollo de la parte aérea (hojas y tallos). Se realizaron observaciones diarias durante un lapso de 10 días cuantificando la

cantidad de semillas germinadas a las 48 horas después del remojo con la solución del ácido giberélico.



**Figura 3.4.** Germinación de una semilla de Stevia, UAAAN UL. 2017.

### **3.9. Diseño experimental.**

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con cuatro tratamientos de estudio y nueve repeticiones por tratamiento. Se establecieron 50 semillas por repetición para obtener 1800 semillas evaluadas.

### **3.10. Tratamientos de estudio.**

Los tratamientos de estudio fueron cuatro:

1. Tratamiento 1 = Testigo (0 ppm de AG<sub>3</sub>)
2. Tratamiento 2 = 200 ppm de AG<sub>3</sub>
3. Tratamiento 3 = 400 ppm de AG<sub>3</sub>
4. Tratamiento 4 = 600 ppm de AG<sub>3</sub>

### **3.11. Variables evaluadas.**

Las variables evaluadas fueron cuatro.

#### **3.11.1. Número de semillas germinadas.**

Esta variable se cuantificó después de transcurridas 48 horas (2 días) de exposición a las concentraciones de ácido giberélico (0, 200, 400 y 600 ppm), realizando el conteo de semillas germinadas durante 5 días de acuerdo al ISTA (1993) clasificándolas como plántulas normales a las que tenían estructuras esenciales bien desarrolladas.

### **3.11.2. Porcentaje de germinación.**

El porcentaje de germinación se obtuvo del total de semillas de Stevia germinadas en los cuatro tratamientos y sus repeticiones.

### **3.11.3. Longitud de radícula.**

La medición de esta variable de estudio se hizo utilizando una regla graduada de 30 cm bajo el lente del estereoscopio electrónico que se encuentra en el laboratorio de Horticultura. Además se utilizó pinzas tipo relojero para separar aquellas semillas germinadas.

### **3.11.4. Longitud de plúmula.**

La plúmula, estructura vegetativa que dará origen a la parte aérea donde se desarrollaran hojas, tallos, flores, frutos y semillas, fue evaluada con regla graduada de 30 cm en cada una de las semillas germinadas.

### **3.12. Análisis estadístico.**

El ordenamiento de datos obtenidos en cada variable de estudio se hizo a corde al paquete estadístico SAS, versión 9.1.

### **3.13. Otro software utilizado.**

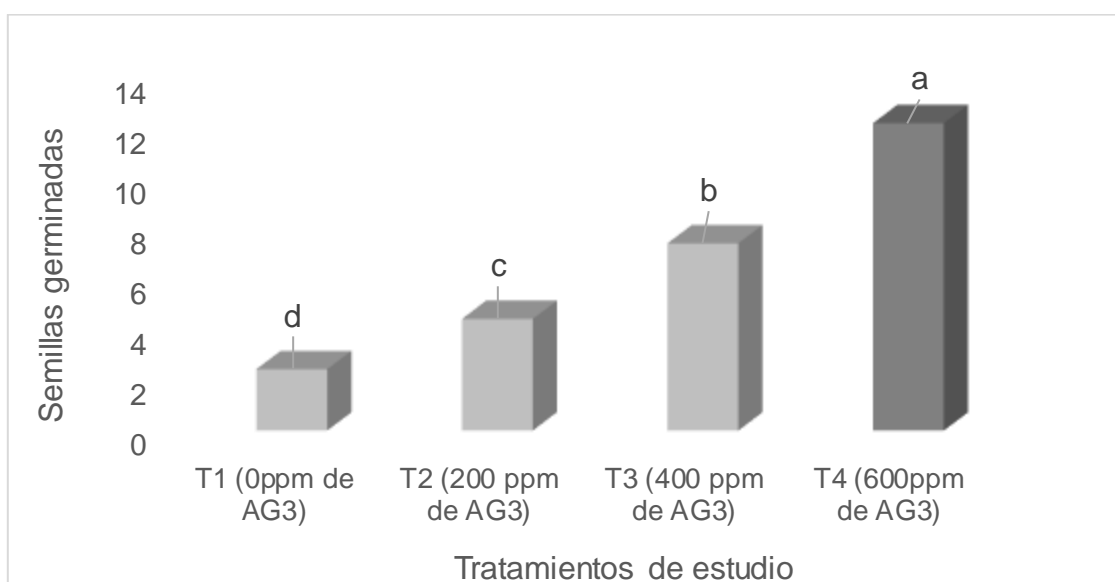
Excel, programa utilizado para construir el ordenamiento de datos y los gráficos correspondientes.

## IV. RESULTADOS

De los resultados obtenidos respecto a concentraciones de ácido giberélico en semillas de Stevia se encontró lo siguiente:

### 4.1. Número de semillas germinadas

Para el número de semillas germinadas de Stevia, el análisis de varianza, presentó alta significancia estadística al 0.05 (Anexo 1.), donde el tratamiento 4 que se refiere a 600ppm de ácido giberélico, resultó con 12.22 semillas germinadas de un total de 450 semillas puestas en germinación en condición controlada (Anexo 2.). Mientras que el tratamiento 1 (0 ppm de AG<sub>3</sub>) con 2.44 semillas germinadas (Figura 4.1.)



**Figura 4.1.** Número de semillas germinadas de Stevia con cuatro concentraciones de ácido giberélico. UAAAN UL. 2017.

Para los tecnólogos de semillas, la viabilidad se refiere a la capacidad de la semilla para germinar y generar plántulas normales; mientras que desde la perspectiva fisiológica, se refiere a si la semilla contiene o no cualquier tejido con actividad metabólica y si posee reservas energéticas y enzimas para el funcionamiento de las células de la planta (Moreira, *et al.*, 1992).

Hartmann y Kester, (1982), señalan que las semillas viables que no germinan cuando las condiciones ambientales son favorables, se consideran latentes. Este estado de la semilla quizá se deba a causas físicas (Cubierta dura, impermeable

al agua, entre otras) o causas fisiológicas como los inhibidores químicos en el fruto y la semilla, y los embriones inmaduros.

Por su parte Shaffert, (1998), señala que la germinación y el establecimiento a partir de la semilla a menudo son pobres y algunas veces no tienen éxito.

Shock (1982), Duke (1993), y Carneiro, et al., (1997), reportaron un porcentaje pobre de semillas viables en Stevia. Tiene dos tipos de semillas, semillas oscuras y de color canela. Las semillas de color oscuro son a menudo fértiles sin embargo, las semillas de bronceado suelen ser pálidas o claras. Oddone (1997) considera que las semillas "claras" son infértiles.

Los efectos fisiológicos de las giberelinas tanto endógenas como exógenas en el rompimiento de la latencia de semillas han sido reconocidos en diversas especies de plantas; la aplicación de giberelinas, comúnmente reemplaza la necesidad de un estímulo ambiental específico como es la temperatura o la luz (Metzger, 1983; Hasemi y Estilai, 1994; Liu, et al., 1996b; García-Martínez y Gil, 2002).

Karssen, et al., (1989) y Debeaujon y Koornneef (2000), han propuesto dos mecanismos diferentes de acción de las giberelinas en el proceso de germinación, el primero es que influyen en la hidrólisis de las reservas de alimento; en semillas de *Lycopersicon esculentum*, provocan la hidrólisis de las paredes celulares de las semillas ricas en galactomananas que forman parte de la resistencia mecánica para la protusión de la radícula; el segundo mecanismo de acción consiste en un efecto directo sobre el potencial de crecimiento del embrión.

Cada vez hay más estudios que apoyan la hipótesis de que las fitohormonas tienen un papel importante en la regulación de la dormancia en las semillas. Los estudios se basan en la aplicación exógena de hormonas, así como en establecer los niveles hormonales endógenos, y en observar su relación con un determinado estado de dormancia (Santamarina, et al., 1997).

Ramírez, et al., (2003), asume que entre las fitohormonas del crecimiento que presentan las semillas, están las giberelinas que inducen la germinación. Esto explicaría que la aplicación exógena de ácido Giberelico en un lote de semillas

de Stevia al momento de ser embebidas en agua, estimula la germinación, comparándolas con un lote de semillas que solo fueron embebidas en agua.

Para flores, (2004), la latencia es la capacidad que tiene las semillas para poder atrasar su germinación hasta que el tiempo y lugar sean favorables y lo representa como un mecanismo de sobrevivencia de las plantas.

Un gran número de semillas de especies presentan latencia, razón por la cual no germinan aun cuando sean viables y se expongan a condiciones “favorables” (Robles, 1990).

Según Moreno, (1996), las semillas muertas son consideradas aquellas que no germinen, diferentes de las semillas latentes o duras. Además, el mismo autor (1976), dice que son las que presentan un aspecto descolorido y están blandas y frecuentemente están invadidas por mohos.

Por su parte, Salisbury, (1992), dice que la semilla pierde su viabilidad rápidamente cuando se almacena en aire húmedo y donde se tienen temperaturas de 35° C o aun así son más cálidas. Hay casos que la pérdida puede ser por algunos patógenos que la semilla presenta en su interior.

Los principales factores que inhiben la germinación son físico-mecánicos o físico-químicos, en los primeros intervienen los recubrimientos de la semilla que pueden influir en la entrada del agua y oxígeno al actuar como barreras mecánicas, en el segundo intervienen ácidos o compuestos inhibidores de la germinación, como el ácido abscisico (Bidwell 1990; *Palma et al.*, 2000).

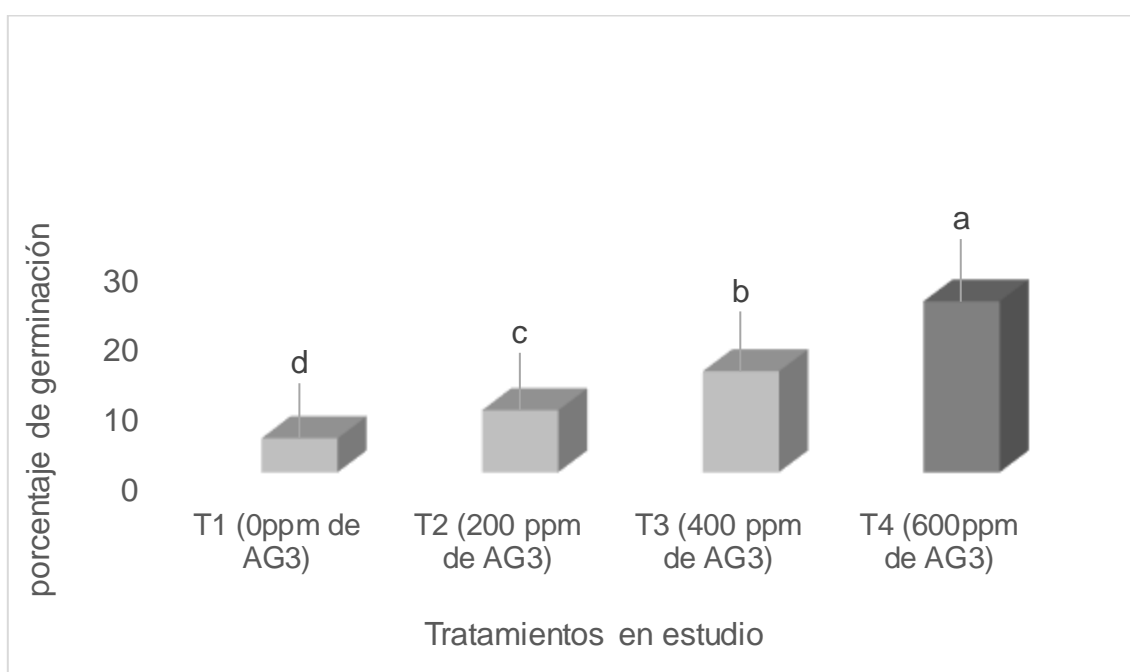
Esto explicaría que la aplicación exógena de ácido Giberelico en un lote de semillas de *Stevia rebaudiana* Bertoni al momento de ser embebidas en agua, estimula la germinación, comparándolas con un lote de semillas que solo fueron embebidas con agua.

#### **4.2. Porcentaje de germinación.**

Para el porcentaje de germinación en semillas de Stevia, el análisis de varianza presentó alta significancia estadística al 0.05 (Anexo 3.), donde el Tratamiento 4 (600 ppm de AG<sub>3</sub>), resultó con el porcentaje más alto igual a 24.44% de semillas germinadas (Anexo 4.), mientras que el Tratamiento 1 (0 ppm de AG<sub>3</sub>) con un porcentaje en las semillas germinadas de 4.88% (Figura 4.2.)

Felipe, *et al.*, (1971); De Vargas (1980) y Jordán, (1983), mencionan que la recolección de la semilla es lenta y muy difícil, debido a que la floración no es uniforme, lo que afecta a la maduración de la semilla; además, el porcentaje de germinación es bajo entre el 10 y 38 %.

*Stevia rebaudiana* Bertoni presenta muy bajo porcentaje de germinación de semillas por lo que Midmore y Rank, (2002); Yadav, *et al.*, (2011), mencionan que para producir semillas con alta tasa de germinación es posible utilizar métodos de polinización.



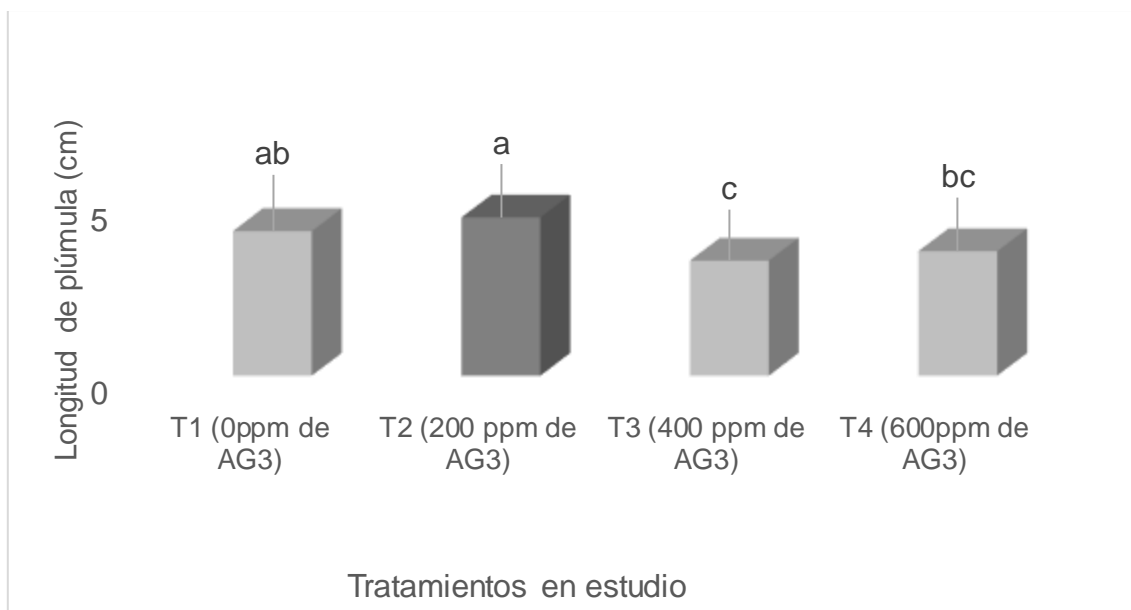
**Figura 4.2.** Porcentaje de semillas germinadas de *Stevia* con cuatro concentraciones de ácido giberélico. UAAAN UL. 2017.

Fuentes, *et al.*, (1996 a, b), obtuvieron un 52% en semillas de Orégano Cimarrón (*Ocimum gratissimum* L.), con 250 ppm de AG<sub>3</sub> y un 63.5%, cuando aplicaron 1000 ppm en semillas de *Stephania rotunda* L.

#### 4.3. Longitud de plúmula.

En la variable longitud de plúmula, se encontró alta significancia estadística (Anexo 5.), donde el Tratamiento 2 (200 ppm de AG<sub>3</sub>), resultó con el valor medio más alto igual a 4.55 cm en la longitud de plúmula (Anexo 6.), mientras que el Tratamiento 3 (400 ppm de AG<sub>3</sub>) con un valor medio igual a 3.31 cm. (Figura 4.3.)





**Figura 4.3.** Longitud de plúmula en semillas germinadas de Stevia con cuatro concentraciones de ácido giberélico, UAAAN UL. 2017.

Según Barceló, *et al.*, (1992), la influencia de las giberelinas sobre el crecimiento puede efectuarse a través de cada una de las regiones del tallo que contribuyen al crecimiento longitudinal: el meristemo apical, el subapical y la zona de elongación

La elongación del tallo está mediada por el control fotoperiódico del metabolismo de giberelinas (Azcón-Bieto y Talón, 2000).

Los procesos de crecimiento y desarrollo de los vegetales están controlados básicamente por tres tipos de factores: génicos, hormonales y ambientales (García, *et al.*, 2004).

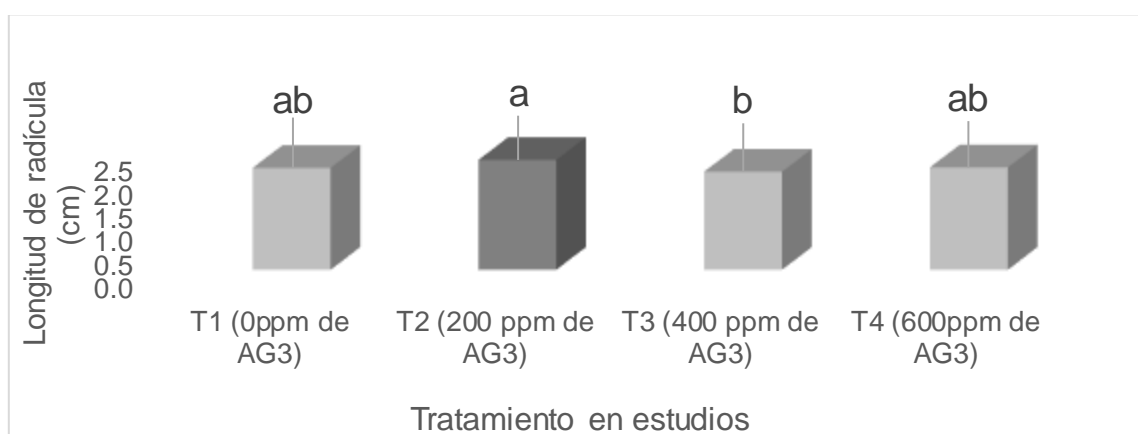
Barceló, *et al.*, (1992), señalan que los cambios en el tamaño de las plantas producidos al aplicar giberelinas, hace que nos planteemos la cuestión de que si estos resultados son cambios en el número de células, en el tamaño de las mismas o combinación de ambos. Hoy está demostrado que el último caso es la consecuencia del tratamiento con giberelinas. La influencia de las giberelinas sobre el crecimiento puede efectuarse a través de cada una de las regiones del tallo que contribuyen al crecimiento longitudinal: el meristemo apical, el subapical y la zona de elongación.

Las giberelinas estimulan el crecimiento vegetal, incrementando la división celular. Los tallos se vuelven generalmente más largos por la elongación de los

entrenados, permaneciendo el número de estos constante. Además, las giberelinas pueden inducir la floración en muchas especies que requieren baja temperatura (Weaver, 1976).

#### 4.4. Longitud de radícula.

Para la longitud de la radícula de las semillas germinadas de Stevia, el análisis de varianza presentó significancia estadística al 0.05 (Anexo 7.), donde el Tratamiento 2 (200 ppm de AG<sub>3</sub>), resultó con el valor medio más alto igual a 2.33 cm respecto a la longitud de la radícula en las semillas germinadas de Stevia (Anexo 8.), mientras que el Tratamiento 3 (400 ppm de AG<sub>3</sub>) con un valor medio de 2.08 cm de longitud. (Figura 4.4.)



**Figura 4.4.** Longitud de radícula en semillas germinadas de Stevia con cuatro concentraciones de ácido giberélico, UAAAN UL. 2017.

Brian y Grove, (1957), manifiestan que el ácido giberélico no estimula el crecimiento radicular, en ninguna circunstancia conocida. Esto sugiere que la regulación del crecimiento del vástago y de las raíces es esencialmente diferente en algunos aspectos fundamentales, ya que el ácido giberélico en concentraciones altas inhibe ligeramente el crecimiento de las raíces de las plantas.

Específicamente, las giberelinas aumentan la elongación celular, haciendo posible que las raíces puedan atravesar las cubiertas de la semilla (Santamarina, *et al.*, 1997).

Las giberelinas incrementan el crecimiento potencial del embrión (Ogawa, *et al.*, 2003). Por tanto, las giberelinas hacen que un embrión con una radícula más

fuerte penetre un endospermo debilitado, lo cual genera una germinación más rápida y acelera el crecimiento de la plántula.

Azcón-Bieto y Talón, (2000); Taiz y Zeiger, (2002), a aplicación de ácido giberélico incrementa el tamaño de la zona meristemática al aumentar el número de células que entran en división celular. Estas células contribuyen posteriormente a la elongación del tallo, crecimiento de hojas y raíces.

## V. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se puede concluir con lo siguiente:

1.- Para el número de semillas germinadas, el Tratamiento 4, que refiere una concentración de 600 ppm de ácido giberélico incrementó la germinación en semillas de Stevia, encontrando 12,22 semillas germinadas.

2.- Para el porcentaje de germinación de igual manera, el Tratamiento 4 (600 ppm de AG<sub>3</sub>), resultó ser el mejor logrando un incremento de un 24.44%. Esto demuestra que es posible mejorar el proceso de germinación con aplicaciones de ácido Giberelico en concentraciones de 600 ppm en adelante.

3.- Para la variable longitud de plúmula en plántulas de Stevia, el Tratamiento 2 (200 ppm de AG<sub>3</sub>), demostró ser el mejor presentando un valor medio igual a 4.55 cm de longitud.

4.- Para la variable longitud de radícula de igual manera, el Tratamiento 2 (200 ppm de AG<sub>3</sub>), resultó ser el mejor presentando un valor medio de 2.33 cm de longitud en la radícula.

## VI. RECOMENDACIONES.

1.- Por las características propias que presenta la semilla de estudio en la viabilidad y su respuesta a concentraciones de Ácido giberélico, se recomienda establecer su germinación en condiciones de invernadero en concentraciones por arriba de 600ppm.

2.- Con respecto a las concentraciones utilizadas en semillas de Stevia, es más recomendable las 600 ppm por su alta efectividad en la germinación.

3.- Con el fin de contribuir a mejorar el porcentaje de germinación de semillas de Stevia, se recomienda trabajar con productos comerciales que tengan concentraciones por arriba del 10%, de AG<sub>3</sub> a fin de incrementar la baja germinación de las semillas de Stevia.

## **VII. ANEXOS.**

**Anexo 1.** Análisis de varianza para la variable Número de semillas germinadas de Stevia, germinadas con cuatro concentraciones de ácido giberélico, UAAAN UL. 2017

<b>F.V</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>FT</b>	<b>Fr&gt;F</b>
<b>Tratamientos</b>	3	488.08	162.69	2.90	0.0001 **
<b>Error</b>	32	50.22	1.56		
<b>Total</b>	35				

**C.V = 18.87**

**DSM = 1.60**

**Anexo 2.** Análisis de varianza para la variable porcentaje de germinación en semillas germinadas de Stevia, germinadas con cuatro concentraciones de ácido giberélico, UAAAN UL. 2017

<b>F.V</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>FT</b>	<b>Fr&gt;F</b>
<b>Tratamientos</b>	3	1952.33	650.77	2.90	0.001 **
<b>Error</b>	32	200.88	6.27		
<b>Total</b>	35	2153.22			

**C.V= 18.87**

**DSM= 3.20**

**Anexo 3.** Análisis de varianza para la variable longitud de plúmula en semillas germinadas de Stevia, germinadas con cuatro concentraciones de ácido giberélico, UAAAN UL. 2017.

<b>F.V</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>FT</b>	<b>Fr&gt;F</b>
<b>Tratamientos</b>	3	8.49	2.83	2.90	0.006 **
<b>Error</b>	32	12.02	0.37		
<b>Total</b>	35	20.51			

**C.V= 15.69**

**DSM= 0.78**

**Anexo 4.** Análisis de varianza para la variable longitud de radícula en semillas germinadas de Stevia, germinadas con cuatro concentraciones de ácido giberélico, UAAAN UL. 2017.

<b>F.V</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>FT</b>	<b>Fr&gt;F</b>
<b>Tratamientos</b>	3	0.283	0.094	2.90	0.04 *
<b>Error</b>	32	1.024	0.032		
<b>Total</b>	35	1.307			

**C.V= 8.16**

**DSM= 0.17**



### VIII. LITERATURA CITADA

- Abdula R, Jeppesen PB, Rolfsen SE, Xiao J y Hermansen K, 2004, Rebaudioside A potently stimulates insulin secretion from isolated mouse islets: studies on the dose, glucose and calcium dependency, *Revista Metabolism*, Oct: 53(10):1378-81.
- Abdullateef, R.A., Osman, M., 2011. Efectos de las longitudes de onda de la luz visible sobre la germinabilidad de la semilla en *Stevia rebaudiana* Bertoni. *International Journal of Biology*, 3 (4): 83-91.
- Acuna, I., Nepovim, A., y Valicek, P. (1997). Micro propagación de plantas *Stevia rebaudiana* in vitro y contenido de esteviósido en hojas después de la aplicación de reguladores de crecimiento en condiciones de campo. *Agricultura Tropica et Subtropica* 30, 51-60.
- Akashi, H., y Yokoyama, Y. (1975). Extractos de hojas secas de *Stevia*. Prueba toxicológica. *Shokihin Kokyo (Tokyo)* 18, 34 - 43.
- Akita, M., *et al.*, - Propagación masiva de brotes de *Stevia rebaudiana* usando un biorreactor a gran escala. *Plant Cell Reports*, 1994. 13: p. 3-4.
- Alvarez, M. (1986). *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Aspectos toxicológicos. Tercer Seminario Brasileño sobre *Stevia rebaudiana* (Resúmenes), págs. 4-7.
- Álvarez-García R., J. Torres-Valencia, L. Román, J. Hernández, Cerda-García Rojas C. y Joseph-Nathan P. 2005. Configuración absoluta del residuo a-metilbutirilo en derivados de longipineno de *Stevia pilosa*. *Phytochem.* 66, 639 - 642.
- Andolfi, L., Ceccarini, L., y Macchia, M. (2002). Características bio-agronómicas de la *Stevia Rebaudiana*. *Informatore Agrario* 58, 48-51.
- Andolfi, L., Ceccarini, L., y Macchia, M. (2002). Características bio-agronómicas de la *Stevia Rebaudiana*. *Informatore Agrario* 58, 48-51.
- Andrés, G-M, S. 2011. Aproximación a la comprensión de un endulzante natural alternativo, la *Stevia rebaudiana* Bertoni: producción, consumo y demanda potencial. *AGROALIMENTARIA*. Vol. 17, Nº 32; enero-junio 2011: (57-69).

- Angkapradipta, P., Tuti-Warsito y P. Faturachim, - Los requisitos de fertilizantes N, P y K de *Stevia rebaudiana*. Menara Perkebunan, 1986. 54 (1): p. 1-6.
- Antón SD, Martin CK, Han H, Coulon S, Cefalu WT, Geiselman P, Williamson DA. Effects of Stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite*. 2010; 55: 37-43.
- Arkcoll, D. - Nuevos cultivos de Brasil. En Avances en nuevos cultivos. Actas del primer simposio nacional "Nuevos cultivos: investigación, desarrollo. Ciencias económicas. 1988. Indianápolis, Indiana, USA, Oct 1988: Timber Press, Portland, Oregon, USA 1990.
- Azcón-Bieto, J. y M. Talón. 1993. Fisiología y bioquímica de plantas. McGraw-Hill Interamericana, Madrid 581 p.
- Azcón-Bieto, J. y M. Talón. 2000. Fisiología y bioquímica vegetal. McGraw Hill/Interamericana, Barcelona, España.
- Azcón-Bieto, J. y M. Talón. 2000. Fundamentos de fisiología vegetal. McGraw-Hill Interamericana, Barcelona. 522 p.
- Barathi N., 2002. Stevia, A way to sweeten life. En "The Hindu". Fecha: 19.09.02. Citado: 08-02-08. Growmore Biotech Ltd. Disponible en:
- Barathi, N. (2003). Stevia-El edulcorante natural sin calorías. *Producto natural Radiance 2*, 120-122.
- Barriocanal, L. A., M. Palacios, G. Benítez, S. Benítez, J. T. Jiménez, N. Jiménez y V. Rojas. 2008. Aparente falta de efecto farmacológico de los glucósidos de esteviol usados como edulcorantes en humanos. Un estudio piloto de exposiciones repetidas en algunos individuos normotensos e hipotensos y diabéticos tipo 1 y tipo 2. *Toxicología Regulatoria y Farmacología*. Doi: 51 (1): 37 - 41.
- Başbağ, M., Toncer, O., Başbağ, S., 2009. Efectos de diferentes temperaturas y duración en la germinación de semillas de alcaparras (*Capparis ovata*). *Journal of Environmental Biology*, 30 (4): 621-624.
- Baskin, C.C. y J. M. Baskin, 1998. Semillas: ecología, biogeografía y evolución de la latencia y la germinación. Academic Press, EE. UU.
- Basuki and Sumaryono, - Effects of black plastic mulch and plant density on the growth of weeds and of *Stevia*. *Biotrop Special Publication*, 1990(38): p. 107-113.

- Benford D.J, Hill F, Schlatter y DiNovi M, 2009, Steviol Glycosides, Safety evaluation of certain food additives, Sixty ninth meeting of the FAO/WHO Expert Committee of Food Additives.
- Bespalhok Filho, J.C., L.G.E. Vieira, y J.M. Hashimoto, - Factores que influyen en la micropropagación in vitro de brotes axilares de Stevia rebaudiana (Bert). Revista Brasileira de Fisiología Vegetal, 1992. 4 (1): p. 59-61
- Bespalhok Filho, J.C., J.M. Hashimoto, y L.G.E. Vieira, - Inducción de embriogénesis somática a partir de explantes foliares de Stevia rebaudiana. Revista Brasileira de Fisiología Vegetal, 1993. 5 (1): p. 51-53.
- Bewley JD, Black M (1994) Semillas: Fisiología del desarrollo y la germinación. Plenum press, Nueva York, 445pp
- Bian, Y. M. (1981). Estudios sobre Stevia rebaudiana: una nueva planta de sabor dulce: Refinación del esteviósido y determinación de su concentración [China]. Planta Physiol. Comun. 3, 15 - 17.
- Bidwell, R.G. 1990. Fisiología Vegetal. AGT Editor, S.A. México, D.F. 784.
- Boeckh, E. M. A. (1986). Bertoni: Evaluación clínica de su acción aguda sobre los parámetros cardiocirculatorios, metabólicos y electrolíticos en 60 sujetos sanos. "Tercer Seminario Brasileño sobre Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni (Resúmenes), pp. 23.
- Bondarev, N.I., N.A. M., y K.A. V. Efectos de reguladores de crecimiento exógenos en callusogenesis y crecimiento de células cultivadas de Stevia Rebaudiana Bertoni. Revista rusa de fitobiología, 1998. 45 (6): p. 770-774.
- Bonilla C., Carmen R.; Sánchez O., Manuel S. y Perlaza, Diego F. 2007. Evaluación de métodos de propagación, fertilización nitrogenada y fenología de stevia en condiciones del Valle del Cauca. Acta Agronómica vol. 56 (3): 131-134.
- Borie, K. B. (2000). Sweet Stevia: Edulcorante no calórico de la naturaleza: Una hoja. . . O dos. Asociación Nacional de Jardinería. [Http://doityourself.com](http://doityourself.com).
- BRADFORD KJ, NONOGAKI H. Seed development, dormancy and germination. First edition. Oxford, Blackwell publishing; 2007. p. 224-247

- Brandle, J. E., Starratt, A. N., y Gijzen, M. (1998a). Stevia rebaudiana: Sus propiedades agrícolas, biológicas y químicas. Poder. J. Plant Sci. 78, 527 - 536.
- Brandle, J.S.A.G.M., (1998b) Stevia rebaudiana: Sus propiedades agrícolas, biológicas y químicas [Revisión]. Canadian Journal of Plant Science, 78 (4): p. 527 - 536.
- Brandle, J.E. y N. Rosa, (1992) - Heredabilidad para el rendimiento, relación hoja: tallo y contenido de esteviósido estimado a partir de un cultivar landrace de Stevia rebaudiana. Canadian Journal of Plant Science, 72 (4): p. 1263-1266.
- Brandle, J., (1999) control genético de la concentración de rebaudiosido A y C en las hojas de la hierba dulce, Stevia rebaudiana. Canadian Journal of Plant Science, 1999. 79 (1): p. 85-92
- Brandle, Jim. 2005. Stevia, edulcorante natural bajo en calorías de la naturaleza. Es: [http://res2.agr.ca/London/faq/stevia\\_e.htm](http://res2.agr.ca/London/faq/stevia_e.htm); Consulta: junio 2005.
- Brandle, J. E., Starratt A. N., y Gijzen M. 2000. Stevia rebaudiana: sus propiedades biológicas, químicas y agrícolas. Consulta: Junio 2000: [http://res2.agr.ca/london/pmrc/faq/stevia\\_rev.html](http://res2.agr.ca/london/pmrc/faq/stevia_rev.html).
- Brian P.W., Grove J.F., 1957. El ácido giberélico. Endeavour. 17 (63) pp. 161-171.
- Bywater, M., 2001. "Reguladores del crecimiento de las plantas. Modo de acción. Australian Turfgrass Management. [http://www.agc.sa.com.au/static/atm\\_articles/html/3\\_3c.html](http://www.agc.sa.com.au/static/atm_articles/html/3_3c.html). Accesado: 20 / Sep / 2011.
- Cabrera, A., Holmes, W., y McDaniel, S. (1996). Compositae III. En " Flora del Paraguay, 25 Conservatorio y jardín botánico de la Ciudad de Geneve- Jardín Botánico de Missouri " (R. Spichiger y L. Ramella, Eds.), Pp. 302-306. Koeltz Scientific Books, Koenigstein, Alemania.
- Camacho, M. F. 1994. Dormición de semillas, causas y tratamientos. TRILLAS, S. A. de C. V. México, D. F. pp. 9-60
- Campusano Carolina, Echeverri Verónica, Dueñas Luisa y Niño Camilo, 2009 Nuevas oportunidades para la Stevia, Proexport Colombia Tendencias Internacionales<[www.proexport.gov.co](http://www.proexport.gov.co)>.

- Carneiro, J.W.P., (1996a) - Influencia del número de semillas en la evaluación del rendimiento de la germinación en *Stevia rebaudiana*. *Revista Brasileira de Sementes.*, 18 (1): p. 1-5.
- Carneiro, J. W.P., Muniz, A.S., y Guedes, T.A. (1997b). Producción de plantas de lecho de invernadero de *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni. *Poder. J. Plant Sci.* 77, 473 - 474. Carvalho, M. A. M., de Zaidan, L. B. P. y De Carvalho, M. A. M. (1995). Propagación de *Stevia rebaudiana* a partir de estacas de tallos. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 30, 201-206.
- Carvalho, M.A.M.d. y L.B.P. Zaidan, (1995)- Propagación de *Stevia rebaudiana* a partir de esquejes de tallo. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira.*, 30 (2): p. 201-206.
- Cassacia J. y Álvarez E. (2006a). Recomendaciones técnicas para una producción sustentable del ka"á he"é (*Stevia rebaudiana* (Bertoni)) en el Paraguay. Ministerio de Agricultura y Ganadería-Paraguay, Manual Técnico N°8, 51 p.
- Cassacia Javier y Alvarez Edgar, 2006b, Caacupe Ministerio de Agricultura y Ganadería, Dirección de investigación Agrícola, Instituto Agronómico Nacional, Programa de investigación de Ka'á He'é, Manual técnico No. 8 Paraguay.
- Cerana, M., 2004. Morfología de las flores y polinización en *Mikania* (Asteraceae). *Flora*, 199: 168-177.
- Chalapathi, M. V. (1996). Métodos de siembra, fertilización, racionamiento y estandarización de técnicas de propagación vegetativa en estevia. [M.Sc. (Ag) Tesis], UAS, Bangalore, India.
- Chalapathi, M. V., Thimmegowda, S., Rama Krishna Prama, V. R. y Prasad, T. G. (1997b). Edulcorante no calórico natural (*Stevia rebaudiana* Bertoni): Una cosecha futura de la India. *Crop Res.* 14, 347 - 350.
- Chalapathi, M.V., B. - Shivaraj, y V.R.R. (1997) - Parama, - La absorción de nutrientes y el rendimiento de la stevia están influenciados por los métodos de siembra y los niveles de fertilizantes. *Crop Research*, 14 (2): p. 205-208.
- Chan P, Tomlinson B, Chen YJ, Liu JC, Hsieh MH y Cheng JT, 2000, A double-blind placebo controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension, Division of Cardiovascular medicine,

- Taiwan, *Revista British Journal of Clinical Pharmacology*, Septiembre 50 (3): 215-20.
- Chan P, Xu DY, Liu JC, Chen YJ, Tomlinson B, Huang WP y Cheng JT, 2008 The effect of stevioside on blood pressure and plasma catecholamines in spontaneously hypertensive rats, 1998, Division of Cardiovascular Medicine, Taipei Medical College Hospital and affiliated Taipei Wan Fang Hospital, Taiwan, ROC, *Journal Life Science*, 1998; 63 (19): 1679-84.
- Chang, K.F., R.J. Howard y R.G. Gaudiel, - Primer informe de la stevia como huésped de *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, 1997. 81 (3).
- Chatsudthipong V y Munprasat C, 2009, Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness, Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand *Revista Pharmacology and Therapeutics.*, Enero; 121(1):41-54.
- Chen J, Jeppesen PB, Nordentoft I y Hermansen K, 2006 Stevioside counteracts the glyburide-induced desensitization of the pancreatic beta-cell function in mice: studies in vitro, *Metabolism*. Dec; 55(12):1674-80.
- Chen TH, Chen SC, Chan P, Chu YL, Yang HY y Cheng JT, 2005, Mechanism of the hypoglycemic effect of stevioside, a glycoside of *Stevia rebaudiana*, *Planta Médica*, 71(2):108-13.
- Chen, K. y Chang, T. R. (1978). Estudios sobre la clasificación de cepas y constituyentes de *Stevia rebaudiana*. I. Investigación de cepas de stevia. *Memorias del Colegio de Agricultura, Universidad Nacional de Taiwan* 18, 36-46.
- Chen, K., Chang, T.R., y Chen, S.T. (1978). Estudios sobre el cultivo de estevia y la variación estacional del esteviósido. *China Gartenbau* 24, 34-42.
- Chen, S. y S. Shu, (1995) - Estudio sobre la técnica de almacenamiento de la semilla de *Stevia rebaudiana*. *Acta Agronomica Sinica*, 21 (1): p. 102-105.
- Chu, C.H., y Cheng, T.C. (1976). Informe preliminar de la cultura de la stevia en Taiwán. Documento Científico No. R2-181 del Taiwan Sugar Research Institute 74, 1-13.
- Coello, C.Y., C.L. Miceli, C. Orantes, L. Dendooven y F.A. Gutiérrez, 2010. Optimización de reguladores de crecimiento para el cultivo in vitro de la

- orquídea *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier & W.E. Higgins". *Gayana Bot.*, 67: 19-26.
- Colombus, M., *El Cultivo de Stevia*, "Edulcorante de la Naturaleza", 1997, QMAFRA: Ontario Canadá.
- Columbus, M., *The Cultivation of Stevia*, "Nature's Sweetener", 1997, OMAFRA: Ontario, Canadá, p.4.
- Constantinovici, D. y D. - Cachita-Cosma, - Aspectos de la multiplicación in vitro en *Stevia rebaudiana*. *Cercetari Agronomice en Moldova*, 1997. 30 (4): p. 80-86
- Coopeland LO, McDonald MB (1995) *Principios de ciencia y tecnología de semillas*. Kluwer Academic Publishing Tercera edición, Massachusetts, EE. UU. Pp 59-111
- Corbet, S.A., Williams, I.H., Osborne, J.L., 1991. Las abejas y la polinización de cultivos y flores silvestres en la Comunidad Europea. *Bee World*, 72: 47-59. Crecimiento de células cultivadas de *Stevia Rebaudiana* Bertoni. *Revista rusa de fitobiología*, 1998. 45 (6): p. 770-774.
- Das, K., R. Dang, T.N. Shivananda y N. Sekeroglu. 2007. Influence of biofertilizer on the biomass yield and nutrient content in *Stevia* (*Steviarebaudiana*. Bert) grown in Indian subtropics. *Journal of Medicinal Plants Research*.01 (01), 005-008.
- De Masson, D.A., 2005. "Interacciones de auxina-citoquinina y auxina-giberelina durante la morfogénesis de las hojas compuestas de guisante (*Pisum sativum*)". *Planta*, 22: 151-166.
- De Paula D. C., Simanca S. M., Pastrana P. Y. I., Carmona B. A. y Lombana G. G. 2010. Condiciones de utilización del esteviósido en la elaboración de mermelada de guayaba dulce (*Psidium guajava* L.). *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Núm. 21: 1-12.
- Deiningner, R., - Nuevas sustancias edulcorantes naturales. [Alemania]. *Gordian*. 1974. 74: 4, 1974. 146 (148).
- Delaplane, K.S., Mayer, D.F., 2000. *Polinización de cultivos por las abejas*. CAB International, Oxon, Reino Unido, pp. 344.
- Donalísio, M.G., Duarte, F.R., y Souza, C.J. (1982). *Estevia (Stevia rebaudiana)*. *Agronomico, Campinas (Brasil)*, 34, 65-68.

- Duke, J. (1993). *Stevia rebaudiana* (Bert.). En "CRC Handbook of Alternative Cash Crops" (J. Duke, Ed.), Páginas 422 - 424. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Dwivedi, R. S. (1999). Especies de plantas no sacaríferas dulces no cultivadas y sin explotar en la India. *Ciencia actual* 76, 1454 - 1461.
- Dzyuba, O. O. (1998). *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsley: Una nueva fuente de azúcar natural sustituto de Rusia. *Rastitel'nye Resursy* 34, 86-95.
- Eafit, Escuela de Administración y Finanzas. 2004. Inteligencia de mercados internacionales de *S. rebaudiana*. Departamento de Negocios Internacionales, Medellín, Colombia.
- EGLEY, HG. Y DUKE, S, O., (1985) fisiología de la latencia y la germinación de las malas hierbas. En: *Fisiología de malezas*. Boca Raton, EE. UU. C.R.C., 1985. P. 31-74.
- Elkins, R. M. H. (1997). *Stevia: Edulcorante de la naturaleza*. Woodland PUB., Pleasant Grove, UT.
- Elton-Johnson, D.R., *Stevioside, 'Naturalmente'!*,. 1990, El Consejo de Control de Calorías: Tuscon, Arizona. pag. 5.
- FAO, OMS, 2005, Tema 9 del programa Conferencia Regional FAO/OMS sobre Inocuidad de los Alimentos para las Américas y el Caribe, San José Costa Rica, 6 9 Diciembre.
- Felippe, G.M. 1971. *Stevia rebaudiana* Bert.: uma revisao. *Ciencia e Cultura* 29 (11) 1240-1248. II Seminario Brasileiro sobre *Stevia rebaudiana* (Bert.).Bertoni Resumos ITAL Campinas 9/82. Instituto de Tecnología de Alimentos, Sao Paulo.
- Felippe, G.M., - *Stevia rebaudiana*, una revisión. [Portugués]. *Journal of Chromatography*, 1978. 161: pág. 403 - 405.
- Fenner M 2000. *Produce la ecología de la regeneración en las comunidades de plantas*. Segunda edicion. Nueva York, publicación de CABI. 410 pp
- Ferreira C. & Handro W. 1988a. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* through leaf explants from adult plants. *Plant medic* 54(2): 157-160.
- Ferreira, C.M. y W. Handro, 1988b - Producción, mantenimiento y regeneración de plantas a partir de cultivos de *Stevia rebaudiana* en suspensión celular. *Plant Cell Reports*, 1988. 7 (2): p. 123-126.



- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G (2006) Latencia de las semillas y el control de la germinación. *Nueva Phytologist* 171, 501-523
- Flores, H. A. 2004. Introducción a la tecnología de las semillas. 1a edición. Departamento de publicaciones de la dirección general de difusión cultural y servicios de la UACH. México. P.61-78. Foro Investigación UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Fors, A.L., (1995) - Un nuevo carácter en el escenario edulcorante. *Sugar Journal*, 58 (2): p. 30.
- Fronza D., Folegatti M.V., 2003. Wáter consumption of the estevia (*Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni) crop estimated through microlysimiter. *Scientia Agricola*, 60 (3):8.
- Garay, E.A., Preton P. Rosales, y Landivar J. 1992. Desarrollo de semillas, el novedoso enfoque en Bolivia. Editorial, centro internacional de agricultura tropical. (CIAT)Bolivia.
- García, F. A., Montes, H. S. y Rangel, L. A. 2004. Calidad fisiológica de la semilla de chile piquín (*capsicum annum* var. *aviculare*) de dos localidades de Querétaro (Ver [http://www.worldpepper.org/wpc2004/memorias2004/49\\_garcia\\_federico\\_wpc2004.pdf](http://www.worldpepper.org/wpc2004/memorias2004/49_garcia_federico_wpc2004.pdf))
- Gardana C., Scaglianti M. y Simonetti P. 2010. Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra high performance liquid chromatographymass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217(9) ,1463-70.
- Gattoni L. A. 1945. Caa-Jhee A wild shrub native to Paraguay (*Stevia rebaudiana* Bert.) September. Typed Material. STICA, Paraguay.
- George, E. F. 1993. Plant propagation by tissue culture Part 1: The Technology. 2ed. England. Exegetics Ltda. 574 p.
- Geuns J. M. C. 2003. Molecules of interest stevioside. *Phytochemistry*. 6. 913-921. Geuns, J. M. 2003. Stevioside. *Phytochemistry*. 64, 913-921.
- Geuns, J. M. 2003. Stevioside. *Phytochemistry* 64, 913 - 921.
- Ghanta S, Banerjee A, Poddar A y Chattopadhyay S, 2007 Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), a natural sweetener, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,

- Giannuzzi, L. y Molina, O. S. E. 1995. Edulcorantes naturales y sintéticos: Aplicaciones y aspectos toxicológicos. *Acta Farm. Bonaerense* 14 (2): 119-131.
- Goenadi, D.H. 1983. Tensión y fertilización del agua de *Stevia rebaudiana* en suelos tropicales oxidados. *Menara Perkebunan* 51, 85 - 90.
- Goenadi, D.H., - Efecto del estiércol de granja, NPK y fertilizantes orgánicos líquidos en *Stevia rebaudiana*. *Menara Perkebunan*, 1985. 53 (2): p. 29-34.
- Goenadi, D.H., - Efecto del estiércol de granja, NPK y fertilizantes orgánicos líquidos en *Stevia rebaudiana*. *Menara Perkebunan*, 53 (2): p. 29-34.
- Goenadi, D.H., (1985). - La tensión del agua y la fertilización de la *Stevia rebaudiana* en suelo oxic tropudalf. *Menara Perkebunan*, 1983. 51 (4): p. 85-90.
- Goettemoeller, J., y Ching, A. (1999). Germinación de semillas en *Stevia rebaudiana*. En "Perspectives on new crops and new uses" (J. Janick, Ed.), Pp. 510-511. ASHS Press, Alexandria, VA.
- Goylemoeller, J., y Ching, A. (1999). Germinación de semillas en *Stevia rebaudiana*. pag. 510 511. En: J. Janick (ed.), *Perspectivas sobre nuevos cultivos y nuevos usos*. ASHS Press, Alexandria, VA. [www.lni.unipi.it/stevia/stevia/v4-510.htm](http://www.lni.unipi.it/stevia/stevia/v4-510.htm)
- Grashoff, J.L., (1972). Un Estudio Sistemático de las Especies Norte y Centroamericana de *Stevia*, La Universidad de Texas en Austin. pag. 00624.
- Gregersen, S. P. Jeppesen; J. Holst y K. Hermansen. 2004. Efectos antihiper glucémicos del esteviósido en sujetos diabéticos de tipo 2. *Metab. Clin. Exp.* 53, 73 - 76.
- Gvasaliya, V. P., Kovalenko, N. V., y Garguliya, M. Ch. (1990). Estudios sobre la posibilidad de cultivar hierba de miel en las condiciones de Abjasia. *Subtropcheskie Kultury* 5, 149-156.
- Hallstrom, H., 1985.- Algunos agentes edulcorantes menos comunes de las plantas. [Sueco]. *Var Foda*, 37: p. 9-10.
- Handro, W., C.M. Ferreira y E.I.S. Floh, 1993 - Variabilidad cromosómica y tasa de crecimiento en cultivos de suspensión celular de *Stevia rebaudiana*. *Plant Science*, 93: p. 1-2.

- Hartley, C.W.S. 1993. La palma de aceite. C.E.C.S.A., Mexico, p.181-191.
- Hartmann H. and Kester D. 1998. Propagación de las plantas. 6ta. Ed. C.E.C.S.A., México. 700p.
- Hartmann, H. Y Kester, D. 1982 propagación de plantas. México D.F. compañía editorial continental, S.A de C.V. p.46.
- Hatano, T., *et al.*, - Estudios sobre la capacidad de exceso de tolerancia a la humedad de Stevia. Informe de la Rama Tokai de Crop Science Society of Japan, 1994.
- Hein, L., 2009. El valor económico del servicio de polinización, una revisión a través de escalas. *The Open Ecology Journal*, 2: 74-82.
- Hernández, L.R., Catalán, C.A.N., Joseph-Nathan P. 1998. La Química del Género Stevia (Asteraceae). *Rev. Acad. Colomb. Cieñ. Ex. Fís. Nat.* 1998, 22, 229.279.
- Hoyle, F. C. (1992). Una revisión de cuatro nuevos cultivos potenciales para la agricultura australiana, p. 34. Departamento de Agricultura, Perth.
- Hoyle, F.C., 1992 Una revisión de cuatro nuevos cultivos potenciales para la agricultura australiana, Departamento de Agricultura: Perth. pag. 34. <http://www.growmorebiotech.com/article1>.
- Ikan, R., *et al.*, 1993. Glucósidos naturales como potenciales olores y saborizantes. *Acta Horticultura*, 1993 (344): pág. 17-28.
- Ikuma, H. y K.V. Thimann, 1963. "Acción de la Kinetina sobre la germinación fotosensible de la semilla de lechuga en comparación con la del ácido giberélico". *Plant Cell Physiol.*, 4: 113 - 128.
- Ingrouille, M., Eddie, B., 2006. *Plantas: Evolución y diversidad*. Cambridge University, Press, Nueva York.
- Isagi, Y., 2011. Importancia del genotipado de polen único en la investigación ecológica. En: Y. Isagi e Y. Suyama (eds.), *Genotipado de polen único (Capítulo 1)*, Monografías de investigación ecológica, 1-6. DOI 10.1007 / 978-4-431-53901-8\_1.
- Ishiba, C., T. - Yokoyama y T. - Tani, 1982a. - Enfermedad de la mancha foliar de la stevia causada por *Septoria*. *Anales de la Sociedad Fitopatológica de Japón*, 48 (1): p. 34-43.

- Ishiba, C., T. - Yokoyama y T. - Tani, 1982b. - Enfermedad de mancha negra de la stevia causada por *Alternaria*. Anales de la Sociedad Fitopatológica de Japón, 1982. 48 (1): p. 44-51.
- Jaramillo, V. A. 2009. Stevia: Producción y Procesamiento de un Endulzante Alternativo. Tesis de Grado. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.
- Jarma A., 2008. Estudios de adaptación y manejo integrado de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.): nueva alternativa agroindustrial del Caribe colombiano. Una revisión. Rev Colomb Cienc Hortic. 2008; 2(1):109-120.
- Jarma O., A. de J.; Combatt C., E. M.; Cleves L., J. A. 2010. Aspectos nutricionales y metabolismo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Una revisión. Agronomía Colombiana, 28(2): 199-208.
- Jenet A. 1996. Die Substoffpflanze *Stevia rebaudiana* Bert. 81p.
- Jeppesen PB, Gregersen S, Alstrup KK y Hermansen K, 2002, Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucagonostatic effects in vivo: studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. Department of Endocrinology and Metabolism C, Aarhus University Hospital, Denmark. Revista Phytomedicine, Enero; 9(1):9-14.
- Jia, G. N. (1984). Un experimento sobre el cultivo de *Stevia rebaudiana* (Bert.). Shanxi Ciencia de la Agricultura Shanxi Nongye Kexue 1, 20-21.
- Jiménez, M.A. 1990. Semillas forrajeras para siembra. Análisis de su calidad, estándares y densidades. Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco.
- 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. Estudio preliminar. Instituto Nacional de Tecnología y Normalización (INTN). Asunción-Paraguay e Instituto Agronómico Nacional (IAN). Caacupé Paraguay. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud, Vol. 8(1) Junio 2010: 47-53.
- JONES, R. L. y MACMILLAN, J. gibberellins. Y: JONES, R. L y MackMilla, J. 1984. Fisiología avanzada de las plantas. Nueva York: John Willey and Sons, 1984. P 21-52

- Jordán Molero Francisco. 1983. La propagación de ka'a he'e, Stevia rebaudiana Bertoni. Primer Simposio Nacional de la Stevia (ka'a he'e) Julio 1983, Asunción, Paraguay, 29 p.
- Kang, K.H. Y E. W. Lee, 1981. Estudios fitoecológicos sobre la estevia como nuevo edulcorante, República de Corea. Revista de la Sociedad Coreana de Ciencia de Cultivos, 26 (1 Mar 30 1981): p. 69-89.
- Karszen, C.M., S. Zagorski, J. Kepczynski y S.P.C. Groot, 1989. Papel clave de las giberelinas endógenas en el control de la germinación de las semillas. Ana. De Bot., 63: 71-80.
- Katayama, O., Sumida, T., Hayashi, H., y Mitsuhashi, H. (1976). " La Aplicación Práctica de la Stevia y los datos R y D ", pág. 747. ISU Co., Japón.
- Kawatani, T., Y. Kaneki, y T. Tanabe, 1977. El cultivo de kaa he-e (Stevia rebaudiana). II Germinación de semillas con especial referencia a la temperatura óptima y la sensibilidad a la luz. Japanese Journal of Tropical Agriculture, 1977. 20 (3): p. 137 142.
- KHAN, A. A. 1977. La fisiología y la bioquímica de la dormancia y la germinación de la semilla. En: Fisiología avanzada de plantas. Nueva York: John Wiley and Sons, 1977. P.45
- Kinghorn, A. D., y Soejarto, D. D. (1985). Estado actual del estevióside como agente edulcorante para uso humano. In (H. Wagner, H. Hikino y N. R. Farnsworth, Eds.), Págs. 1-51. Academic Press, Nueva York.
- Klein, A.M., Müller, C., Hoehn, P., Kremen, C., 2009. Comprender el papel de la riqueza de especies para los servicios de polinización de cultivos, en: S. Naeem, D.E. Bunker, A. Hector, M. Loreau, C. Perrings, (ed.), Biodiversidad, funcionamiento del ecosistema y bienestar humano: una perspectiva ecológica y económica, Oxford University Press, pp. 195 208.
- Kornienko, A.V., *et al.*, 1995. Cultivo de Stevia. [Ruso]. Sakharnaya Svekla, 1995 (10): p. 22-24.
- Kornilova, O.V. y E.A. 1996. Kalashnikova, - Micropropagación clonal de stevia. Izvestiya Timiryazevskoi Sel'Skokhozyaistvennoi Akademii, 1996: p. 1
- Kumar, R., Sharma, S., 2012. Effect of light and temperature on seed germination of important medicinal and aromatic plants in north western Himalayas. International Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 2(3): 468-475.

- Lee, J.I., K.H. - Kang y E.U. - Lee, - Estudios sobre la nueva planta de origen edulcorante stevia (*Stevia rebaudiana*) en Corea. I. Efectos de las fechas de trasplante, toma de esquejes y siembra en las características de crecimiento y rendimiento de hojas secas, [Corea]. Informes de investigación de la Oficina de Desarrollo Rural, Crop, 1979. 21: p. 21.
- Lester, T. (1999). *Stevia rebaudiana*. Hoja dulce. El Boletín Australiano de Nuevos Cultivos 11, 1.
- Levitus G., Echenique V., Rubinstein C., Hopp E., Mroginski A. 2010. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Consejo Argentino para la Información el Desarrollo de la Biotecnología. Argentina.
- Lewak, S. y A.A. Khan, 1977. Modo de acción del ácido giberélico y luz sobre la semilla de lechuga. *Plant Physiol.*, 60: 575 - 577.
- Lima, G. J. A. 2009. Evaluación del efecto que generan dos procesos de producción de azúcar blanco (proceso blanco directo y proceso blanco cristal) sobre el color del azúcar producida en un ingenio azucarero guatemalteco. Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala. 41 p.
- Lima Filho, O.F.d. y E. Malavolta, 1997 Síntomas de trastornos nutricionales en *Stevia rebaudiana*. *Scientia Agricola*, 54 (1/2): p. 53-61.
- Limo Filho, O.F.d., *et al.*, 1997. Captación y acumulación de nutrientes en *Stevia rebaudiana* I - Macronutrientes. Y II - Micronutrientes. *Scientia Agricola*, 1997. 54 (1/2): p. 14-22, 23-30.
- Liu JC, Kao PK, Chan P, Hsu YH, Hou CC, Lien GS, Hsieh MH y Chen YJ, 2003, Mechanism of antihypertensive effect of stevioside in anesthetized dogs, *Pharmacology*, Jan; 67(1):14-20.
- Lovering, N.M. y R.D. Reeleder, - Primer informe de *Septoria steviae* sobre *Stevia* en América del Norte. *Plant Disease*, 1996. 80 (8).
- Macchia, M., Andolfi, L., Ceccarini, L., Angelini, L.G., 2007. Efectos de la temperatura, la luz y el preenfriamiento en la germinación de la semilla de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni Accessions. *Italian Journal of Agronomy*, 2 (1): 55-62.
- Machacuay C. S., 2007. Elaboración y caracterización de una bebida nutraceutica a base de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), Facultad De

- Ingeniería Y Ciencias Humanas. Escuela Académica Profesional De Ingeniería Agroindustrial. Universidad Nacional Del Centro Del Perú.
- Machado, E., Chagas, A. M., y Reis, D. S. (1986). " Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni en la presión arterial del perro. " Tercer Seminario Brasileño sobre Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni (Resúmenes), p. 11.
- Manitto P. 1981. Biosíntesis de Productos Naturales; Wiley: New York, 1981; Gorra. 1 8.
- Marcavillaca, C. (1985). Micropropogación in vitro de Stevia rebaudiana por medio de segmentos nodales y meristemas Anales de SAIPA, 6, pp. 241-243. Buenos, Argentina.
- Marín Wilmer, 2004, Sondeo del Mercado de estevia, Instituto de Investigación de Recursos biológicos Alexander Von Humboldt, BogotáColombia <minambiente.gov.co>.
- Martelli, A., C. - Frattini, y F. - Chialva, 1985. Aceites esenciales inusuales con propiedades aromáticas. I. Componentes volátiles de Stevia rebaudiana Bertoni. Flavor & Fragrance Journal, 1 (1): p. 3-7.
- Matejka, V., - Requisitos climáticos y posibilidades de cultivo de la hierba Stevia rebaudiana Bertoni en la República Checa. Agricultura Tropica et Subtropica, 1992 (25): p. 21-32.
- Mayer, A.M. y Poljekoff- Mayber, A. 1982. The germination of seeds. Thira. Edition. Pergaman press. Great Britain.
- Mehanna, H. G.C. Martin y C. Nishijima, 1985. "Efectos de la temperatura, los tratamientos químicos y el contenido de hormonas endógenas en la germinación de las semillas de durazno y el posterior crecimiento de las plántulas". Sci. Hort., 27: 63-73.
- Melis, M.S. y A.R. Sainati, - Efecto del calcio y verapamilo en la función renal de ratas durante el tratamiento con esteviósido. Journal of Ethnopharmacology, 1991. 33 (3): p. 257-262.
- Metivier J., and Viana A.M. 1979. The effect of long and short day length upon the growth of whole plants and the level of soluble protiens, sugars and steviosido in leaves of stevia rebaudiana. Journal of Experimental Botany, 1979. 30(119): p. 1211-1222.
- Midmore, D.J., Rank, A.H., 2002. Una nueva industria rural: Stevia para reemplazar edulcorantes químicos importados, publicación web de

- RIRDC, Proyecto No. UCQ-16A.  
<https://rirdc.infoservices.com.au/downloads/W02-022.pdf> (Acceso: 11.01.2013).
- Mishra, P., R. Singh, U. Kumar and V. Prakash, 2010. Stevia Rebaudiana-A magical sweetener. *Global J. Biotech. & Biochem.* 5(1): 62–74.
- Mitsuhashi, H. 1975. Estudios sobre el cultivo de Stevia rebaudiana Bertoni. Determinación de esteviósido. *Yakugaku Zasshi*- 95 (1): 127 - 30.
- Miyagawa, H., Fujikowa, N., Kohda, H., Yamasaki, K., Taniguchi, K. y Tanaka, R (1986). Estudios sobre el cultivo tisular de Stevia rebaudiana y sus componentes: (II). Inducción de primordios de brotes. *Planta Medica* 4, 321 - 324.
- Miyazaki, Y., H. Watanabe y T. Watanabe, 1978. Estudios sobre el cultivo de Stevia rebaudiana bertoni. III Rendimiento y contenido de esteviósido de plantas de 2 años. *Eisi Shikenjo hokoku.*, 1978. 96: p. 86-89.
- Molinas, S., 1989. Fortuna Stevia del Paraguay S.R.L.: Promoción cultivo industrialización y comercialización de la Stevia rebaudiana Bertoni (ka"á he"é). Asunción, Paraguay. 24 p.
- Molina, M.J. Estrada J.A, Livera M. y Gonzales V.A 1990. Análisis de la enseñanza, producción e investigación de semillas de México, sociedad mexicana de fitogenetica. Chapingo, México.
- Monteiro, R. (1980). Flora biológica de Stevia rebaudiana Tese de Mestrado, Univ. Est. De Campinas, Brasil.
- Monteiro, R., 1980. Taxonomía y biología de la reproducción de Stevia rebaudiana Bert. Tesis, Univ. Estadual de Campinas.
- Monteiro, R. 1982. Estudios taxonómicos en Stevia série Multiaristatae no Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 5: 5-15.
- MOORE, T. C., 1979. *Biochemistry and physiology of plant hormones*. New York: Springer-Verlag, 1979. p. 90-146.
- Moreira A, Gómez A, Duarte A, Coser C, Mendonça L, Souza L, Maia N, Duarte-da Silva P, Vale R (1992) Regras para análise de sementes. Ministerio de agricultura e reforma agrária. Brasilia-D.F. 365pp
- Moreno Casasola, Patricia, 1996, Vida y obra de granos y semillas. FONDO DE CULTURA ECONÓMICA, México, D.F. (Ver: <http://biblioteca>



digital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/146/htm/vidayob.htm

)

- Moreno, M. E. 1996. Análisis físico y biológico de semillas. 3a ed. UNAM. México. P. 113-122.
- Munguía-Rosas, M.A., Ollerton, J., Parra-Tabla, V., 2011. Selección fenotípica sobre fenología de floración y tamaño en dos especies de plantas dioicas con diferentes vectores de polen. *Plant Species Biology*, 26: 205-212.
- Muñoz, S. 2008. Dulzura y Poder: El lugar del azúcar en la historia moderna. *Revista de Estudios Sociales*, ISSN 0123 -885X. Jan/ Apr. 2008, No. 29: 172-175.
- Nakamura, S. E Y. - Tamura, 1985.- Variación en los principales glucósidos de la stevia. *Japanese Journal of Tropical Agriculture*, 1985. 29 (2): p. 109-115.
- Nepovim A., Drahosova H., Valicek P. y Vanek T. 1998a. The effect of cultivation conditions on the content of stevioside in *Stevia rebaudiana* Bertoni plants cultivated in the Czech Republic. *Pharmaceut Pharmacol Lett.* 8, 19-21.
- Nepovim, A.V.T., 1998b. Propagación in vitro de plantas de *Stevia rebaudiana* usando cultivo de brotes múltiples. *Planta Médica*, 1998. 64 (8): p. 775-776.
- Nishiyama, P., M. Alvarez y L.G.E. Vieira, 1991. - Determinación de niveles de esteviósido e hidratos de carbono solubles en agua en hojas de *Stevia rebaudiana* por espectroscopía de reflectancia de infrarrojo cercano. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 1991. 34 (2): p. 361-374.
- Nomiya H 2010. Diferenciación de los rasgos de germinación de la semilla en relación con los hábitats naturales de tres especies de *Ulmus* en Japón. *Revista de Investigación Forestal* 15,123-130
- Oddone, B., *Cómo crecer Stevia*. 1999, Guarani Botanicals, Inc. Pawcatuck, Connecticut. Pag. 1-30
- Ogawa, M.A., Y. Hanada, A. Yamauchi; Y. Kuwahara; Y. Kamiya y S. Yamaguchi, 2003. "Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination". *Plant Cell*, 15: 1591-1604.

- Olivier, F.C., Annandale, J.G., 1998. Requisitos de tiempo térmico para el desarrollo de guisante verde (*Pisum sativum* L.). *Field Crops Research*, 56 (3): 301-307.
- Orozco C. C., 2004. Situación actual de la biotecnología en Guatemala. Consejo nacional de Áreas Protegidas –CONAP. Guatemala.
- Oviedo, C. A., Fronciani, G., Moreo, R., y Mass, L. L. 1970. Acción hipoglucémica de *Stevia rebaudiana* Bertoni (Kaa-he-e). *Excerpta Médica* 209, 92.p. 119-123.
- Paalhaar, J., Boot, W.J., Van Der Steen, J.J.M., Calis, J.N.M., 2008. In-hive pollen transfer between bees enhances cross-pollination of plants. *Proceedings of the section Experimental and Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society*, 19: 53-58.
- Parra R., 2002. El chile (Ver <http://www.biologia-en-internet.com/default.asp?id=4&Fs=2>)
- Pierik R. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Trad. Por Luis Ayerbe Mateo- Sagasta. 3 ed. Madrid, España, Mundi-Prensa. 325p.
- Piheiro, C. E., y Gasparini, O. T. (1981). Abstr. Pap., Semin. Bras. *Stevia rebaudiana*, 1ª, pp. XV.I-XV.IV.
- Pourreza, J., Bahrani, A., 2012. Estimar las temperaturas cardinales de la germinación de semillas de cardo mariano (*Sylibum marianum*). *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 12 (11): 1485-1489. *Rabaudiana* (Bert.) Bertoni e o esteviosideo. *Ciencia e Cultura* 34(2) Fevereiro de 1982. 235- 248.
- Probert RJ 2010 El papel de la temperatura en la regulación de la dormancia y la germinación de las semillas. Capítulo 11. En: Fenner M. *Seeds la ecología de la regeneración en las comunidades de plantas*. Segunda edición. CABI Publishing. Wallingford U.K. 261-292 pp.
- Ramesh K., Singh V., y Megeji N. W. 2006. Cultivo de stevia [*Stevia rebaudiana* (bert.) Bertoni]: Una revisión exhaustiva. Es: *Avances en Agronomía* Vol. 89. 360 p. Academic Press. San Diego, California-Estados Unidos.
- Ramírez M. C. Pozo y L. A. Rodríguez. 2003. Tecnología para inducir la germinación en chile piquín. Memoria del primer Simposio Regional de Chile piquín: *Avances de Investigación en Tecnología de Producción y*

- Uso Racional del Recurso Silvestre. INIFAP-CIRNE. Campo experimental Río Bravo. Publicación Especial Núm. 26. México. Pp. 35-36.
- Raskovic A, Gavrilovic M, Jakovljevic V y Sabo J, 2004, Glucose concentration in the blood of intact and alloxan-treated mice after pretreatment with commercial preparations of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 2004 Apr- Jun; 29(2):87-90.
- Roberts, E.H., 1988. Temperatura y germinación de la semilla. En: S.P. Long, F.I. Woodward (Eds), *Plantas y temperatura*, Simposios de la Society of Experimental Biology, Cambridge, 42: 109-132.
- Rojas Garcidueñas, M. 1987. Control hormonal del desarrollo de las plantas. LIMUSA. México. pp. 20, 21
- Ruiz A, Cardona J, Carrillo MP, Hernández MS, Barrera J, Martínez O, Fernández Trujillo JP (2010) Comportamiento poscosecha de tres ecotipos de cocona durante el almacenamiento a baja temperatura. XXVIII Congreso Internacional ISHS. Lisboa, Portugal (en prensa)
- Ruiz, O.M 1993. *Tratado elemental de botánica* decimal quinta edición.
- Russo VM, Bruton VD, Sams CE 2010 Clasificación de la respuesta de temperatura en la germinación de Brassicas. *Cultivos y productos industriales* 31, 48-51
- Sakaguchi, M., y Kan, T. 1982. As pesquisas japonesas com *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni e o esteviósido. *Ciencia e Cultura (Sao Oaulo)* 34, 235-248.
- Sakaguchi, Mixue e Tatsuiko Kan. 1982. As pesquisas japonesas com *Stevia*
- Salisbury, F.B. y Ross, C.W. 1994. *Fisiología vegetal*. Ed. por grupo Editorial Iberoamericana, S.A de C.V.Mexico.p.647-649.
- Samaniego Cruz, E., M. R. Quezada Martin, M. De La Rosa Ibarra, J. Murguía López, A. Benavides Mendoza, L. Ibarra Jiménez. 2002. Producción de plántulas de tomate y pimiento con cubiertas de polietileno reflejante para disminuir la temperatura en invernadero. *Agrociencia Volumen* 36, Número 3, Mayo-Junio.
- Santamarina Siurana, Ma. Pilar, García Breijo, Francisco José, Roselló Caselles, Josefa y Vilella Fayos, Vicente (1997). *Biología y Botánica (Tomo I)*.

- Parte III, Tema 14, 16 y 17. Servicio de Publicaciones de la Universidad Politécnica de Valencia. (Ver <http://www.euita.upv.es./varios/biologia/programa.htm#Parte%20III:%20Fisiología%20Vegeal>)
- Saxena, N. C., y Ming, L. S. (1988). Características preliminares de la cosecha de la stevia. *Phys. Prop. Agric. Mar. Prod.* 3, 299 - 303.
- Schmeling, A. (1967). Natural sin calorías Edulcorante. *Centro de Investigación de Stevia XXIX*, 5.
- Schwebel, René. 2005. Stevia, el edulcorante natural sudamericano con cero calorías. En: [http://www.geocities.com/schwebel\\_rene/](http://www.geocities.com/schwebel_rene/).
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. 2003. Informe de Productos Regionales: Azúcar. Argentina.
- Shaffert, E.E. y A.A. Chebotar '1994. - Desarrollo del gametofito femenino en *Stevia rebaudiana*, después de su introducción en la costa sur de Crimea. [Ruso]. *Buletinul Academiei de Stiinte a Republicii Moldova Stiinte Biologice Si Chimice*, 2: p. 3-9.
- Sharma, M.L., 1976. Interacción del potencial hídrico y los efectos de la temperatura sobre la germinación de tres especies de plantas semiáridas. *Agronomy Journal*, 68 (2): 390-394.
- Sheu, B.W., F. Tamai, y. Motoda, 1987. Efectos del boro en el crecimiento, rendimiento y contenido de Stevioside y Rebaudioside-A de *Stevia rebaudiana*. - *Revista de Ciencias Agrícolas*, Japón. 1987. 31 (4).
- Shock, C. C., 1982.- *Stevia de Rebaudi: edulcorantes naturales no calóricos*. *Agricultura de California*, 1982. 36 (9): p. 4 - 5.
- Shock, C.C. 1982. Cultivo experimental de la stevia de Rebaudi en California. *Univ. California, Davis Agron. Progr. Rep.* 122.
- Shukla S, Metha A, Metha P y Bajpai VK, 2011, Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert, *Experimental and toxicologic pathology: official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Phatologie*.
- ShuPing, C. y S. ShiZhen, 1995. - Estudio sobre la técnica de almacenamiento de la semilla de *Stevia rebaudiana*. *Acta Agronomica Sinica*, 21 (1): p. 102-105.

- Singh, V., y Kaul, V. K. (2005). Stevia rebaudiana para la generación de ingresos. Vigyan Pragati 10-15.
- Siobhan M.B. y P. McCourt, 2003. "Conversación cruzada hormonal en latencia de la semilla". J. Plant Growth Regul., 22: 25-31.
- Slamet, I.H. y S. Tahardi, 1988. El efecto del sombreado y la fertilización nitrogenada sobre la floración de Stevia rebaudiana Bertoni. Menara Perkebunan, 56 (2): p. 34-37
- Soejarto D.D., Kinghorn A.D., Farnsworth N.R., 1982. Potencial edulcorante en los gagentes de origen vegetal. III. Evaluación organoléptica de muestras de herbario de hoja de Stevia para la dulzura. Journal of Natural Products 45, 590 - 599.
- Soejarto, D.D., Compadre, C.M., Medon, P.J., Kamath, S.K., y Kinghorn, A.D. 1983a. Potenciales agentes edulcorantes de origen vegetal. II. Búsqueda en el campo de especies de Stevia de sabor dulce. Econ. Larva del moscardón. 37: 71 - 79.
- Soejarto, D.D., *et al.*, 1983b.- Potenciadores de edulcorantes de origen vegetal. II. Búsqueda de campo para. Botánica Económica, 37 (1): p. 71-79.
- Strauss, S., ¿el edulcorante perfecto? Technology Review, 1995. 98: p. 18-20.
- Suárez E. I., Salgado A. J. 2008. Propagación In Vitro de Stevia rebaudiana Bert. (Asteraceae-Eupatorieae) a través de organogénesis. Universidad de Córdoba, Departamento de Ingeniería Agronómica. Carrera 6 No. 76-103. TEMAS AGRARIOS - Vol. 13:(1) Enero-Junio 2008 (40 –48).
- Suárez Isidro E y Salgado José A, 2008, Propagación in vitro de Stevia rebaudiana Bert. (Asteraceae-Eupatorieae) a través de organogénesis, Revista Temas Agrarios, Universidad de Ciencias Agrícolas, Córdoba, Vol. 13 No 1, pags 40-48, ISSN 0122-7610.
- Suhendi, D., 1989. - Selección en masa de Stevia rebaudiana Bertoni M. Menara Perkebunan, 56 (4): p. 93-95.
- Sumida, T. (1973) Informes sobre la Stevia rebaudiana Bertoni presentada desde Brasil como un nuevo recurso de dulzura en Japón. Publicaciones misceláneas de la Estación Experimental Agrícola Nacional de Hokkaido, No. 2, 69-83 (en japonés, con un texto en inglés más corto).
- Sumida, T., 1980. Estudios sobre Stevia rebaudiana Bertoni como un nuevo cultivo posible para los recursos edulcorantes en Japón. Kenkyu hokoku

- Revista de la Estación Central de Experimentos Agrícolas, Nogyo Shikenjo, 31 (marzo 1980): p. P1 - 71.
- Swanson, S.M., G.B. - Mahady y C.W.W. - Beecher, - biosíntesis de esteviósidos por callo, raíz, brotes y cultivos de raíces. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 1992. 28 (2): p. 151-157.
- Taiariol D. 1995. Propagación vegetativa de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Tesis Ingeniero Agrónomo, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Taiariol, D. R. (2004). Caracterización de la rebaudiana *Stevia* Bert. [Http://www.monografias.com/trabajos13 / Stevia /stevia.html](http://www.monografias.com/trabajos13 / Stevia /stevia.html).
- Taiariol, D. y Molina, N. 2010. Producción de *Stevia rebaudiana* Bertoni (Ka'a He'ê) en Bella Vista (Corrientes). Análisis técnico y económico de una alternativa sustentable. Publicación EEAINTA Bella Vista-Argentina. Serie Técnica N° 37:17 pp.
- Taiz, L. y E. Zeiger. 2002. *Plant physiology*. 3rded. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, MA
- Takahashi, L., E. 1996. - Melges, y J.W.P. - Carneiro, - Rendimiento de germinación de semillas de *Stevia rebaudiana* a diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Sementes*, 18 (1): p. 6-9.
- Takaki M 2001 Nueva propuesta de clasificación de semillas basada en formas de fitocromo en lugar de fotoblastismo. *Revista Brasileira da Fisiologia Vegetal* 13,104-108
- Takahashi, K., Matsuda, M., Ohashi, K., Taniguchi, K., Nakagomi, O., Abe, Y., Mori, S., Sato, N., Okutani, K. y Shigeta, S. (2001). Análisis de la actividad anti-rotavirus del extracto de *Stevia rebaudiana*. *Antiviral Res.* 49, 15 - 24.
- Talon, M., 2000. "Giberelinas". *Fundamentos de Fisiología Vegetal*, Azcon- Bieto y Talón (Eds.) Interamericana-McGraw-Hill. 325-341 pp.
- Tamayo Alvaro, 2009, Transferencia de tecnología, Corpoica, Corporación colombiana de Investigación Agropecuaria, poner autores <[www.corpoica.org.co/Sitioweb/Archivos/Foros/ADJUNTO.pdf](http://www.corpoica.org.co/Sitioweb/Archivos/Foros/ADJUNTO.pdf)>.
- Tamura Y. Nakamura S. Fukui H. Tabata M. 1984. Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni by Stem-tips culture. *Plant cell reports*. Japón. 3:183-185 p.

- Tanaka, O., - Aplicación de la espectrometría de resonancia magnética C-nuclear a estudios estructurales sobre glucósidos: saponinas de *Panax* spp. Y glucósidos dulces naturales. *Yakugaku Zasshi*, 1985. 105 (4): p. 323-351.
- Tateo, F., *et al.*, Contenido de esteviósidos y variabilidad morfológica en una población de *Stevia Rebaudiana* (Bertoni) Bertoni de Paraguay. *Revista Italiana de Ciencias Alimentarias*, 1998. 10 (3): p. 261-267.
- Tateo, F., Mariotti, M., Bononi, M., Lubian, E., Martello, S., y Cornara, L. (1998). Contenido de esteviosidos y variabilidad morfológica en una población de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni de Paraguay. *Italian J. Food Sci.* 10, 261 - 267.
- Taware, A.S., Harke, S.N., Mukadam, D.S., Chavan, A.M., Taware, S.D., 2010. Efecto de diferentes extractos de callos y plántulas de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) sobre la germinación de semillas de algunos cultivos agrícolas. *African Journal of Biotechnology*, 9 (40): 6675-6683.
- Thomson, J. R. 1979. Una introducción a la tecnología de semillas. Editorial, blackie group Zaragoza, España.
- Tigabu, M. y P.C. Oden, 2001. "Efecto de la escarificación, el ácido giberélico y la temperatura sobre la germinación de semillas de dos especies multipropósito de *Albizia* de Etiopía". *Seed Sci. Technol.*, 29: 11-20.
- Tigrero J y Landázuri P, 2009, *Stevia rebaudiana* Bertoni una planta medicinal, IASA, Escuela politécnico del Ejército Departamento de Ciencias de la Vida Carrera de Ciencias Agropecuarias. Boletín técnico edición especial, SBN-978-9978-301-05-0.
- Tirtoboma, 1988. - El efecto de cortar el material y el número de entrenudos sobre el crecimiento y el rendimiento de *Stevia rebaudiana*. *Menara Perkebunan*, 56 (4): p. 96-101.
- Tomita, T., *et al.*, 1997. Actividad bactericida de un extracto de agua caliente fermentada de *Stevia Rebaudiana* Bertoni hacia la *Escherichia Coli* O157-H7 Enterohemorrágica y otras bacterias patógenas transmitidas por alimentos. *Microbiology & Immunology*, 41 (12): p. 1005-1009.
- Totté, N. W. Van den Ende; E. Van Damme; F. Compennolle; I. Baboeuf y J. Geuns. 2003. Clonación y expresión heteróloga de genes tempranos en

- giberelinas y biosíntesis de esteviol vía de fosfato de metileritritol en *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Poder. J. Bot.* 81 (5), 517 - 522.
- Totté, N. Charon, M. Rohmer, F. Compernelle, I. Baboeuf y J. Geuns. 2000. Biosíntesis del steviol diterpenoide, un derivado en tkaureno de *Stevia rebaudiana* Bertoni, a través de la vía del fosfato de metileritritol. *Tetrahedron Letters* 41, 6407 - 6410.
- Ulbricht C, Isaac R, Milkin T, Poole EA, Rusie E, Grimes Serrano JM, Weissner W, Windsor RC y Woods J, 2010, An evidence-based systematic review of stevia by the Natural Standard Research Collaboration, *Cardiovascular and hematological agents in medical chemistry*, Apr; (2): 113-27.
- Utumi, M.M., PH. Pereira, PRG. Fontes, PCR.; Godinho, VD., 1999. Deficiencias de macronutrientes en *Stevia*: síntomas y efectos visuales sobre el crecimiento, la composición química y la producción de esteviósido [portugués]. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 34 (6): p. 1039-1043.
- Valencia, R., N. Pitman, S. León-Yañez & P. M. Jorgensen (eds.). 2000. Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador 2000. Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- Valio, I.F. M., y Rocha, R.F. 1966. Estudio del fotoperiodo y reguladores del crecimiento sobre el crecimiento y floración de *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Jap. J. Crop Sci.* 46, 243 - 248.
- Vargas, R. 1980. Informe sobre el viaje al Japón para observar la producción, comercialización e industrialización de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni Asunción, Julio.
- Vergara C., Jarma A., Polo J. y Pastrana L. 2003. Crecimiento y desarrollo de dos variedades de *Stevia rebaudiana* en tres tipos de suelo del Medio Sinú. p.68. En: *Memorias XXXIII Congreso Anual de Comalfi*. Montería, Colombia
- Villegas, Javier, 2010, gerente de Agroestevia, Ingenio Valdez, entrevista personal. Dirección: Cerecita.
- Wallin Harriet, 2008, *Steviol Glycosides, Chemical and Technical Assessment*, 69th JECFA, FAO.



- WAREING, P. F. and PHILLIPS, 1. D.J. 1986. Growth and differentiation in plants. New York: Pergamon International Library, p. 58-64. Diciembre 26:55(26): 10962-7.
- WEAVER, R. J. 1984. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. México: De Trillas,
- Yabu, M., Takese, M., Toda, K., Tanimoto, K y Yasutake, A. (1977). Estudios sobre esteviósido, natural, edulcorante. Hiroshima Daigaku Shigaku Tasshi 9, 12-17.
- Yadav, A.K., Singh, S., Dhyani, D., Ahuja, P.S., 2011. Una revisión sobre la mejora de la stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. Canadian Journal of Plant Science, 91 (1): 1-27.
- Yang, Y.W. y W.C. Chang, 1979. Neo-formación de la planta de explantes de la hoja de *Stevia*. Taiwán, Instituto de Botánica (Academia Sinica: Informe anual, julio de 1979).
- Yasukawa K, Kitanaka S, Seo S, 2002, Inhibitory effect of stevioside on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin, Biological and pharmaceutical bulletin.
- Yermakov, Y.I. y A.A. - Kochetov, 1996. Especificidades del crecimiento y desarrollo de la stevia. Ciencias Agrícolas Rusas, (1): p. 9-11.
- Zaidan, L. B.P., Dietrich, S.M.C., y Felipe, G. M. (1980). Estudio del fotoperiodo sobre el contenido de flores y esteviósidos en plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Jap. J. Crop Sci. 49, 569 - 574.
- Zevallos, P. y Y. Flores. 2003. Caracterización Morfológica de plántulas de “una de gato” *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Roemer & Schultes), D. C. Y. U. *guianensis* (Aubl.) Gmelin del Bosque Nacional Alexander Von Humboldt. Lima Perú. Ecología Aplicada 2: 41-46.
- Zhao, Y.G., - El efecto de los microelementos en *Stevia rebaudiana*. Zhejiang Agricultural Science, 1985: p.
- Zubenko, V.F., S.V. - Rogovskii y B.D. - Chudnovskii, 1991. Estimulación del enraizamiento de esquejes de *Stevia* y crecimiento de los trasplantes por fitohormonas. Doklady Vsesoyuznoi Ordena Lenina i Ordena Trudovogo Krasnogo Znameni, 2: p. 16 18.

Zubenko, V.F., S.V. - Rogovskii y V.P. - Pedos, - Agentes causantes de enfermedades de Stevia. [Ruso]. Subtropicheskie Kul'Tury, 1990 (5): p. 149-156.

Zubiate, Fredy, R., 2007, Manual de cultivo de la Stevia, Universidad La Molina, Lima, Perú 2007.