

Morfología y micrografía del ka'a he'e, *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, provenientes de cultivares del Departamento de Concepción, Paraguay⁴

Bonifacia Benítez¹, Claudia Pereira¹, Fidelina González¹, Carlos Molinas², Siemens Bertoni³

¹Departamento de Biología. Herbario FACEN. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-Universidad Nacional de Asunción. Campus Universitario, San Lorenzo, Paraguay.

²Departamento de Matemática. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-Universidad Nacional de Asunción. Campus Universitario, San Lorenzo, Paraguay.

³Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Agrarias-Universidad Nacional de Asunción. Campus Universitario, San Lorenzo, Paraguay.

E mail del autor: bbenbert@facen.una.py

⁴Trabajo de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, financiado por el Rectorado de la Universidad Nacional de Asunción durante el año 2009.

Morfología y micrografía del ka'a he'e, *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, provenientes de cultivares del Departamento de Concepción, Paraguay. En este trabajo de investigación, se realizó el análisis morfo-anatómico de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, para lo cual se aplicó los métodos micrográficos aplicados por Carpano & al (1994) y Spegazzini (2007). Así también, se evaluó la variación del tamaño foliar en 50 individuos de muestras provenientes de cultivares del Departamento de Concepción. De la observación de la anatomía foliar, caulinar y radical, se obtuvo la caracterización de los tejidos que forman parte de los órganos evaluados. Aplicando el análisis estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis, se concluyó que existen diferencias significativas ($p < 0.0001$) entre las diferentes plantas tanto para el ancho como así también para el largo de las hojas. Del análisis bivariado sobre ambas variables, se obtuvo que r^2 : 0.66.

Palabras claves: *Stevia rebaudiana* – micrografía - variación foliar

Morphology and micrography of ka'a he'e, *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, cultivars in Conception, Paraguay. In this research work was carried out morphological and anatomical analysis of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni was carried out, for which a micrographic method applied by Carpano & al (1994) and Spegazzini (2007). Also the variation leaf size in 50 individuals from samples from a pool of Concepción was assessed. From observation of the leaf anatomy, cauline and radical, tissue characterizations that are part of the organs evaluated were obtained. Using nonparametric Kruskal-Wallis statistical test, It is concluded that there are significant differences ($p < 0.0001$) between the different plants both for width and length of leaves. From the bivariate analysis on the length and width, it was obtained that r^2 : 0.66.

Key words: *Stevia rebaudiana* – micrography - leaf variation

INTRODUCCION

Los estudios morfológicos y caracteres importantes de las especies, a fin de poder ser utilizados en los procesos de control de calidad de productos vegetales

comercializados en el país.

La especie *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, perteneciente a la familia de las Asteraceae, tiene como epicentro de origen el Paraguay; sin embargo, de acuerdo a Cabrera, Colmes & Mc Daniel (1996), su distribución, además de los Departamentos de Amambay y Concepción, su área natural llega también al Estado de Matto Grosso do Sul, Brasil. Sin embargo actualmente es frecuente observar el cultivo en diferentes localidades del Paraguay Oriental.

A nivel regional, han sido realizados estudios que abarcan aspectos morfo-anatómicos principalmente sobre la estructura foliar, en el que se han identificado características como la presencia de estomas anomocíticos (Dematei Gregio & Moscheta, 2006), así como estudios sobre patrones de distribución de la superficie foliar, para evaluar el desarrollo y el crecimiento de la planta (Ramesch, Ramawat & Sing, 2007); así mismo, la descripción del desarrollo de los trichomas glandulares realizados por Rossi Monteiro et al (2001) e investigaciones cromosómicas, llevados a cabo por Oliveira et al (2004).

En cuanto a investigaciones desde el punto de vista químico, se menciona que *S. rebaudiana*, se caracteriza por presentar glicósidos diterpénicos dulces (Gattuso & al, 2003).

De igual manera, Ianiv & Bachrach (2005), han realizado estudios de la especie citada, mencionando sobre la evidencia de la participación de genes específicos y en etapas de la biosíntesis, en la formación de mono-di y tetraterpenos, alcaloides fenólicos volátiles y otros metabolitos secundarios.

En este trabajo de investigación, se realizó un estudio morfo-anatómico de las partes vegetativas de *S. rebaudiana*, focalizando el análisis sobre especímenes

obtenidos de cultivares, especialmente de muestras foliares y caulinares de la especie, atendiendo a que son las partes más comercializadas. Así también, se estudió la variación del tamaño foliar de las plantas, que presentaron caracteres vegetativos más aproximados a la forma silvestre de la especie.

Fueron analizadas muestras provenientes de especímenes obtenidos de cultivares provenientes del Departamento de Concepción.

Cabe mencionar, que no existen estudios realizados en el país, sobre la morfología y anatomía de las partes vegetativas de esta especie, que son las utilizadas para el aprovechamiento primario de la planta. Si bien existen análisis micrográficos realizados en otras latitudes, las condiciones climáticas y ecológicas son diferentes a las del Paraguay, lo cual podría influenciar en algunos aspectos morfo-anatómico de de la especie referida.

Existe actualmente en el país, hojas molidas de *ka'a he'e*, comercializadas en su forma artesanal; pero no se dispone de un patrón micrográfico de la especie, careciéndose en consecuencia de elementos que permitan evaluar la autenticidad de las muestras comercializadas como tal.

Con los resultados del trabajo, serán beneficiadas las instituciones que realizan el control de calidad de estos productos, así como el consumidor final que tendrá la garantía de la calidad del producto adquirido.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), propone para el control de calidad, los siguientes métodos cuantitativos: Índice de Estomas, Índice o Proporción de Empalizada y el Método de Wallis (Spegazzini, 2007). Sin embargo, otros caracteres morfo-anatómicos, podrían

aportar información útil para los fines mencionados, como lo llevado a cabo en este trabajo.

La evaluación morfo-anatómica foliar y caulinar de la especie, permitirá diferenciar las características propias de su estructura, además de obtener resultados sobre la variación del tamaño foliar en cultivares.

METODO

Diseño de estudio

La metodología de trabajo corresponde a un modelo con aplicación de observación, descripción y análisis de caracteres.

Origen del material estudiado

Las muestras obtenidas y utilizadas para el estudio son provenientes de especímenes obtenidos de cultivares del Departamento de Concepción.

Micrografía de las partes vegetativas y reproductivas

La evaluación de la morfo anatomía de las muestras, se realizó utilizando ejemplares adultos. El material para el estudio histológico de las estructuras, se procesó como espécimen testigo del trabajo, quedando depositado en el Herbario FACEN.

Las muestras fueron sometidas a procesos de deshidratación, ablandamiento, diafanización y coloración con safranina.

Se realizaron cortes transversales a mano alzada de hoja, tallo y raíz, tanto de material fresco como de muestras conservadas en FAA al 10%; se diafanizó con hipoclorito de sodio, se lavó con agua destilada y se sometieron al proceso de tinción.

Para la observación de la epidermis foliar, los fragmentos de hoja fresca se diafanizaron con hipoclorito de sodio durante 24 hs, luego fueron lavadas con agua destilada y llevadas para su observación al microscopio.

La diafanización de las epidermis foliares, así como la eliminación de cutina, se realizó según la técnica de Carpano & al (1994).

Se preparó láminas permanentes que están depositadas en el Herbario FACEN del Departamento de Biología.

Las observaciones fueron realizadas con Microscopio Óptico Compuesto Binocular Olympus Serie BH2, objetivo aumento de 4x, 10x y 20x, y las imágenes se obtuvieron con una Cámara Digital Moticam 352, con aumento de 30x, Software Motic Images Plus 2.0 ML. (2006).

Determinación de la Densidad Estomática(DS)

Para calcular la densidad estomática por unidad de área (mm^2) se realizó el conteo de estomas en la cara adaxial y abaxial de la hoja. Se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad estomática (DS): } \frac{\text{N}^\circ \text{ de estomas}}{\text{Área (mm}^2\text{)}}$$

Análisis de la variación del tamaño foliar

El análisis cuantitativo de la variación del tamaño foliar en la planta, se realizó siguiendo el siguiente protocolo de trabajo:

Selección de una población de 50 individuos, con 5 meses de desarrollo, en estado de pre-floración y floración, provenientes de cultivares del Departamento de Concepción.

De los individuos de la población citada se realizaron mediciones de 2 variables: longitud y ancho foliar; de los ejemplares que tenían más de 1 rama, se asumió cada rama como individuos diferentes.

Se registraron todos los datos en una planilla de trabajo.

Análisis estadístico

Para el análisis de la variación del tamaño foliar, se aplicó además del estadístico descriptivo y las pruebas de normalidad y contraste de hipótesis, las Pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis.

Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 10,5 de Nie et al (2000), junto con el manual de Técnicas de análisis multivariante de Datos: Aplicaciones con SPSS (Pérez, 2004).

RESULTADOS Y DISCUSION

Sitio de estudio

El sitio de extracción de plantas fue de cultivos del Departamento de Concepción, cuyas coordenadas geográficas son las siguientes: S 23° 12' 34,7" WO 56° 50' 35,5".

Descripción morfológica

Hábito: Planta arbustiva, cultivadas alcanzando aproximadamente 0.60 metro (m) de altura. Ver Figs. 1, 2.

Hoja: simple, sésil, oblonga-lanceolada, aproximadamente el 50% de la longitud de la hoja es dentada hacia el ápice y lisa hacia la base. Nervadura pinnada, reticulada, prominente en el envés, ligeramente marcada en el haz, densamente pubescente en ambas caras. 3 nervios nacen desde la

base. Se observan pelos persistentes en todo el margen de la hoja y a lo largo de todas las nervaduras, en especial de la principal. Borde de la hoja engrosada.

Tallo: ramificación lateral como en las espermatófitas, en el extremo y en los distintos niveles, simpódico. Pubescente. En sus primeras fases de desarrollo presenta un tallo único, en su fase final puede presentar numerosos tallos que salen de un mismo sistema radicular. Su raíz es muy ramificada y fibrosa.

Flor: blanca a color crema, pentámera, tubular, pubescencia densa en el cáliz. Pétalos blanquecinos. Inflorescencia en capítulo, con pedicelos cortos.

Fruto: aquenio

Hábitat: cultivado en suelo de tipo arenoso, a pleno sol.



Fig. 1. Hábito



Fig. 2. Hojas

Descripción anatómica

Hoja

-Epidermis superior o adaxial:

Uniestratificado, paredes anticlinales, cutícula gruesa y lisa. Células de contorno ondulados con menor número de estomas en este lado.

-Epidermis inferior o abaxial

Uniestratificado, células de menor tamaño que las de la epidermis superior. Las paredes anticlinales de la epidermis presentan ondulaciones, siendo éstas más pronunciadas en la cara abaxial. Es una hoja anfiestomática, con estomas del tipo anomocítico en ambas caras, coincidiendo con otras especies de la familia de las Asteraceae como *Achillea millefolium* L (Gregio et al, 2006), *Flourensia campestris* Griseb, *F. oolpis* S. F. Blake (Delbon et al, 2007), *S. entrerriensis* (Gattuso et al, 2003); los estomas están rodeados por 4 a 5 células epidérmicas. Ver Fig. 3 y 4.

La Densidad estomática (DS), es mayor por unidad de superficie en la cara abaxial. Ver Tabla 1.

En Asteraceae, familia a la que pertenece la especie estudiada, generalmente los tipos estomáticos son anomocíticos y anisocíticos, predominando el primer tipo (Metcalf & Chalk, 1950), y se encuentra en ambas caras epidérmicas, siendo mayor en la abaxial, clasificándose las hojas como anfiestomática (Budel et al, 2009; Esau, 1974)

-Tricomas

Están presentes dos tipos de tricomas en ambas caras: eglandulares y glandulares.

Tricomas eglandulares: son pluricelulares uniseriados, formado por 4 a 7 células. Corresponde a un tricoma simple, de forma acuminada. En la parte basal de la hoja aparecen pelos que están formados hasta por 11 células, ver Fig. 5. Según Gattuso et al (2003), en *S. entrerriensis* ambas epidermis poseen tricomas simples pluricelulares de 7 a 11 células.

Tricomas glandulares: son pluricelulares biseriados, con un pie unicelular, cabeza oval unicelular y secretora, presentes en ambas caras, lo que a su vez fue citado por Monteiro et al (2001), mientras que Gattuso et al (2003), menciona este tipo de tricomas al describir *S. entrerriensis*. Ver Fig. 6 y 7. Los tricomas glandulares pluricelulares biseriados fueron encontrados también en otras especies de Asteraceae, como *Baccharis microcephala* D.C. y *B. trimera* (Less) DC en Budel et al (2009).

A los tricomas glandulares, así como a los eglandulares son atribuidos diversas funciones, como ser, la contribución de la regulación de la temperatura del vegetal y a la radiación luminosa, barrera para el movimiento de los insectos en la superficie, reducción de la pérdida de agua y orientación de polinizadores (Smiljanic, 2005)

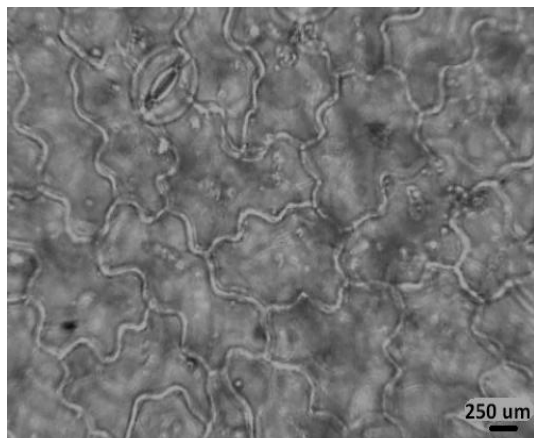


Fig. 3. Epidermis adaxial

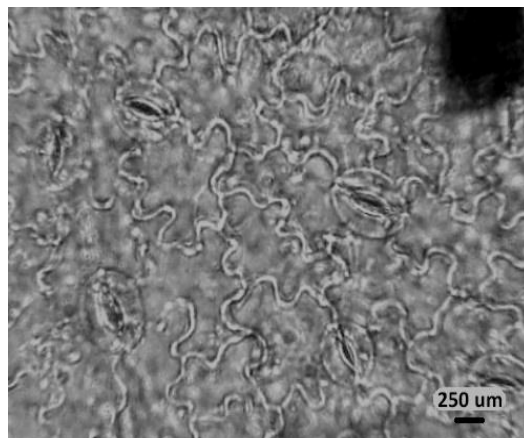


Fig. 4. Epidermis abaxial

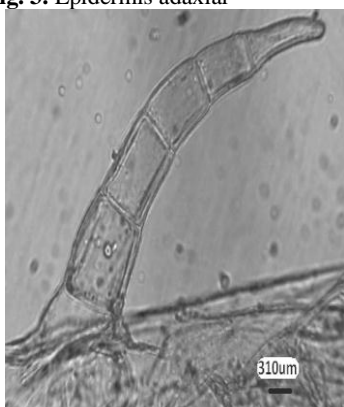


Fig. 5. Tricoma eglandular.

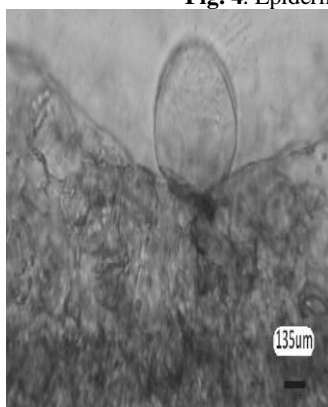


Fig. 6. Tricoma glandular.

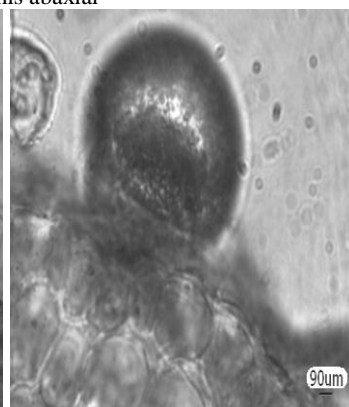


Fig. 7. Tricoma glandular

-Nervadura central

Al nivel de la nervadura central, la epidermis superior (Es) es uniestratificada, rectangulares de menor tamaño en la cara abaxial, con cutícula gruesa y lisa. Por debajo de la epidermis se encuentran 2-4 estratos de colénquima (C). El haz vascular es del tipo colateral, acompañados por casquetes de fibras esclerenquimáticas (Fe) por fuera del floema (F); el xilema (X) se localiza hacia la cara adaxial y el floema hacia la cara abaxial; rodeado por tejido

parenquimático extendiéndose hacia la epidermis inferior (Ei). La nervadura central es más prominente en la cara abaxial de la hoja. Ver Fig.8, 9 y 10.

El haz vascular del tipo colateral, ha sido descrito además para otras especies de Asteraceae, *Stevia claussoni* Sch. Bip. ex Baker, *Achillea millefolium* L. (Dematei Gregio et al, 2006), *Baccharis microcephala* D.C. y *B. trimera* (Less) D.C. (Budel et al, 2009)

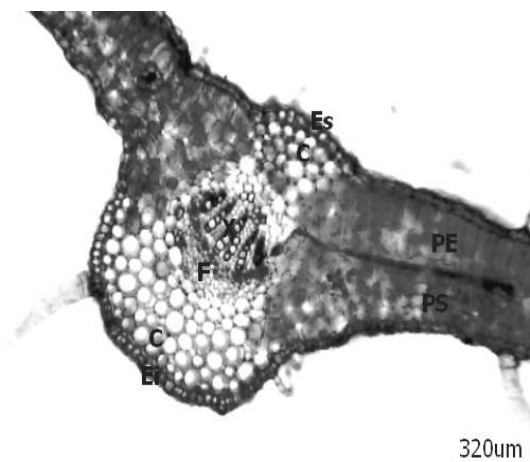


Fig. 8. Corte transversal de hoja

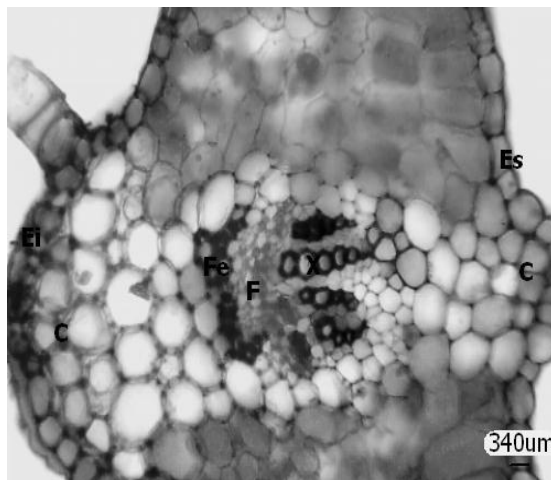


Fig. 9. Nervadura principal

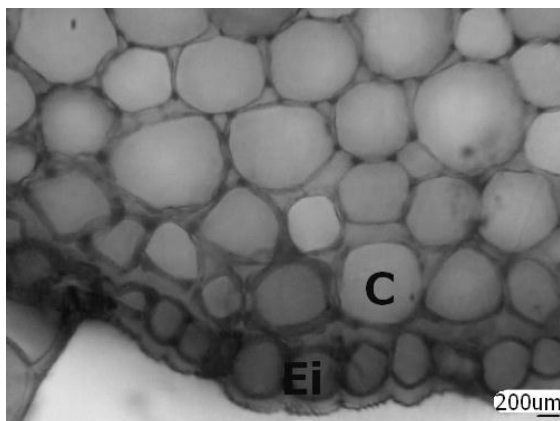


Fig. 10. Nervadura principal

-Mesófilo

La estructura a nivel de lámina foliar, es bifacial con simetría dorsiventral, al igual que *S. claussoni* Sch. Bip. ex Baker (Smiljanic, 2005), presentando dos tipos de parénquima: empalizada (Pe) y esponjoso (Ps).

El parénquima en empalizada es uniestratificada, con células alargadas, mas o menos rectangulares, por debajo de la cara adaxial de la hoja con una longitud de $\pm 546,62$ milimicra (μm), ocupando casi la

mitad del espacio del mesófilo. El parénquima esponjoso, localizado hacia la cara abaxial, con una longitud de $\pm 817,63$ μm , está integrado por células de forma irregulares con meatos o espacios intercelulares amplios. La forma de las células del tejido esponjoso es lobulada. Ver Fig. 11.

Según Metcalfe & Chalk (1950), el mesofilo dorsiventral es considerado como el patrón más frecuente para la familia Asteraceae.

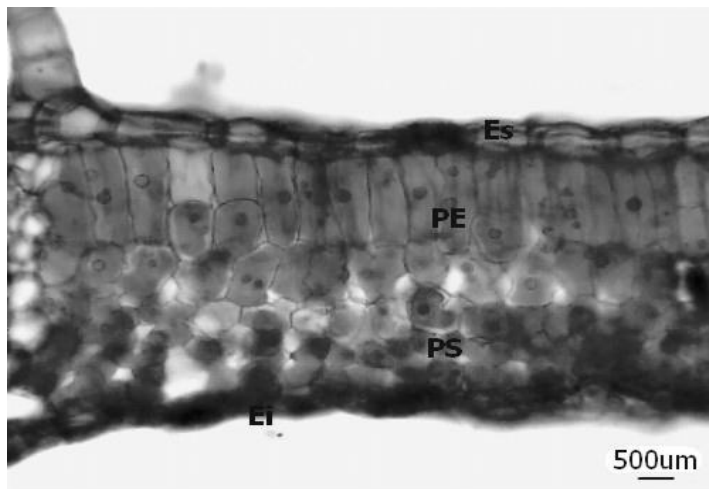


Fig. 11. Lámina foliar, corte transversal

Tallo

En el corte transversal se observa tallo de contorno redondeado.

-Epidermis

Uniestratificado, se observa abundantes tricomas eglandulares pluricelulares uniseriados y tricomas glandulares pluricelulares.

-Corteza

Por debajo de la epidermis (E), se observa de 3 a 5 estratos de colénquima angular en forma de un anillo continuo (C), este tipo de colénquima esta presente también en *B. microcephala* D.C. y *B. trimera* (Less) D.C. (Budel et al, 2009), seguido de 3 a 4 capas de tejido parenquimático, acompañado de clorénquima.

-Cilindro vascular

La disposición del tejido vascular forma una eustela, con haces vasculares del tipo colateral abierto y separados por células parenquimáticas; el floema (F) por fuera esta rodeado por fibras esclerenquimáticas (Fe) y por debajo están los vasos del xilema en las

primeras fases de diferenciación secundaria (X). La Médula es muy desarrollada por ser todavía un tallo joven. La parte central del tallo y rodeado por los haces vasculares se encuentra la médula constituida por células parenquimáticas (Pm) Ver Fig. 12.

Raiz

-Exodermis (Ex)

La epidermis o rizodermis (R), está formada por células alargadas uniestratificada. Los pelos radicales son unicelulares, de $\pm 124-725\mu\text{m}$ longitud.

-Corteza (Cx)

Formada por exodermis, tejido parenquimático cortical pluriestratificado, donde se observa granos de almidón.

-Médula

Separada de la corteza por un tejido endodérmico (En), por debajo del cual se observa el cilindro vascular constituido por el xilema (X) y floema (F), el primero está asociado con fibras esclerenquimáticas, según lo observado en el corte, no se observa aún crecimiento secundario. Ver Fig. 13.

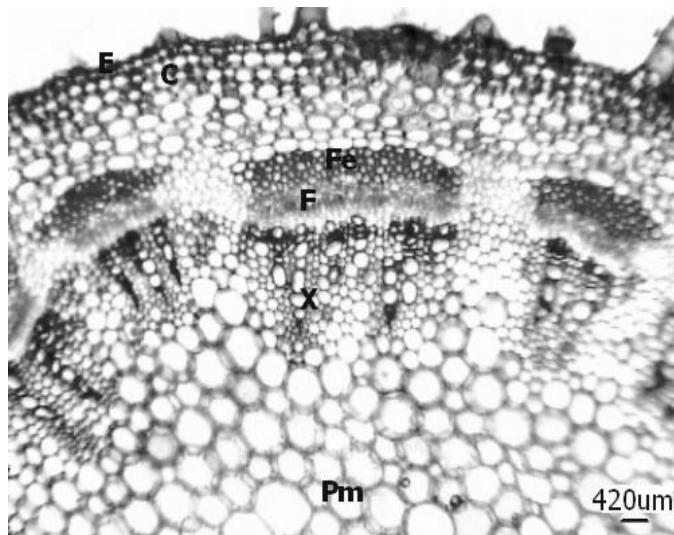


Fig. 12. Corte transversal de tallo

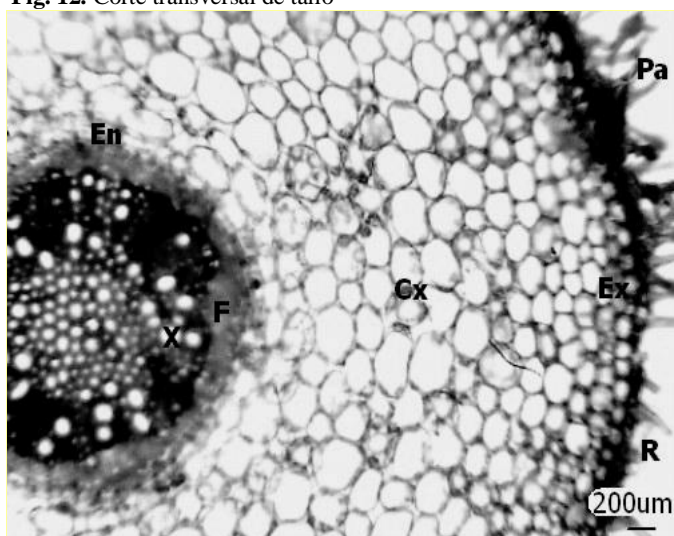


Fig. 13. Corte transversal de raíz

Análisis cuantitativo

Determinación de la Densidad Estomática(DS)

La densidad estomática por unidad de superficie, es mayor en la cara abaxial con respecto a la cara adaxial. Ver Tabla 1.

Tabla 1. Tamaño de la muestra y Promedio de la Densidad Estomática (DS)

<i>S. rebaudiana</i>	Tamaño de la muestra	Promedio de la D. Estomática
Cara adaxial	100	0,29
Cara abaxial	100	1,70

Análisis de la variación del tamaño foliar

La información del análisis corresponde a una población de 50 plantas de *S. rebaudiana*, provenientes de cultivares del Departamento de Concepción, con un total de 801 observaciones. El promedio del ancho de las hojas es de 0.793 centímetro (cm), con un valor mínimo de 0.2 cm y máximo de 2.0 cm, una mediana de 0.7 cm, que indica un sesgo hacia la derecha con una concentración de valores pequeños. La variación es media alta con un coeficiente de variación de 46.2% y los atípicos se dan en los valores bajos. No sigue una distribución normal ($p < 0.0001$) con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y el de Shapiro-Wilk. Ver Fig. 14.

Por otra parte, el promedio del largo de las hojas es de 3.10 con un valor mínimo de 0.6 y máximo de 6.8, una mediana de 2.9 indica un sesgo hacia la derecha con una concentración de valores pequeños. La

variación es media alta con un coeficiente de variación de 41.4% y los atípicos se dan en los valores bajos.

El análisis bivariado ha proporcionado una perspectiva del comportamiento conjunto de las dos variables, largo y ancho de las hojas. Una recta, calculada por regresión lineal, que se ubica en el centro mismo, denota una tendencia lineal con un r^2 : 0.66, así mismo, se muestran los intervalos de confianza del 95% para la media, las rectas extremas superior e inferior, en que se encuentran la mayor parte de los datos. Se aprecia igualmente que solo algunos salen de este rango, del 95%, pudiendo destacar un valor atípico resaltante en extrema inferior y corresponde a un atípico bi-variado.

Utilizando una prueba estadística no paramétrica, de Kruskal-Wallis, se concluye que hay diferencias significativas ($p < 0.0001$) entre las diferentes plantas, tanto para el ancho como el largo de las hojas

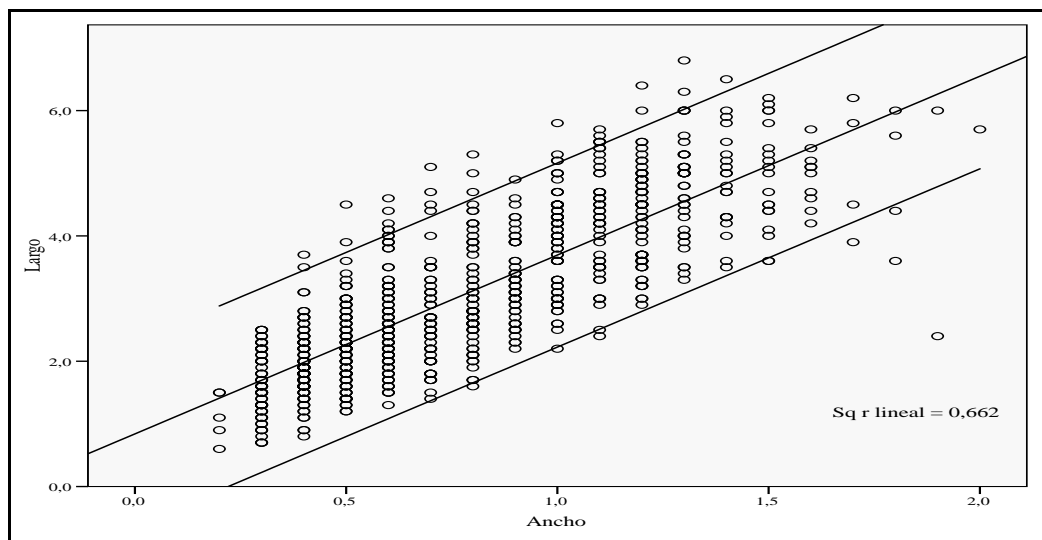


Fig. 14. Dispersión de ancho y largo conjunto de la muestra de hojas

Existe una concentración de datos entre los intervalos de 25% y 50 %, los valores están más dispersos entre el 50 % y 75 %, tanto para ancho como para el largo de las hojas. Ver Fig. 15 y 16.

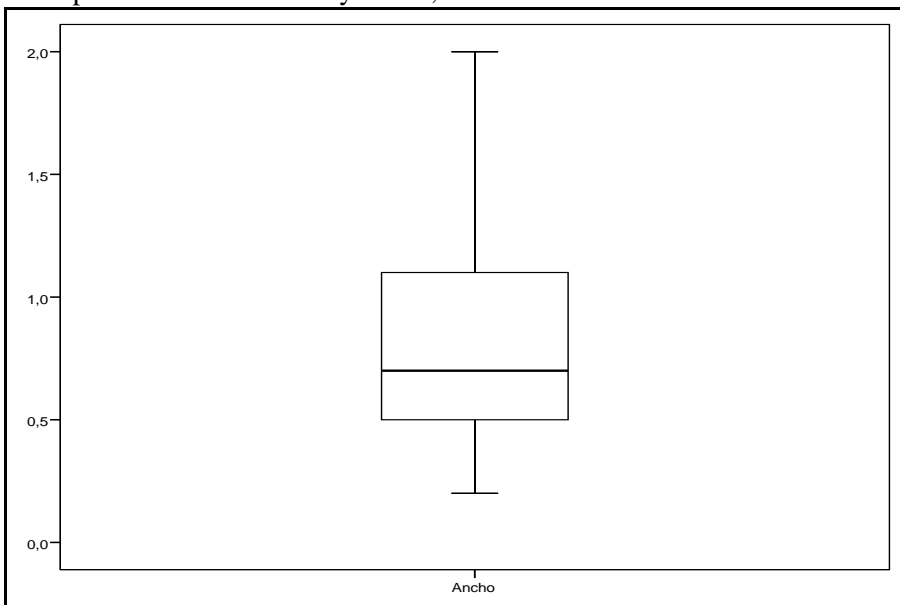


Fig. 15. Boxplots del ancho de las hojas.

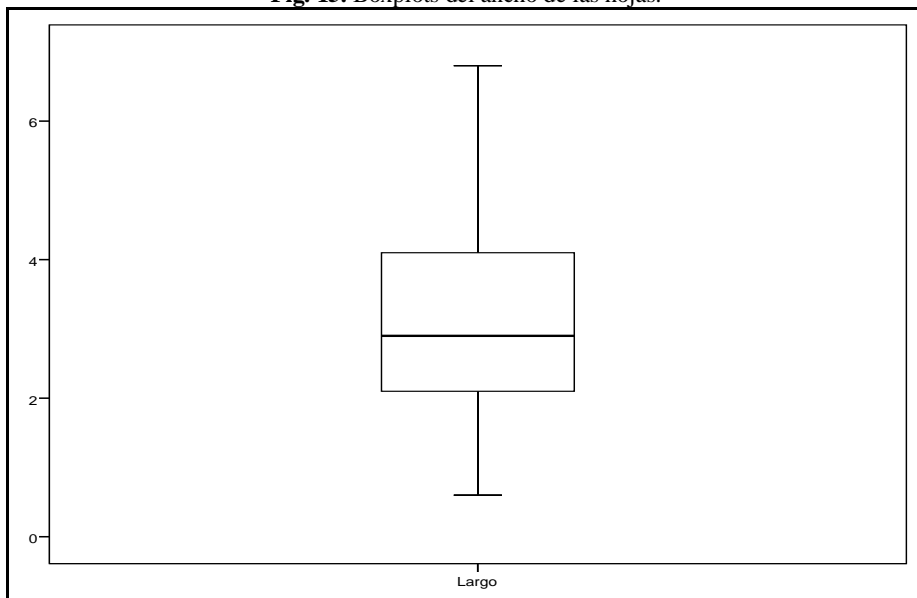


Fig. 16. Boxplots de valores de largo foliar.

CONCLUSION

Los ejemplares utilizados para el estudio, son plantas provenientes de ejemplares colectados en la jurisdicción de Horqueta en el Departamento de Concepción, si bien corresponden a plantas cultivadas, son las más próximas a la forma silvestre, de acuerdo a los caracteres morfológicos encontrados en los especímenes y el origen de las mismas, mencionados por los productores de la localidad de Horqueta, quienes refirieron, que hace aproximadamente 30 años atrás, habían colectado en su forma silvestre en el Cerro Cuatí; pero de acuerdo con los mismos informantes, las formas silvestres actualmente estarían extintos en el sitio indicado.

Teniendo en cuenta, los resultados obtenidos del estudio morfológico así como el micrográfico, se puede concluir que, la caracterización propia del tejido epidérmico, como tipos y localización de pelos o tricomas, tipos y ubicación de estomas, tipo de nervadura y estructura del mesófilo, caracteres anatómicos del tallo y de la raíz, además de la Densidad Estomática; pueden ser utilizados como elemento de apoyo para identificar la autenticidad de hojas de *Stevia*, comercializadas actualmente en el Paraguay,

En cuanto al estudio de la variación del tamaño foliar, se pudo corroborar, que se podría establecer, de acuerdo a los resultados obtenidos, una relación entre los valores de ancho y largo, definiendo patrones que se acercan a los propios de la especie y que permitiría diferenciar el tamaño foliar que se puede encontrar en plantas cultivadas de *Stevia* y que son comercializadas.

AGRADECIMIENTOS:

A las siguientes instituciones y personas: Universidad Nacional de Asunción, a través de la Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica, por el financiamiento de ésta investigación.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por las facilidades ofrecidas para el desarrollo del proyecto.

Al Ing. Agr. Porfirio Riquelme, a los señores Faustino Cardozo, Adolfo González y familia, propietarios de viveros y productores de ka'a he'e, por la donación de plantas para la realización de los estudios y el aporte de sus conocimientos tradicionales acerca de la especie.

BIBLIOGRAFIA

- Bertoni, J. 1991. Cultivo del ka'a he'e, *Stevia rebaudiana* Bertoni. MAG, Vol. 30. Asunción-Paraguay. 6p.
- Budel, J; Duarte, M. 2009. Análise morfoanatômica comparativa de duas espécies de carqueja: *Baccharis microcephala* D.C. e *B. trimera* (Less) D.C., Asteraceae. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 45 (1): 75 – 85 (PDF)
- Cabrera, A. L. W.; Holmes & S. MC Daniel. 1996. Compositae III. Flora del Paraguay. Conservatoires et Jardin botaniques de la Ville de Geneve-Missouri Botanical Garden. 25: 302-305.
- Carpano, S. M., Spigazzini, E. D. y Nájera, M. T. 1994. Nueva técnica de eliminación de cutina de órganos foliares. *Rojasiana* 2: 9-12.
- Delbon, N. et al. 2007. Análisis comparativo de los caracteres epidérmicos en *Flourensia campestris* y *F. oolepis* (Asteraceae). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, v. 42 (3-4): 245 – 250 (PDF)

- Dematei G. S. De J. & I. S. Moscheta. 2006. Anatomia de raiz caule e folha e identificação de estruturas secretoras de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). Acta Sci. Biol. Sci. Maringá, v. 28, n. 4: 327-334. (PDF)
- Esau, K. 1995. *Anatomía Vegetal*. Ed. Omega, Barcelona.
- Gattuso, S. & al. 2003. Caracteres morfoanatómicos y químicos de *Stevia entriensis* (Eupatorieae-Asteraceae). Bol. Soc. Argent. Bot. 38 (Supl.) 2003. XXIX Jornadas Argentinas de Botánica & XV-Reunión Anual de la Sociedad Botánica de Chile. p. 86-87
- Ianiv, Z. & U. Bachrach. 2005. Handbook of Medicinal Plants. Haworth Press. 349 p. (PDF)
- Metcalf, C.R.; Chalk, L. 1950. Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Oxford: Pergamon Press, v. 2 :782–804. (PDF)
- M.A.G. 1996. Producción de ka'a he'e. Asunción, Paraguay. 34 pp.
- Motic China Group. (2006). Motic Images Plus versión 2.0. Software de computadora para microscopia digital.
- Nie, N. et al. (2000). Statistical Package for the Social Science. Versión 10.5 for Windows. Software de computadora para análisis estadístico. SPSS Inc.
- Oliveira, V. M. de, E. R. Forni-Martins, P. M. Magalhães and M. N. Alves. 2004. Chromosomal and morphological studies of diploid and polyploid cytotypes of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Eupatorieae, Asteraceae). In: Genetics and Molecular Biology, 27, 2, 215-222 . (PDF)
- Pérez, C. (2004). Técnicas de Análisis Multivariante de Datos: Aplicaciones con SPSS. Madrid: Pearson Prentice Hall.
- Ramesh, K., RAMAWAT, N. & V. SING. 2007. Leaf Area Distribution Pattern and Non-Destructive Estimation Methods of Leaf Area for *Stevia rebaudiana* (Bert.)Bertoni. Asian Journal of Plant Sciences 6(7): 1037-1043 (PDF)
- Rossi Monteiro, W., M. de Moraes Castro, S. C. Mazzoni-Viveiros and P. G. Mahlberg 2001. Development and some histochemical aspects of foliar glandular trichomes of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bert. – Asteraceae. En: Rev. bras. Bot. vol.24 no.3 (PDF)
- Salisbury, E.J. (1927). "On the causes and ecological significance of stomatal frequency with special reference to the woodland flora". *Phil. Trans. Roy. Soc. London* 216 B: 1-65.
- Smiljanic, K. B. 2005. Anatomía foliar de especies de Asteraceae., Vicoso-Minas Gerais, Brasil. 79 p. Disertación (Magíster Science). Universidad Federal de Vicoso.(PDF)
- Spegazzini, E. 2007. La micrografía en la identidad de los vegetales- In: Especial IX Simposio Argentino y XII Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica Conferencias. Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromáticas. Vol. 6 (5), 165 (PDF)
- Zornig, H. y Weiss, G. (1925). "Beiträge Zur Anatomie des Laubblattes offzineller und pharmäzeutisch gebräuchlicher Compositen-Drogen". *Arch. Pharm., Berl.* 263: 451-470. (PDF)