



CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE UNA COLECCIÓN DE GERMOPLASMA DE *Stevia rebaudiana* BERT.



MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF A GERMPLASM COLLECTION OF *Stevia rebaudiana* BERT.

Budeguer C.J.¹, Erazzú L.E.², Camadro E.L.^{3,4}

¹ Facultad de Agronomía, Zootecnia y Veterinaria, Universidad Nacional de Tucumán (UNT), Tucumán, Argentina.

² EEA Famaillá, INTA, Tucumán, Argentina.

³ Unidad Integrada Estación Experimental Agropecuaria (EEA) "Domingo Pasquale", Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) - Facultad de Ciencias Agrarias (FCA), Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP), Argentina.

⁴ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

Corresponding author:
Budeguer Carlos Jorge
carlos.budeguer@faz.unt.edu.ar

ORCID 0000-0002-4649-956X

Cite this article as:

Budeguer C.J., Erazzú L.E., Camadro E.L. 2025. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE UNA COLECCIÓN DE GERMOPLASMA DE *Stevia rebaudiana* BERT. BAG. Journal of Basic and Applied Genetics XXXVI (2).

Received: 09/15/2025

Revised version received: 12/10/2025

Accepted: 12/19/2025

General Editor: Elsa Camadro

DOI: 10.35407/bag.2025.36.02.02

ISSN online version: 1852-6233

RESUMEN

Stevia rebaudiana Bertoni (Asteraceae) ($2n=2x=22$) es una especie originaria de Paraguay donde se la conoce como Ka'a-He-é (yerba dulce) por el intenso sabor dulce de sus hojas. Dicho sabor se debe a una serie de glicósidos diterpénicos o esteviolglicósidos, principalmente esteviósido y rebaudiósido A que son, respectivamente, 300 y 400 veces más dulces que la sacarosa. Esta especie se cultiva para la obtención industrial de cristales de esteviolglicósidos, utilizados como endulzantes naturales dietéticos, y de hojas secas para adicionar a alimentos. Para establecer un banco activo de germoplasma de *S. rebaudiana* con fines de mejoramiento genético, en 2013 y 2021 se introdujeron plantas de cuatro provincias argentinas en la EEA Famaillá, INTA, Tucumán -dos introducciones por provincia de Tucumán, Jujuy y Misiones, y una de Formosa-. De éstas, 75 fueron sometidas a caracterización morfológica y 73 a caracterización molecular con 18 EST-SSR. En el análisis multivariado para 14 caracteres morfológicos se observó solapamiento de medidas entre las plantas de Tucumán, Jujuy, y Misiones, diferenciándose las de Formosa por tamaño de hoja y altura de planta. En el análisis molecular, las introducciones mostraron diversidad para número de alelos, heterocigosis y porcentaje de loci polimórficos, excepto la de Formosa, que presentó perfiles moleculares uniformes. En el análisis de varianza molecular (AMOVA), 77% de la variación total correspondió a diferencias entre individuos dentro de introducciones, 15% a diferencias entre provincias (origen geográfico), y 8% a diferencias entre introducciones dentro de provincias. La variabilidad morfológica y la diversidad molecular observadas permiten concluir que el germoplasma evaluado de *S. rebaudiana* puede ser de valor para iniciar un plan de mejoramiento genético.

Palabras clave: diversidad genética, marcadores moleculares EST-SSRs, *Stevia*, variabilidad morfológica.

ABSTRACT

Stevia rebaudiana Bertoni (Asteraceae) ($2n=2x=22$) is a species native from Paraguay where it is known as Ka'a-He-é (sweet herb) because of the intense sweet flavor of its leaves. Such flavor is due to a series of diterpene glycosides or steviol glycosides, mainly stevioside and rebaudioside-A, which are 300 and 400 times sweeter than sucrose. This species is cultivated for the industrial obtainment of steviol glycoside crystals, utilized as dietary natural sweeteners, and dry leaves for adding to food. To establish an active *S. rebaudiana* gene bank for breeding purposes, plants from four Argentinian provinces were introduced in EEA Famaillá, INTA, Tucumán, in 2013 and 2021 -two introductions per province from Tucumán, Jujuy, and Misiones, and one from Formosa-. Of these, 75 were subjected to morphological characterization and 73 to molecular characterization using 18 EST-SSR. In the multivariate analysis for morphological traits, measures overlapped in the introductions from Tucumán, Jujuy, and Misiones, whereas the introduction from Formosa differed from the rest in leaf size and plant height. In the molecular analysis, the introductions exhibited diversity for number of alleles, heterozygosity, and percentage of polymorphic loci, except for the introduction from Formosa, which presented uniform molecular profiles. In the analysis of the molecular variance (AMOVA), 77% of the total variation corresponded to differences among plants within introductions, 15% to differences among provinces (geographical origin), and 8% to differences among introductions within provinces. The observed morphological variability and molecular diversity allow to conclude that the analyzed *S. rebaudiana* germplasm could be of value to initiate a breeding program.

Key words: EST-SSR molecular markers, genetic diversity, morphological variability, *Stevia*.

Available online at
www.sag.org.ar/jbag

INTRODUCCIÓN

Stevia rebaudiana Bertoni (Asteraceae) es una especie originaria de Paraguay donde se la conoce con el nombre guaraní *Ka'a-He-é* (yerba dulce), por el intenso sabor dulce de sus hojas. Dicho sabor se debe a la presencia de una serie de glicósidos diterpénicos o esteviolglicósidos, principalmente el esteviósido y el rebaudiósido-A, que son 300 y 400 veces más dulces que la sacarosa, respectivamente. Le siguen en orden de importancia el rebaudiósido C, el dulcósido A (ambos de bajo poder edulcorante), así como trazas de rebaudiósido D y E (Kolb *et al.*, 2001; Brandle y Telmer, 2007; Gasmalla *et al.*, 2014).

La importancia económica del cultivo de esta especie reside en el aislamiento y obtención industrial de cristales de esteviolglicósidos para su utilización como endulzantes naturales dietéticos, debido a que su consumo no aporta calorías al organismo (Kryvenki *et al.*, 2008). Asimismo, se pueden utilizar las hojas secas de la planta para endulzar alimentos en general (Conal, 2012). Se ha demostrado, además, que el extracto de *S. rebaudiana* tiene efectos positivos en la normalización de los niveles de insulina y azúcar en la sangre de pacientes diabéticos (Geuns, 2003; Karaköse, 2012).

S. rebaudiana tiene flores hermafroditas y un sistema homomórfico de auto-incompatibilidad esporofítica; puede reproducirse en forma asexual, o en forma sexual con un alto porcentaje de alogamia (Budeguer *et al.*, 2024). Para la implantación de lotes de producción se utilizan esquejes o plántulas obtenidas por micropropagación pero, en la Argentina, los pequeños agricultores utilizan semillas producidas por polinización libre. Angelini *et al.* (2018) han inventariado 90 cultivares que se utilizan en diferentes países, la mayoría de ellos se comercializan en forma de semillas, y a menudo, son producidos en sistemas de polinización libre. Los cultivares más utilizados a nivel internacional se denominan *Criolla*, *Eirete* y *Morita* (Hastoy, 2018). En Argentina, los más difundidos son: *Eirete*, *Criolla* y *Estevia CA 5144*; los dos primeros se desarrollaron en Paraguay y el tercero en la EEA Cerro Azul, INTA, en la provincia de Misiones. Estos cultivares son utilizados principalmente en Misiones, Corrientes y Entre Ríos, bajo condiciones agroecológicas muy diferentes a las del noroeste argentino en general, y de la provincia de Tucumán en particular.

La diversificación productiva mediante el cultivo de *S. rebaudiana* en Tucumán sería posible en regiones con baja incidencia de heladas, presentando el pedemonte un agroclima adecuado para el cultivo de esta especie (Zuccardi y Fadda, 1985; Falasca y Ulberich, 2005). Para explorar esa posibilidad y con fines últimos de mejoramiento genético, en la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Famaillá, del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Tucumán, se estableció un banco activo de germoplasma de *S. rebaudiana* con

plantas (una planta= un genotipo) introducidas de cuatro provincias argentinas: Tucumán, Jujuy, Misiones y Formosa. Con las plantas introducidas en 2013 se dio inicio al banco activo; en 2021, se introdujeron nuevas plantas (genotipos) para ampliar la variabilidad genética del germoplasma que se conserva en forma clonal. Las plantas introducidas no pertenecían a ninguna variedad mejorada o cultivar comercial, y los agricultores desconocían el origen de las mismas.

La amplia expansión mundial que tuvo el cultivo de *S. rebaudiana* a partir de la década de 1980 dio lugar a la realización de caracterizaciones morfológicas, agronómicas, y moleculares de colecciones de germoplasma de Paraguay introducidas en otros países, entre ellos Argentina, Brasil, Francia, Turquía e India (Oliveira *et al.*, 2004; Bhandawat *et al.*, 2014; Guerrero *et al.*, 2015; Kaur *et al.*, 2015; Felipe *et al.*, 2018; Hastoy, 2018). Además, desde hace ya varios años, el uso de marcadores moleculares ha mejorado significativamente el conocimiento y aprovechamiento de la variabilidad genética de los cultivos -y de la diversidad genética del germoplasma emparentado- para el mejoramiento genético. En este sentido, y a pesar de la falta de información genómica, se han hecho algunos trabajos de genotipificación en *S. rebaudiana* basados principalmente en microsátélites de secuencia expresada, *Expressed Sequence Tags (EST-SSRs)* (Cosson *et al.*, 2019).

El objetivo del presente trabajo fue realizar la caracterización morfológica y molecular de plantas (genotipos) de *S. rebaudiana* provenientes de cuatro orígenes geográficos de la Argentina. Estas plantas forman parte del banco activo de germoplasma de la EEA Famaillá, INTA.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el campo experimental de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Famaillá, INTA, Tucumán (27° 1' 19'' S, 65° 22' 26'' O; altitud: 370 msnm.) se cultivaron plantas (una planta = un genotipo) de cuatro orígenes geográficos de la Argentina (provincias de Tucumán, Jujuy, Misiones y Formosa) introducidas en el banco activo de germoplasma de esa institución en 2013 y 2021. Las distancias de trasplante fueron de 1 m entre surcos y de 0,5 m entre plantas. Debido a la homogeneidad del lote, las plantas se establecieron en filas por provincia de origen y año de introducción. En 2014 se realizó la caracterización morfológica de plantas introducidas en 2013, y en 2022 se realizó la caracterización molecular de plantas introducidas en 2013 y 2021. En 2013 se introdujeron al banco activo 25 plantas de Tucumán, 30 de Jujuy, 25 de Misiones y 17 de Formosa, y en el año 2021 se introdujeron 17 plantas de Tucumán, 9 de Jujuy y 4 de Misiones.

Caracterización morfológica

Se llevó a cabo en 20 plantas de Tucumán, 20 de Jujuy, 20 de Misiones y 15 de Formosa. Estas plantas se tomaron al azar entre aquellas que presentaban buen crecimiento porque la adaptación de las introducciones a las condiciones experimentales fue variable. La denominación de cada planta utilizada en el presente análisis puede consultarse en la tabla suplementaria.

Caracteres analizados

Se analizaron cinco caracteres morfológicos cuantitativos y nueve cualitativos (Tabla 1) según los descriptores propuestos por el Registro Nacional de Cultivares (INASE, 2025). La observación y registro de datos de cada planta se hizo en el momento fenológico de inicio de floración, con alrededor del 10% de las flores abiertas.

Análisis estadístico

Se adoptó un enfoque de análisis multivariado de los datos. Para ello, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) para los caracteres cuantitativos y de Coordenadas Principales (ACoP) para los caracteres cualitativos, utilizando la distancia *Simple Matching* (Franco e Hidalgo, 2003; Cuadras, 2007). A su vez, se hizo un Análisis de Procrustes Generalizado tomando ambos tipos de caracteres (Bramardi, 2002). Los programas estadísticos utilizados fueron R versión 3.6.2 (R Core Team, 2019) e InfoStat versión 2020 (Di Rienzo et al., 2020).

Caracterización molecular

Las plantas que se caracterizaron molecularmente se detallan en la Tabla 2. Las introducciones se agruparon y codificaron según provincia de origen y año de

Tabla 1. Caracteres morfológicos cuantitativos y cualitativos evaluados en 75 plantas de *S. rebaudiana* del banco activo de germoplasma de la EEA Famaillá, INTA.

Caracteres	Descripción	Unidad	Siglas
Cuantitativos			
1	Altura de planta (desde el cuello hasta el extremo vegetativo)	cm	ALT
2	Número de tallos primarios (medido a los 15 cm de altura del cuello)	cm	NTP
3	Diámetro de tallos primarios (medido a 15 cm de altura del cuello)	cm	DT
4	Número de dientes en el borde de la lámina		NDL
5	Relación largo/ancho de lámina foliar		RLA
Cualitativos			
1	Aspecto general de la planta: (1) erecta; (2) semidecumbente; (3) decumbente		
2	Pilosidad del tallo: (1) glabros a ligeramente pubescentes; (2) ligeramente pubescentes a pubescentes; (3) pubescentes; (4) muy pubescentes		
3	Forma de la lámina: (1) acicular; (2) lanceolada; (3) romboide; (4) ovada; (5) lineal; (6) subulada; (7) cordada; (8) cuneada; (9) obtusa; (10) elíptica		
4	Pubescencia de la lámina: (1) glabros a ligeramente pubescentes; (2) pubescentes; (3) muy pubescentes		
5	Pecíolo de la lámina: (1) peciolada; (2) sésiles; (3) sésiles y pecioladas		
6	Margen de la lámina: (1) Crenado; (2) Dentado; (3) Aserrado		
7	Posición de las hojas en el tallo principal: (1) opuestas; (2) alternas; (3) verticiladas		
8	Color de la inflorescencia: (1) blanco; (2) blanco y púrpura; (3) púrpura		
9	Aquillado de lámina: (1) profundamente aquillada; (2) aquillada; (3) no aquillada		

Tabla 2. Año de colección, número de individuos (N) y denominación de las 73 plantas de siete introducciones de *S. rebaudiana* del banco activo de germoplasma de la EEA Famaillá, INTA, analizadas mediante marcadores moleculares EST-SSRs.

Introducción	Año	N	Denominación
Formosa13 (Fo13)	2013	15	F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10, F11, F12, F13, F14, F15
Jujuy13 (Ju13)	2013	9	J1, J2, J3, J4, J5, J6, J7, J8, J9
Jujuy21 (Ju21)	2021	9	J21-1, J21-2, J21-3, J21-4, J21-5, J21-6, J21-7, J21-8, J21-9
Misiones13 (Mi13)	2013	9	M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9
Misiones21 (Mi21)	2021	4	M21-1, M21-2, M21-3, M21-4
Tucumán13 (Tu13)	2013	10	T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10
Tucumán21 (Tu21)	2021	17	T21-1, T21-2, T21-3, T21-4, T21-5, T21-6, T21-7, T21-8, T21-9, T21-10, T21-11, T21-12, T21-13, T21-14, T21-15, T21-16, T21-17

recolección como sigue: Fo13 (Formosa, 2013), Ju13 (Jujuy, 2013), Ju21 (Jujuy, 2021), Mi13 (Misiones, 2013), Mi21 (Misiones, 2021), Tu13 (Tucumán, 2013), Tu21 (Tucumán, 2021). En el análisis de agrupamiento se incluyó a *Stevia breviflora* Hook. & Arn., como testigo de contraste de los datos.

Extracción de ADN y amplificación con cebadores

Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo de Cosson *et al.* (2019) a partir de hojas jóvenes previamente desecadas por 48 h a 50 °C y molidas finamente. A 30 mg de polvo de hojas se le agregó 1 ml de tampón de extracción precalentado a 65 °C (0,1 M Tris-HCL pH 8; 0,7 M NaCl; 0,04 M EDTA; 1% HATMAB más 1% β-mercaptoetanol y 50 µg/ml de proteinasa K) y se incubó 1 h en baño María a 65 °C, agitando enérgicamente cada 15 min. Seguidamente, se agregaron 500 µl de cloroformo:isoamílico (24:1) agitando 20 min a 125 rpm en agitador orbital. La centrifugación se realizó a 12000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se tomó el sobrenadante y se traspasó a tubos de 1,5 ml; luego se agregaron 10 µl de RNAsa y se realizó una incubación durante 30 min a 37 °C. Se agregaron 600 µl de isopropanol frío y se agitó suavemente la solución por inversión. La centrifugación se realizó por 10 min a 12000 rpm y 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol 70% frío. Nuevamente se realizó la centrifugación por 10 min a 12000 rpm y 4 °C, se eliminó el etanol y se dejó secar bien el *pellet* formado. Se agregaron 100 µl de agua mQ estéril para disolver el *pellet*. Se cuantificó el ADN extraído en un equipo Epoch Microplate Spectrophotometer® (BioTek) a 260 nm. Todas las muestras de ADN extraídas se ajustaron a una concentración de 200 ng/µl.

Se utilizaron 18 marcadores moleculares EST-SSRs desarrollados por Cosson *et al.* (2019) (Tabla 3). Las amplificaciones con los cebadores mediante reacción

en cadena de la Polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*), se realizaron en un volumen de reacción de 15 µl conteniendo 10 ng de ADN; 1x PCR buffer (10 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM KCl); 2,5 mM de MgCl₂; 0,2 µM de cada primer, 200 µM de cada dNTP's y 0,5 U de ADN polimerasa SurePRIME® (MP Biomedicals). Las amplificaciones se llevaron a cabo en equipo Mastercycler Pro® (Eppendorf) siguiendo el siguiente protocolo de PCR: desnaturalización inicial de 15 min a 95 °C y 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 45 s a 55 °C, 60 s a 72 °C, seguido de una extensión final de 10 min a 72 °C. El resultado de las amplificaciones se verificó en gel de agarosa al 2%, agregando 10 µl de un marcador de peso molecular de 1 kb, y la corrida electroforética se realizó por 60 min a 150V. Los productos amplificados por PCR fueron separados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 4,5% (acrilamida:bis-acrilamida 19:1) y 7 M de urea en 1x TBE buffer, y se corrieron a 80 W durante 2,5 h aproximadamente.

Análisis de los datos moleculares

Parámetros de diversidad genética. Se determinaron los siguientes parámetros de diversidad genética con los programas GenALEX 6.5 (Peakall y Smouse, 2006) e Info-Gen (versión 2016) (Balzarini y Di Rienzo, 2016): número de alelos diferentes por locus (Na), número efectivo de alelos por locus (Ne), heterocigosis observada (Ho), heterocigosis esperada (He) y porcentaje de loci polimórficos (P).

Comparación de diversidad genética entre procedencias geográficas. Se realizó una comparación de las medidas de variabilidad genética entre introducciones en base a la heterocigosis observada (Ho) y esperada (He), mediante el programa Info-Gen (Balzarini y Di Rienzo, 2016), utilizando la prueba no paramétrica de Friedman.

Análisis de varianza molecular. Para calcular el

Tabla 3. Marcadores *EST-SSRs*⁽¹⁾ utilizados en el genotipificado de 73 plantas de *S. rebaudiana* del banco activo de germoplasma de la EEA Famaillá, INTA. ⁽¹⁾ modificado de Cosson *et al.* (2019)

Nombre	Cebador hacia adelante (5'-3')	Cebador reverso (5'-3')	Motivo repetido
stvia004	CTAACCTCAATTCCTACATCC	CACGTCACCTGCATTTTCC	(AC)19
stvia018	TTACTAGAGGTAGCATAATTTTCG	GCACATCTACCATATCTAATGC	(ATC)15
stvia021	AGCTCCAGATAAACAAACAGC	ATCTGATCTGTGCATTTTCC	(ATAG)8
stvia024	AAACCACCCAAGAAATCC	TGTCGGAGTATCAACAGTACC	(AAT)14
stvia025	TAGTTTGGCCCATTTGACC	AGAGCAGACACCAGATGAGG	(TG)15
stvia036	TGTCTCTGACAAAATTATACGG	TTGTCTGTCACCCTGTGG	(AG)13
stvia044	TGATAGTATAAGGCTTCCGTACC	ACACACCGACGAGACTCC	(AG)13
stvia048	ATGCCTATCCTTGTGTTGC	TTCAGGTCATTGTGACTGG	(GA)13
stvia051	AGAAGCTGGAAGAATTGAGC	AATCTCAACCAAACAGAGACG	(TGA)12
stvia057	ACATTTAGTGAGTGAGTGATTACC	TCTTGGTTTACTGGTGAGG	(TCA)11
stvia071	TACTAGGATTCTTGATTTGGTGTT	TCAACCACCCGAAACTTTA	(CA)13
stvia072	TATCTTCTCAGGAGTCCAAGC	AGATTATTGGCTTCCATTGC	(AC)12
stvia079	GAACTCAAAGAGGCGATTC	TCAAATAACTGTCAAAGATGGTG	(ATT)11
stvia084	TTTGTCTCCACATGAAACG	ATTGCATCTCTCTCAACTTCAAC	(TAT)11
stvia093	GAGCTTCCACCATTTCTCAGTA	TACAACGAGCATCCCATTCC	(ATC)33
stvia096	AATCTTCAAGTGCATTTCCACC	AAGACGGTTGATGAAGTATGG	(ATC)19
stvia099	TAAAGATTGCATCAACCGATC	CAAGTTATCCGTCAGTATTCGAT	(AAT)14
stvia107	TCTGTGGCAAATAACTCTGC	AAGAATCCATTGGCTGATAAC	(AT)13

nivel de diferenciación genética entre las diferentes introducciones se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA por sus siglas en inglés) (Excoffier *et al.*, 1992) con el programa GenAlEx (Peakall y Smouse, 2006). Para el modelo del AMOVA se tuvieron en cuenta los efectos de provincias, introducciones dentro de provincias e individuos dentro de introducciones/provincias.

Análisis de coordenadas principales (ACoP). Se realizó el ACoP tomando los 18 marcadores *EST-SSRs* para los 73 individuos analizados mediante el programa GenAlEx, el cual convierte la matriz de distancia genética en una matriz de covarianza con datos estandarizados.

Análisis de conglomerados. Para la formación de grupos, de tal forma que los elementos de un grupo sean más parecidos entre sí que con los elementos de otro grupo, se analizaron las relaciones entre las 73 plantas mediante el método de árbol no ponderado *Neighbor-*

Joining. Este árbol se construyó utilizando el coeficiente de disimilitud de *Jaccard*, mediante el programa DARwin v6.0 (Pierrier y Jacquemoud-Collet, 2006)

RESULTADOS

Caracterización morfológica

Análisis de componentes principales (ACP)

En la Figura 1 se observa el biplot de los CP1 y CP2, que juntos explican el 64% de la variabilidad total. Las variables altura de planta (ALT), diámetro de tallo (DT) y número de dientes por lámina (NDL) están altamente correlacionadas. La relación largo/ancho de lámina (RLA) y el número de tallos primarios (NTP), por otro lado, se correlacionaron negativamente. Las plantas M14, M15, F13 y F12 tuvieron los mayores valores para las variables ALT, DT y NDL en contraste con T1, T2, M9,

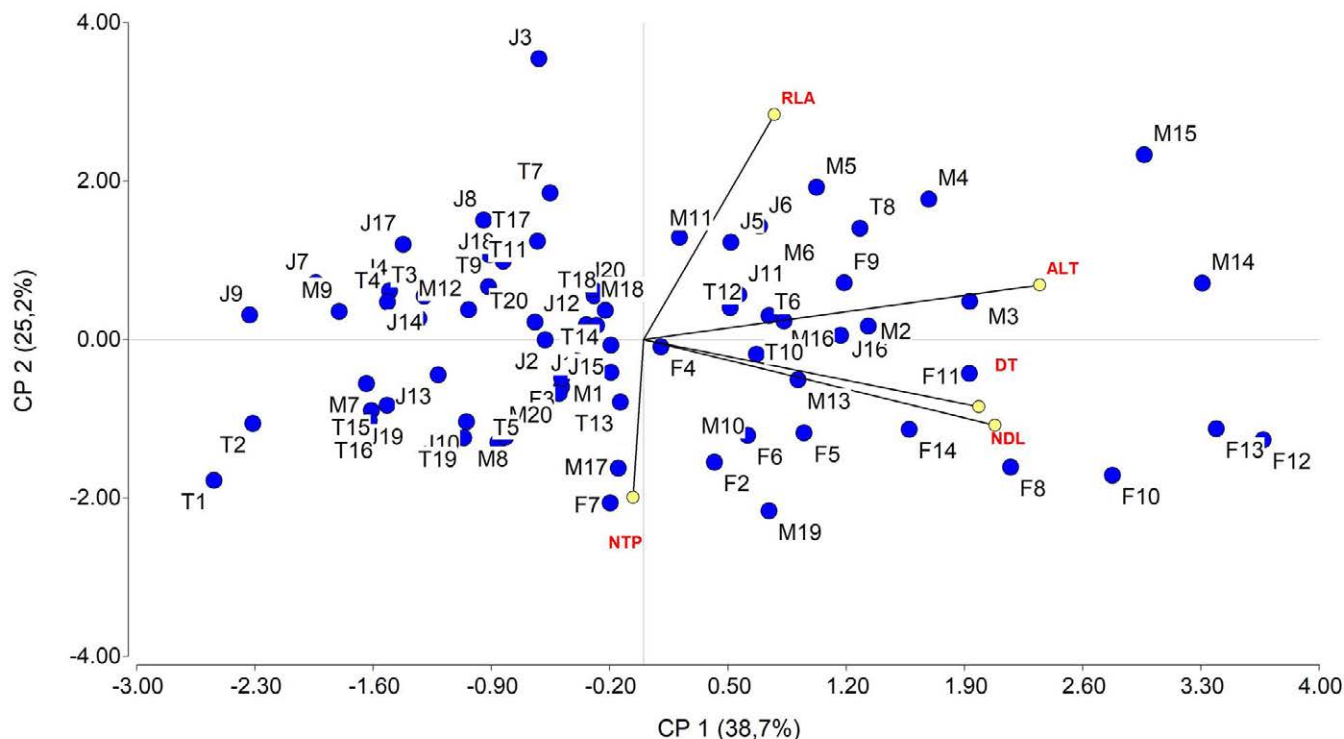


Figura 1. Biplot del Análisis de Componentes Principales (ACP) de 75 plantas de *S. rebaudiana* del banco activo de germoplasma de la EEA Famaillá, INTA; en base a cinco caracteres morfológicos cuantitativos: altura de planta (ALT), número de tallos primarios (NTP), diámetro de tallos primarios (DT), número de dientes en el borde de la lámina (NDL), relación largo/ancho de lámina foliar (RLA). Las plantas se identifican por provincia de origen: Tucumán (T), Jujuy (J), Misiones (M) y Formosa (F).

J9 y J7, que tuvieron los menores valores. En la CP2 M14 y M15 se diferencian de F12, F13 por mayores valores de ALT y RLA. En la CP2 se destaca J3 por poseer la mayor RLA respecto al resto de las plantas.

Análisis de Coordenadas Principales (ACoP)

En el biplot de las distancias entre plantas basadas en el coeficiente de similitud *Simple Matching* y el árbol de recorrido mínimo, de acuerdo a los nueve caracteres analizados se pueden observar seis grupos con plantas de diferentes orígenes geográficos, y no un agrupamiento por provincia (Figura 2, Tabla 1). La CP1 explica el 40,7 % y la CP2 el 19,4 de la variabilidad detectada. El grupo 1 está conformado por pocos genotipos, M5, M17, T12 y J20. El grupo 2 es el conglomerado más denso y numeroso, y agrupa principalmente genotipos de Tucumán y Misiones, a saber: T1, T20, M4, T13, J11, T4, T3, T15, J16, T5, T17, T19, J17, T6, T18, M3, M20, J19, J18, M16, M2, M18, M14, M12 y M1. El Grupo 3, situado en la región central del gráfico, incluye una mezcla de genotipos, a saber: F9, F5, F10, T2, T8, T9, T11, T14, T16, T7, M10, M15, J10, J6, y J7. Hacia la parte inferior de la CP2 se identifica el grupo 4 con los genotipos J14, J9, J12 y M19. El grupo 5 corresponde a la rama inferior derecha, y agrupa los genotipos F4, J1, M6, M8, J2, J13, J15 y M9. El grupo 6 corresponde a la rama superior derecha del árbol, y contiene los genotipos F1, F8, F11, F12, F13, F14 y T10.

Análisis conjunto de caracteres cuantitativos y cualitativos

La Figura 3 representa la proyección de los individuos en base al Análisis de Procrustes Generalizado, en el que se incluyeron los cinco caracteres morfológicos cuantitativos y los nueve cualitativos. Se observa que las plantas de Formosa se agrupan separadamente del resto, a excepción de F4 y F9; a su vez, las plantas de Tucumán, Jujuy y Misiones están entremezcladas, excepto por T10 que se agrupa con las plantas de Formosa. Así mismo, hay algunas plantas (T17 y M5) se ubican a mayor distancia del grupo principal.

Caracterización molecular

Diversidad genética

Se obtuvieron los parámetros de diversidad genética para las siete introducciones analizadas mediante 18 loci *EST-SSRs*. En la Tabla 4 se puede observar que N_a varió entre 1,94 y 7,83, con una media de 5,61, correspondiendo el menor valor (1,94) a F013. En el análisis de las frecuencias alélicas por introducción y locus, se observó que las plantas de la introducción F013 fueron monomórficas para todos los loci, presentando dos alelos en frecuencia 0,5 en cada uno de ellos; la excepción fue el marcador *stvia079*, que no amplificó en las plantas F2 y F3. Las demás introducciones mostraron polimorfismo para los 18 loci analizados.

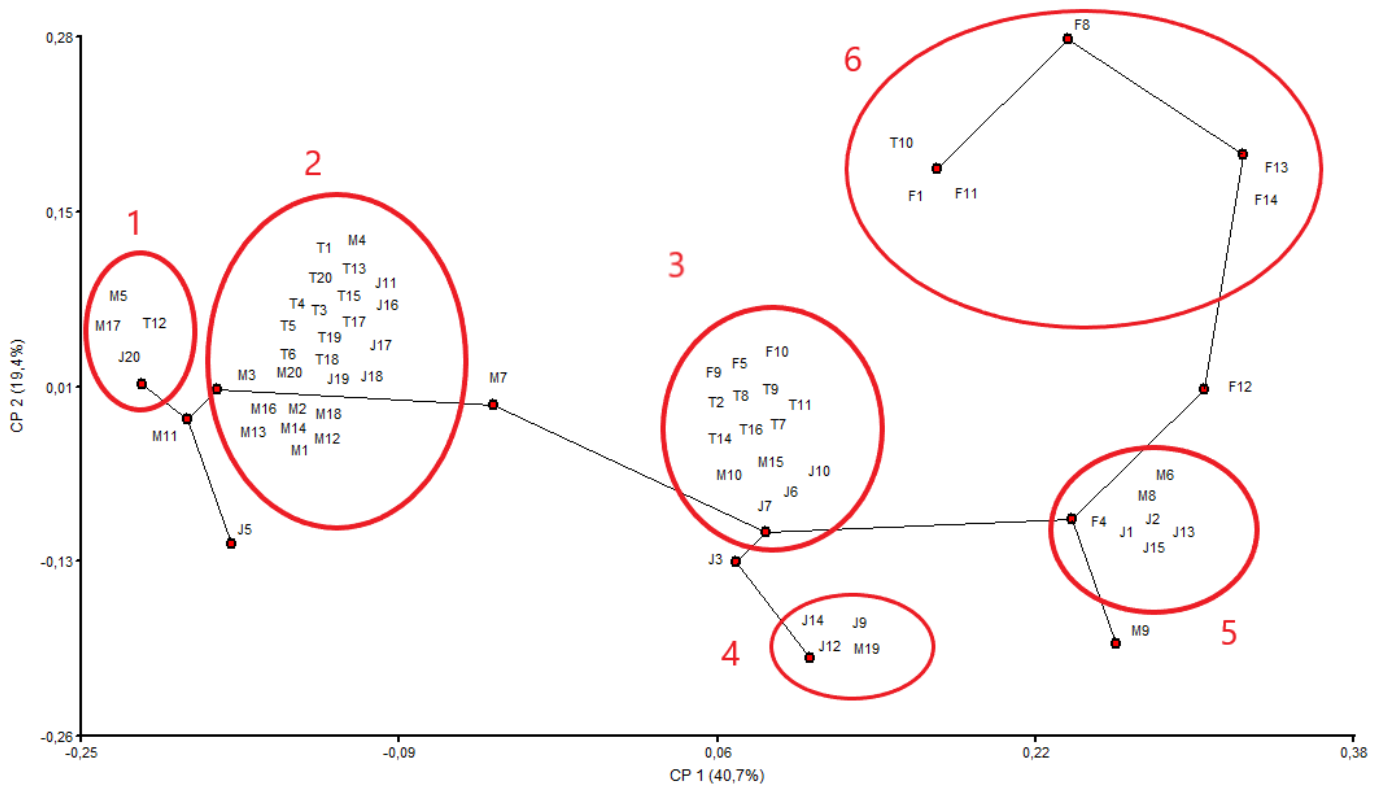


Figura 2. Biplot de Análisis de Coordenadas Principales (ACoP), a partir de una matriz de similitud *Simple Matching*, de 75 plantas de *S. rebaudiana* del banco activo de germoplasma de la EEA Famaillá, INTA, en base a nueve caracteres cualitativos. Las plantas se identifican por provincia de origen: Tucumán (T), Jujuy (J), Misiones (M) y Formosa (F).

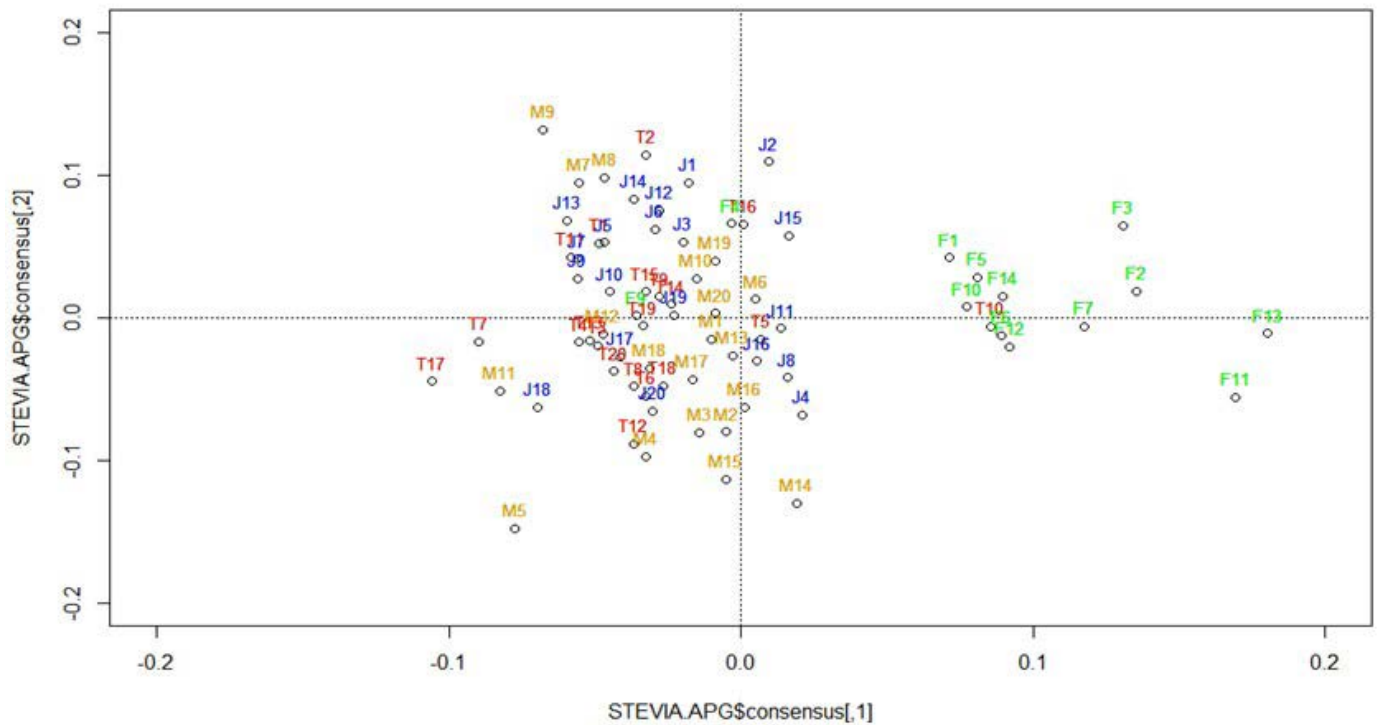


Figura 3. Gráfico consenso del Análisis de Procrustes Generalizado (APG) para cinco caracteres cuantitativos y nueve cualitativos de 75 plantas de *Stevia rebaudiana* del banco activo de germoplasma de la EEA Famaillá, INTA. Provincia de origen por color: Tucumán (rojo), Jujuy (azul), Misiones (naranja), Formosa (verde).

Tabla 4. Parámetros de diversidad genética basados en 18 marcadores *EST-SSR* en siete introducciones de *Stevia rebaudiana* del banco activo de germoplasma de la EEA Famaillá, INTA.

Introducción	N	Na	Ne	Ho	He	P
Fo13	15	1,944	1,944	0,944	0,472	94,44
Ju13	9	7,000	4,671	0,741	0,750	100,00
Ju21	9	5,222	3,326	0,670	0,660	100,00
Mi13	9	5,889	3,967	0,716	0,722	100,00
Mi21	4	4,000	3,114	0,759	0,652	100,00
Tu13	10	7,444	5,019	0,797	0,772	100,00
Tu21	17	7,833	4,700	0,744	0,762	100,00

El Ne por locus varió entre 1,94 para la introducción Fo13 y 5,01 para Tu13. La media para todas las introducciones fue 3,82. En relación con las medidas de heterocigosis, para las siete introducciones se obtuvo una Ho entre 0,67 y 0,94 (media de 0,76); la He varió entre 0,47 y 0,77 (media de 0,68).

Respecto al porcentaje de loci polimórfico (P), el mayor valor (100%) fue encontrado en Ju13, Ju21, Mi13, Mi21, Tu13 y Tu21, mientras que el menor valor (94,44%) correspondió a Fo13.

Comparación entre introducciones

En la prueba de comparaciones múltiples (Tabla 5) se observa que la introducción Tu13 tiene una heterocigosis esperada (He) media de 0,77, estadísticamente mayor a la del resto, seguida por Tu21 (0,76) y Ju13 (0,75); la menor He corresponde a la introducción F13 (0,47). Por otro lado, la heterocigosis observada (Ho) de la introducción Fo13 (0,94) fue estadísticamente mayor que la del resto, mientras que la de Ju21 (0,67) fue la menor. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre Tu21 y Ju13. Para ambos parámetros, Fo13 se diferenció del resto de las introducciones.

Niveles de similitud genética entre introducciones

Las relaciones de distancia genética entre las introducciones (Tabla 6) fueron establecidas mediante el índice de identidad genética de Nei (1972). Las distancias fueron ampliamente variables, observándose el valor más bajo entre Tu13 y Tu21 (0,18), y el valor más alto entre Fo13 y Ju21 (1,14). Asimismo, se observan altos valores de distancia entre las introducciones de Fo13 y Mi21 (0,83), y entre Fo13 y Tu21 (0,69). Se observaron

menores distancias entre Tu21 y Ju13 (0,21), así como entre Tu13 y Ju13 (0,26).

Análisis de la varianza molecular (AMOVA)

En el AMOVA (Tabla 7), la mayor fuente de variación respecto a la variación total observada fue “individuos

Tabla 5. Comparaciones múltiples (prueba de Friedman) para heterocigosis esperada (He) y heterocigosis observada (Ho) de siete introducciones de *S. rebaudiana* del banco activo de germoplasma de la EEA Famaillá, INTA, obtenidos con 18 marcadores moleculares *EST-SSRs*.

Introducción	Parámetro	
	He	Ho
Tu13	0,772 ^a	0,797 ^b
Tu21	0,762 ^{ab}	0,744 ^{bc}
Ju13	0,750 ^{ab}	0,741 ^{bc}
Ju21	0,660 ^c	0,670 ^c
Mi13	0,722 ^b	0,716 ^{bc}
Mi21	0,652 ^c	0,759 ^{bc}
Fo13	0,472 ^d	0,944 ^a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 6. Matriz de distancia genética de Nei entre siete introducciones *S. rebaudiana* del banco activo de germoplasma de la EEA Famaillá, INTA, basadas en 18 marcadores EST-SSRs.

Fo13	Ju13	Ju21	Mi13	Mi21	Tu13	Tu21	
0,000							Fo13
0,463	0,000						Ju13
1,137	0,448	0,000					Ju21
0,671	0,281	0,509	0,000				Mi13
0,827	0,500	0,521	0,315	0,000			Mi21
0,475	0,255	0,345	0,318	0,371	0,000		Tu13
0,693	0,211	0,282	0,298	0,341	0,183	0,000	Tu21

Tabla 7. Análisis molecular de la varianza (AMOVA), en base a 18 marcadores EST-SSRs, en 73 plantas de siete introducciones de *S. rebaudiana* del banco activo de germoplasma de la EEA Famaillá, INTA.

Fuente de variación	GL	SC	SCM	Est. Var.	%
Entre provincias	3	206,171	68,724	2,402	15%
Entre introducciones	3	69,940	23,313	1,254	8%
Dentro de introducciones	66	790,341	11,975	11,975	77%
Total	72	1066,452		15,631	100%
Fst	0,234	P-valor: 0,001			

dentro de las introducciones” (77%); el componente “entre provincias” aportó 15%, y el menor aporte correspondió a “entre introducciones dentro de provincias” (8%).

Análisis de Coordenadas Principales de plantas individuales

En el Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) se estudiaron las relaciones de proximidad entre los 73 individuos de las siete introducciones (Figura 4). La Coordenada 1 explicó el 17,35 % de la variación total y la Coordenada 2 el 6,19 %. En la Figura 4 se observa una separación de Fo13 respecto de las otras introducciones, con las plantas muy próximas entre sí. Las plantas de las introducciones Tu13, Tu21, Ju13, Ju21, Mi13 y Mi21 se

encuentran entremezcladas, y algunas de ellas (M1, M2, M3 y T8) se separan de los grupos principales.

Análisis de conglomerados

El dendograma resultante del método de agrupamiento *Neighbor-Joining* con distancia genética *Jaccard*, se presenta en la Figura 5. No se observa un claro agrupamiento de las plantas por provincia de origen, a excepción de aquellas de Formosa, que se agruparon separadamente del resto. La planta T8 se encuentra separada diferencialmente del grupo principal; así mismo, las plantas M5, M6, M21-1, J4, J9, y T10 aparecen separadas de ese gran grupo. Las introducciones aparecen entremezcladas, como en la caracterización morfológica previamente presentada.

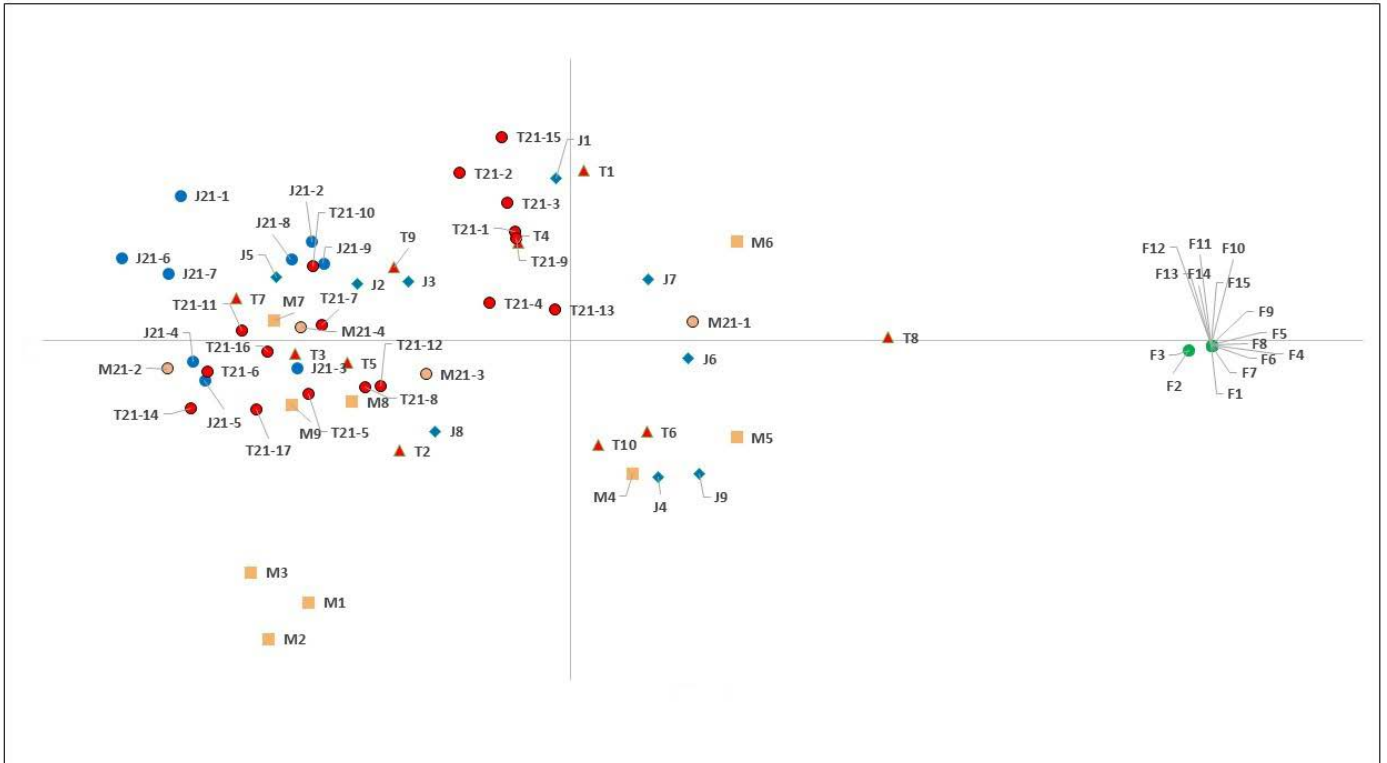


Figura 4. Análisis de coordenadas principales (ACoP) de 73 plantas de *S. rebaudiana* del banco activo de germoplasma de la EEA Famaillá, INTA, analizadas mediante 18 marcadores *EST-SSR*. Provincia de origen por color: Tucumán (rojo), Jujuy (azul), Misiones (naranja), Formosa (verde).

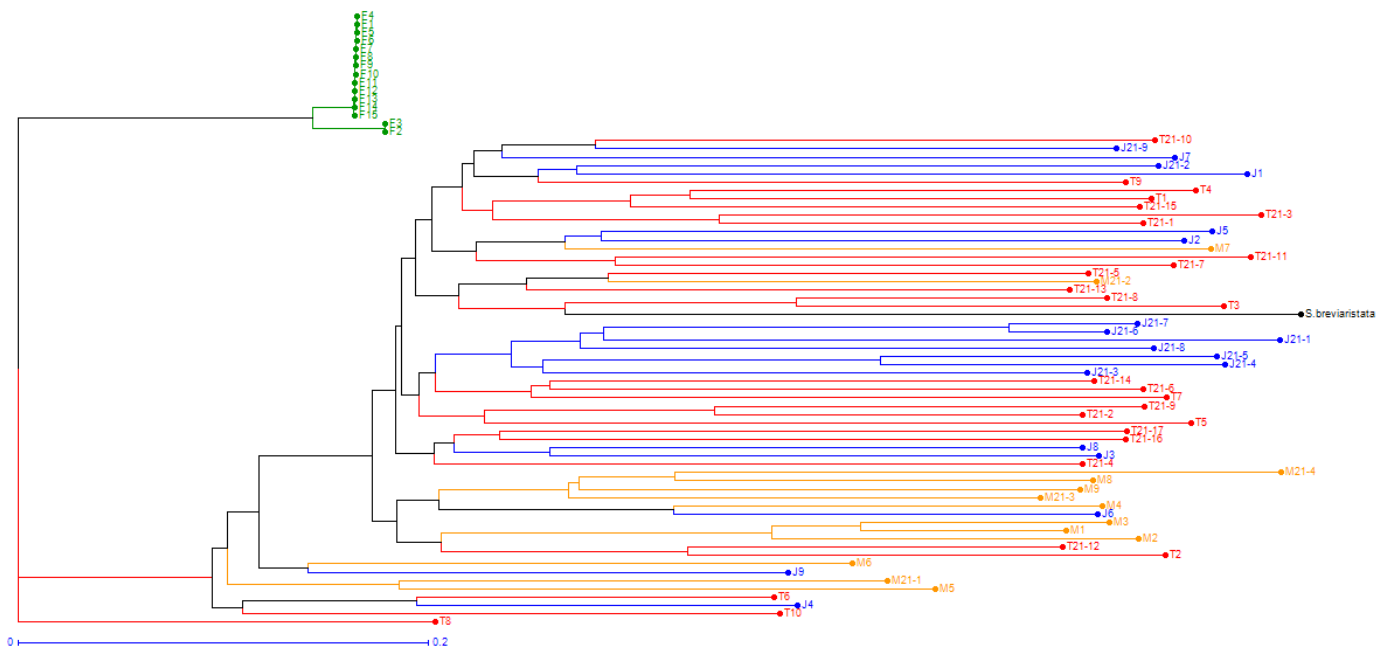


Figura 5. Dendrograma *Neighbor-Joining* basado en distancia genética *Jaccard*, mostrando las relaciones entre las 73 plantas de *S. rebaudiana* del banco activo de germoplasma de la EEA Famaillá, INTA y una planta de *Stevia breviflora*. La longitud de los brazos es proporcional a la distancia entre los nodos. Provincia de origen por color: Tucumán (rojo), Jujuy (azul), Misiones (naranja), Formosa (verde).

DISCUSIÓN

Caracterización morfológica

En varios países, por ej., Brasil, Francia, Egipto, Turquía, Argentina, se ha realizado la caracterización morfológica de germoplasma de *Stevia rebaudiana* (Oliveira *et al.*, 2004; Guerrero *et al.*, 2015; Abdelsalam *et al.*, 2016; Felipe *et al.*, 2018; Hastoy *et al.*, 2019 Kumari *et al.*, 2018). En Argentina se realizó la caracterización de germoplasma introducido en la provincia de Misiones (Guerrero *et al.*, 2015); sin embargo, las introducciones disponibles en el banco activo de germoplasma de la EEA Famaillá, INTA, en la provincia Tucumán no han sido caracterizadas. Por ello, este trabajo representa un estudio preliminar de la variabilidad morfológica y de la diversidad genética para marcadores *EST-SSRs* conservada en dicho banco activo.

Los resultados de la caracterización morfológica obtenidos en el presente trabajo a través del análisis multivariado de 75 plantas mostraron una débil separación entre las plantas de Tucumán, Jujuy, y Misiones. Las plantas de Formosa, por otro lado, fueron morfológicamente variables a simple vista, y se diferenciaron de las plantas de las otras tres provincias, principalmente por las variables altura de planta y relación largo/ancho de lámina. El Análisis de Procrustes Generalizado (APG) confirmó que las plantas de Formosa son morfológicamente diferentes a las de Tucumán, Jujuy y Misiones, las cuales poseen más caracteres en común. Esta falta de separación entre las introducciones de Tucumán, Jujuy y Misiones podría deberse a una falta de selección por parte de los agricultores que introdujeron plantas desde Paraguay o a que las plantas provienen de semillas y, por lo tanto, poseen genotipos muy variables. Asimismo, las plantas de Formosa que se agrupan en forma conjunta, podrían ser genotipos idénticos o muy emparentados, lo cual se corroboró en el análisis molecular del presente trabajo.

La aplicación de la técnica de APG presentó ventajas desde el punto de vista de la interpretación, dado que dicha técnica ofrece una representación gráfica de los individuos tomando en forma conjunta los caracteres morfológicos cuantitativos y cualitativos. Zuliani *et al.* (2012) compararon las técnicas de Análisis Factorial Múltiple y APG para caracterizar 31 poblaciones de maíz con 10 variables cuantitativas en dos ambientes, y concluyeron que cualquiera de ellas provee una alta concordancia entre las configuraciones consenso.

Los caracteres foliares tienen importancia en la selección de genotipos de *S. rebaudiana* debido a que en las hojas se acumula el mayor porcentaje de esteviolglicósidos y es el órgano de interés comercial. En el presente trabajo se tomaron los datos de longitud y ancho de lámina porque ambas variables están incluidas como descriptores de la especie, sin embargo, para el análisis multivariado se tomó el índice entre el largo y

el ancho de lámina, ya que esta relación no varía ante posibles interacciones del genotipo con el ambiente (Tsukaya, 2002). En *S. rebaudiana* se realizaron estudios de caracteres foliares pero más orientados a evaluaciones de rendimiento, como ser: rendimiento de hoja fresca y seca (Felipe *et al.*, 2018), área foliar (Srivastava y Srivastava, 2014), y número de hojas expandidas (Guerrero *et al.*, 2015), caracteres que podrían ser tenidos en cuenta en futuros análisis de progenies de cruzamientos controlados para el mejoramiento genético.

Caracterización molecular

Los resultados del análisis de los datos obtenidos con 18 marcadores *EST-SSRs* para los parámetros de diversidad genética (Na, Ne, Ho, He y P), así como el ACoP, reflejaron una alta diversidad genética en los individuos de las introducciones analizadas en este trabajo. Los individuos de Formosa coleccionados en 2013 (Fo13) mostraron el mismo patrón de bandas para todos los loci, y presentaron una frecuencia de 0,5 para dos loci, agrupándose separadamente del resto de las introducciones en el ACoP. Esto podría ser debido a que los genotipos de Formosa derivan de plantas clonadas y/o de plantas con una base genética muy estrecha, o bien a que los marcadores utilizados fueron insuficientes para capturar la diversidad genética de dichos genotipos. Para dilucidar la causa, se deberían utilizar otros tipos de marcadores y realizar nuevas colecciones en otros sitios. Cabe señalar que las colecciones de 2013 y 2021 se realizaron en campos de productores que introdujeron plantas de *S. rebaudiana* desde Paraguay en diferentes años y las reprodujeron a partir de semillas y/o esquejes, sin embargo, se desconoce la forma en que los productores recolectaron las plantas en sus lugares de origen.

Para los parámetros de diversidad genética obtenidos, las introducciones Tu13, Tu21 y Ju13 presentaron los valores más altos de números de alelos (Na y Ne) y de heterocigosis observada (Ho), mientras que Fo13 presentó los menores valores para los 18 marcadores *EST-SSRs* utilizados en este estudio. Estos resultados serían de utilidad en la planificación de nuevos viajes de recolección con el fin de: (a) incrementar la diversidad genética de germoplasma que se conserva en el banco activo de la EEA Famaillá, INTA, y (b) planificar cruzamientos con fines de mejoramiento genético.

Bhandawat *et al.* (2014), en la India, analizaron 40 genotipos de *S. rebaudiana* de diferentes orígenes con 52 *EST-SSRs*, y obtuvieron un heterocigosis esperada (He) de 0,63 y una Ho de 0,80. Dicha relación entre Ho y He es coincidente con nuestros resultados, lo que podría deberse al modo preponderante de reproducción en los materiales analizados en ambos estudios (sexual por

alogamia, promovida por la incompatibilidad polen-pistilo).

Asimismo, Cosson *et al.* (2019) analizaron la diversidad genética de 145 genotipos de *S. rebaudiana* de diferentes orígenes con 18 *EST-SSRs* y determinaron medias de H_o de 0,68 y de H_e de 0,76. En el presente estudio, con los mismos marcadores utilizados por Cosson *et al.* (2019), las medias fueron de 0,76 para la H_o y de 0,68 para la H_e .

A partir del análisis de varianza molecular (AMOVA) se detectó que, de la varianza genética total, la atribuida a las plantas dentro de las introducciones es mayor (77%) que entre las introducciones (8%) y entre provincias (15%). Similares resultados respecto a la distribución de la varianza total en *S. rebaudiana*, y en base a los mismos marcadores *EST-SSRs* usados en este trabajo, fueron obtenidos por Cosson *et al.* (2019) cuando analizaron 145 individuos de diferentes países, los que se agruparon en tres poblaciones con una variación de 98,46% dentro de las mismas y de 1,54% entre ellas.

Como se expresó previamente, se desconoce el origen de las plantas cuyos esquejes fueron utilizados por los productores para implantar los cultivos que se muestrearon para iniciar el banco de germoplasma de la EEA Famaillá, INTA. Esas plantas podrían haberse originado por reproducción sexual o asexual en poblaciones naturales, y haber sido luego multiplicadas sin selección previa o luego de algún tipo de selección. Camadro y Rimieri (2021) expresaron que altos niveles de variabilidad observados dentro de poblaciones naturales se relacionan con sistemas reproductivos que promueven la alogamia total o parcial, que es la forma preponderante de reproducción natural de *S. rebaudiana*, promovida por un sistema de autoincompatibilidad esporofítica. De allí que el mayor porcentaje de la varianza total se haya observado dentro de las introducciones. Este resultado es de fundamental importancia para desarrollar estrategias de muestreo, ya que se debería aumentar el número de plantas recolectadas en cada sitio para tratar de capturar una mayor proporción de la diversidad genética presente en la población o en el cultivo.

En el análisis de coordenadas principales (ACoP), las dos primeras coordenadas explicaron el 36,0% de la variación total. En el gráfico biplot del ACoP, se observa una separación de la introducción de Formosa respecto a las otras introducciones. Los individuos de las introducciones de Tucumán, Jujuy y Misiones se encuentran entremezclados. Como señalan Camadro y Rimieri (2021), en poblaciones naturales, los tipos y modos de reproducción no son necesariamente estrictos en un grupo dado de plantas en un determinado ambiente, y por ello, se debe prever el muestreo de una misma población en más de un año y, preferentemente, en condiciones ambientales contrastantes. A este respecto, se deberían usar muestras de una misma población recolectadas en diferentes momentos para

conformar la introducción, tratando de maximizar la diversidad genética capturada en un sitio determinado, como han señalado Leofanti *et al.* (2021) para las papas silvestres (*Solanum* sp.). Sería recomendable tomar esta propuesta en consideración al introducir nuevos genotipos de *S. rebaudiana* en el banco activo de la EEA Famaillá, INTA.

En el análisis de conglomerados, las plantas de Formosa formaron un grupo separado del resto de los individuos, en concordancia con los resultados obtenidos en el ACoP. Las plantas de los otros orígenes geográficos se entremezclaron, sin que las introducciones que se recolectaron en una misma provincia se agruparan. Similares resultados informaron Cosson *et al.* (2019) en su análisis de introducciones de varios países, las que no se agruparon por origen, sino que, por el contrario, mostraron una amplia dispersión (Por ej., los genotipos provenientes de Argentina se agruparon con los provenientes de Cuba). En dicho trabajo no se indicó cuál fue la forma original de recolección de los genotipos analizados. En nuestro estudio se pudo observar que *S. breviaristata*, usada como fuera de grupo, se ubicó dentro del grupo de plantas de Tucumán.

Los 18 marcadores *EST-SSRs* utilizados en el presente trabajo resultaron altamente polimórficos y robustos para evaluar la diversidad genética de los 73 individuos de *S. rebaudiana* del banco activo de la EEA Famaillá, INTA. La utilidad de los marcadores *EST-SSRs* en *S. rebaudiana* fue demostrada previamente por varios autores (Brandle *et al.*, 2002; Bhandawat *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2015; Cosson *et al.*, 2019). En estos trabajos, se informó un número de alelos por locus de 2 y 15, con un promedio de 4,7 alelos; esos valores son similares a los detectados en el presente trabajo, de 2 y 11 alelos por locus, con un promedio de 5,6 alelos.

CONCLUSIONES

El presente estudio proporciona conocimientos particulares y específicos sobre germoplasma de *Stevia rebaudiana* conservado en la provincia de Tucumán. Los descriptores morfológicos mostraron que hay una limitada diferenciación entre las plantas de Tucumán, Jujuy y Misiones; sin embargo, fue posible diferenciar las plantas de Formosa de las anteriores, principalmente en base a los caracteres diámetro de tallo y número de dientes por lámina foliar. La caracterización molecular de las plantas analizadas reveló una alta diversidad genética dentro de las introducciones. Las plantas de Formosa no pudieron diferenciarse en base a los marcadores *EST-SSRs* utilizados. Por ello, sería recomendable probar nuevos marcadores moleculares del tipo *SSRs*, como así también realizar nuevas colecciones para aumentar la diversidad genética de las introducciones de Formosa en el banco activo de la EEA Famaillá, INTA. En base a

los resultados obtenidos y con fines de mejoramiento genético, se podría avanzar en la realización de cruzamientos controlados entre aquellos genotipos que han presentado diferencias genotípicas y morfológicas. En este sentido habría que considerar especialmente los genotipos de Formosa, que conforman un grupo muy diferente del resto y poseen características deseables en arquitectura de planta (tallos erectos) y en rendimiento en producción de hojas (hojas grandes).

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelsalam N.R., Haraz A.S.M., Khalid A.E., Saleh M.S.H., Elsheikh A.E.A. (2016) Genetic Improvement through Selection of Different *Stevia rebaudiana* Genotypes. Alexandria Science Exchange Journal: An International Quarterly Journal of Science Agricultural Environments, 37(January-March): 10–25. <https://doi.org/10.21608/asejaiqsae.2016.1902>
- Angelini L.G., Martini A., Passera B., Tavarini S. (2018) Cultivation of *Stevia rebaudiana* Bertoni and Associated Challenges. En: Mérillon J.-

Tabla suplementaria. Identificación de plantas del banco activo de germoplasma de la EEA Famaillá, INTA, utilizadas en la caracterización morfológica y molecular.

Provincia	Año de colección	Denominación			Provincia	Año de colección	Denominación		
		Banco activo	Cmor ¹	Cmol ²			Banco activo	Cmor ¹	Cmol ²
Tucumán	2013	T1.1	T1	T1	Jujuy	2013	J4.7	J15	
Tucumán	2013	T1.10	T2	T2	Jujuy	2013	J4.8	J16	
Tucumán	2013	T1.13	T3		Jujuy	2013	J5.3	J17	
Tucumán	2013	T1.16	T4		Jujuy	2013	J5.5	J18	
Tucumán	2013	T1.2	T5	T9	Jujuy	2013	J5.6	J19	
Tucumán	2013	T1.3	T6	T3	Jujuy	2013	J5.7	J20	J7
Tucumán	2013	T1.4	T7	T4	Jujuy	2013	J6.1		J2
Tucumán	2013	T1.5	T8		Jujuy	2013	J6.5		J8
Tucumán	2013	T1.6	T9	T5	Jujuy	2013	J6.16		J3
Tucumán	2013	T1.7	T10	T6	Jujuy	2013	J6.20		
Tucumán	2013	T1.8			Jujuy	2013	J7.5		
Tucumán	2013	T2.10			Jujuy	2013	J8.12		J5
Tucumán	2013	T2.11	T11		Jujuy	2013	J8.5		
Tucumán	2013	T2.12	T12	T10	Jujuy	2013	J8.7		J4
Tucumán	2013	T2.14	T13	T8	Jujuy	2013	J8.9		
Tucumán	2013	T2.18	T14	T7	Misiones	2013	M10.2	M1	
Tucumán	2013	T2.2	T15		Misiones	2013	M10.4	M2	
Tucumán	2013	T2.3			Misiones	2013	M10.6		M2
Tucumán	2013	T2.4	T16		Misiones	2013	M10.7	M3	M1
Tucumán	2013	T2.5			Misiones	2013	M10.8	M4	M5
Tucumán	2013	T2.6	T17		Misiones	2013	M10.1		M3
Tucumán	2013	T2.7	T18		Misiones	2013	M11.10	M5	M8
Tucumán	2013	T2.9	T19		Misiones	2013	M11.11	M6	M7
Tucumán	2013	T2.15	T20		Misiones	2013	M11.2	M7	
Tucumán	2013	T2.16			Misiones	2013	M11.3	M8	
Jujuy	2013	J3.10	J1		Misiones	2013	M11.4	M9	
Jujuy	2013	J3.12	J2		Misiones	2013	M11.5	M10	
Jujuy	2013	J3.14	J3		Misiones	2013	M11.6	M11	
Jujuy	2013	J3.15	J4		Misiones	2013	M11.7	M12	
Jujuy	2013	J3.16	J5		Misiones	2013	M9.12		
Jujuy	2013	J3.2	J6		Misiones	2013	M9.13	M13	M4
Jujuy	2013	J3.3	J7		Misiones	2013	M9.17	M14	M9
Jujuy	2013	J3.6	J8		Misiones	2013	M9.18	M15	
Jujuy	2013	J3.22	J9		Misiones	2013	M9.1	M16	
Jujuy	2013	J3.9	J10	J6	Misiones	2013	M9.3	M17	
Jujuy	2013	J4.15	J11		Misiones	2013	M9.4	M18	
Jujuy	2013	J4.16	J12	J9	Misiones	2013	M9.5	M19	
Jujuy	2013	J4.3		J1	Misiones	2013	M9.7	M20	
Jujuy	2013	J4.4	J13		Misiones	2013	M9.8		M6
Jujuy	2013	J4.5	J14		Misiones	2013	M9.9		

Tabla suplementaria (continúa). Identificación de plantas del banco activo de germoplasma de la EEA Famaillá, INTA, utilizadas en la caracterización morfológica y molecular.

Provincia	Año de colección	Denominación		
		Banco activo	Cmor ¹	Cmol ²
Formosa	2013	F12.1	F1	F1
Formosa	2013	F12.2	F2	F2
Formosa	2013	F12.3	F3	F3
Formosa	2013	F12.4	F4	F4
Formosa	2013	F12.5	F5	F5
Formosa	2013	F12.6	F6	F6
Formosa	2013	F12.7	F7	F7
Formosa	2013	F12.8	F8	F8
Formosa	2013	F12.9	F9	F9
Formosa	2013	F12.10	F10	F10
Formosa	2013	F12.11	F11	F11
Formosa	2013	F12.12	F12	F12
Formosa	2013	F12.13	F13	F13
Formosa	2013	F12.14	F14	F14
Formosa	2013	F12.15	F15	F15
Formosa	2013	F4		
Formosa	2013	F6		
Jujuy	2021			J21-1
Jujuy	2021			J21-2
Jujuy	2021			J21-3
Jujuy	2021			J21-4
Jujuy	2021			J21-5
Jujuy	2021			J21-6
Jujuy	2021			J21-7
Jujuy	2021			J21-8
Jujuy	2021			J21-9
Misiones	2021			M21-1
Misiones	2021			M21-2
Misiones	2021			M21-3
Misiones	2021			M21-4
Tucumán	2021			T21-1
Tucumán	2021			T21-2
Tucumán	2021			T21-3
Tucumán	2021			T21-4
Tucumán	2021			T21-5
Tucumán	2021			T21-6
Tucumán	2021			T21-7
Tucumán	2021			T21-8
Tucumán	2021			T21-9
Tucumán	2021			T21-10
Tucumán	2021			T21-11
Tucumán	2021			T21-12
Tucumán	2021			T21-13
Tucumán	2021			T21-14
Tucumán	2021			T21-15
Tucumán	2021			T21-16
Tucumán	2021			T21-17

M. y Ramawat KG (Eds.) Sweeteners: Pharmacology, Biotechnology, and Applications. Springer, pp. 35–85. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27027-2_8

Balzarini M.G., Di Rienzo J.A. (2016) InfoGen Versión 2016. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.info-gen.com.ar>

Bhandawat A., Sharma H., Nag A., Singh S., Singh A., Kumar P. (2014) Functionally Relevant Novel Microsatellite Markers for Efficient Genotyping in *Stevia Rebaudiana* Bertoni. *J Genet* 93: 75–81.

Bramardi S. (2002) Análisis multivariado. Su aplicación en la caracterización de recursos genéticos. *Universidad Comahue*, 1(60).

Brandle J.E., Richman A., Swanson A.K., Chapman B.P. (2002) Leaf ESTs from *Stevia Rebaudiana*: A Resource for Gene Discovery in Diterpene Synthesis. *Plant Molecular Biology* 50(4–5): 613–22.

Brandle J.E., Telmer P.G. (2007) Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry* 68 (14): 1855-1863.

Budeguer C.J., Camadro E.L., Erazzú, L.E. (2024) Reproductive biology and pollen-pistil compatibility relationships in an Argentinian collection of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *BAG, J. basic appl. genet.* 35(1): 65-72. <https://doi.org/10.35407/bag.2024.35.01.05>

Camadro E.L., Rimieri P. (2021) Ex Situ Plant germplasm conservation revised at the light of mechanisms and methods of genetics. *BAG, J. basic appl. genet.* 32(1): 11–24. <https://doi.org/10.35407/bag.2020.32.01.02>

Conal, Comisión Nacional de Alimentos (2012) Resolución Conjunta 86/2012 y 73/2012. <https://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/195000-199999/198769/norma.htm>. (consultado en marzo 2025)

Cosson P., Hastoy C., Erazzú L.E., Budeguer C.J., Boutié P., Rolin D., Schurdi-Levraud V. (2019) Genetic Diversity and Population Structure of the Sweet Leaf Herb, *Stevia Rebaudiana* B., Cultivated and Landraces Germplasm Assessed by EST-SSRs Genotyping and Steviol Glycosides Phenotyping. *BMC Plant Biology* 19(1).

Cuadras C.M. (2007) Nuevos métodos de análisis multivariante. CMC editions, Barcelona, España.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2020) InfoStat versión 2020. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>

Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. (1992) Analysis of Molecular Variance Inferred from Metric Distances among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics* 131(2): 479-491. <https://doi.org/10.1093/genetics/131.2.479>

Falasca S., Ulberich A. (2005). El agroclima de *Stevia rebaudiana* Bertoni en Argentina. *Revista Geográfica* 2005: 35-47.

Felipe F., Pereira G.P., Machado M.P., Kanis L.A., Deschamps C. (2018) Characterization of *Stevia rebaudiana* Bertoni Accessions Cultivated in Southern Brazil. *Journal of Agricultural Science*, 10(3): 353. <https://doi.org/10.5539/jas.v10n3p353>

Franco T.L., Hidalgo R. (2003) Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. *Boletín técnico* N° 8. IPGRI, Cali, Colombia.

Gasmalla M.A., Yang R., Hua X. (2014) *Stevia rebaudiana* Bertoni: An alternative Sugar Replacer and Its Application in Food Industry. *Food Engineering Reviews* 6(4): 150-162.

Geuns J.M.C. (2003) Stevioside, molecules of interest. *Laboratory of Plant Physiology, Catholic University of Leuven, Leuven.*

- Guerrero D., Bar A., Kryvenki M., Dominguez M. (2015) Evaluación morfológica y fenológica de 10 clones de yerba dulce (*Stevia rebaudiana*) según el tiempo térmico. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 41(3): 317–324.
- Hastoy C. (2018) Caractérisation de la variabilité phénotypique de ressources génétiques de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) : analyse des composantes du rendement et critères de sélection en condition de production. Tesis Doctoral, Université de Bordeaux.
- Hastoy C., Cosson P., Cavaignac S., Boutie P., Waffo-Teguo P., Rolin D., Schurdi-Levraud V. (2019) Deciphering performances of fifteen genotypes of *Stevia rebaudiana* in southwestern France through dry biomass and steviol glycoside evaluation. *Industrial Crops and Products*, 128: 607–619.
- INASE, Instituto Nacional de Semillas (2025). Cultivos industriales. <https://www.argentina.gob.ar/variedades-vegetales/descriptor-de-cultivares/cultivos-industriales> (consultado en noviembre 2025)
- Karaköse H. (2012) Phytochemical Characterization of *Stevia rebaudiana*. Doctoral thesis, Jacobs University Bremen.
- Kaur R., Neha S., Ravinder R. (2015) Identification and Functional Annotation of Expressed Sequence Tags Based SSR Markers of *Stevia rebaudiana*. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 39(3): 439–50.
- Kolb N., Herrera J. L., Ferreyra D. J., Uliana R. F. (2001) Analysis of sweet diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*: Improved HPLC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10): 4538–4541.
- Kryvenki M., Kosky R. G., Guerrero D., Dominguez M., Reyes M. (2008) Obtención de callos con estructuras embriogénicas de *Stevia rebaudiana* Bert. en medios de cultivo semisólidos. *Biotechnología Vegetal* 8(2): 91–98.
- Kumari N., Raina R., Sharma Y.P. (2018) Interpopulation variations in morphochemical characteristics of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Turkish Journal of Botany* 42(4): 491–501.
- Leofanti G.A., Camadro E.L., Erazzú L.E. (2021) Over time variation in microsatellite patterns in a natural wild potato population from northwest Argentina. *Crop Science* 61(4): 2628–2638.
- Oliveira V.M., Forni-Martins E.R., Magalhães P.M., Alves M.N. (2004) Chromosomal and morphological studies of diploid and polyploid cytotypes of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Eupatorieae, Asteraceae). *Genetics and Molecular Biology* 27(2): 215–222.
- Peakall R., Smouse P. (2006) GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research. *Molecular Ecology Notes* 6(1): 288–95.
- Perrier X., Jacquemoud-Collet J.P. (2006) DARwin software 2006. <http://darwin.cirad.fr/>
- R Core Team (2019) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Srivastava S., Srivastava M. (2014) Morphological Changes and Antioxidant Activity of *Stevia rebaudiana* under Water Stress. *American Journal of Plant Sciences* 5(November): 3417–3422.
- Tsukaya H. (2002) Leaf anatomy of a rheophyte, *Dendranthema yoshinaganthum* (Asteraceae), and of hybrids between *D. yoshinaganthum* and a closely related non-rheophyte, *D. indicum*. *Journal of Plant Research* 115(5): 329–333.
- Zuccardi R.B. Fadda G.S. (1985) Bosquejo agroecológico de la Provincia de Tucumán. Misc. N° 86. Ed. Facultad de Agronomía y Zootecnia UNT.
- Zuliani P., Lavalle A., Bramardi S.J., Defacio R. (2012) Caracterización de poblaciones nativas de maíz mediante Análisis de Procrustes Generalizado y Análisis Factorial Múltiple. *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias* 44(1): 49–64.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Sergio Bramardi (Universidad Nacional del Comahue) por la orientación brindada en el análisis multivariado.

FINANCIAMIENTO

El presente trabajo fue posible gracias al financiamiento por el programa ECOSUD (ECOS A19AAD01) y por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Proyecto Mejoramiento de Cultivos Industriales PI071.