



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

**REQUERIMIENTO
DE NITRÓGENO EN LA
PRODUCCIÓN DE *Stevia*
rebaudiana Bertoni EN
HIDROPONÍA E INVERNADERO**

LUZ ERÉNDIRA SALGADO CORDERO

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2013

La presente tesis titulada: "REQUERIMIENTO DE NITRÓGENO EN LA PRODUCCIÓN DE *Stevia rebaudiana* Bertoni EN HIDROPONÍA E INVERNADERO", realizada por la alumna: **Luz Eréndira Salgado Cordero** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS
EDAFOLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR



CONSEJERO:

Dr. Gabriel Alcántar González

ASESOR:



Dr. Manuel Sandoval Villa

ASESOR:



M.C. Alfonso Muratalla Lúa

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Noviembre de 2013

REQUERIMIENTO DE NITRÓGENO EN LA PRODUCCIÓN DE *Stevia rebaudiana* Bertoni EN HIDROPONÍA E INVERNADERO

Luz Eréndira Salgado Cordero, MC.
Colegio de Postgraduados, 2013

RESUMEN

La *Stevia rebaudiana*, también llamada hierba dulce o Ka'a-He'e, es una herbácea semiperenne de la flora paraguaya perteneciente a la familia Asteraceae. La estevia es empleada por la industria alimentaria y farmacéutica debido a compuestos glucósidos que se obtienen a partir de la hoja, los cuales tienen un poder edulcorante hasta 250 a 300 veces mayor a la de la sacarosa. La presente investigación se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de diferentes niveles de nitrato sobre la producción de biomasa, la concentración foliar y requerimiento de nitrógeno (N) en plantas de estevia en hidroponía. El experimento se realizó en un invernadero del Colegio de Postgraduados, en Texcoco, México, se utilizó riego por goteo y un sustrato con una mezcla 70:30 de tezontle rojo con fibra de coco, en un diseño experimental en bloques completos al azar. Se evaluaron los efectos de cuatro concentraciones de NO_3^- (12, 9, 6 y 3 meq L^{-1}) en la solución nutritiva con cuatro repeticiones cada una. Se realizaron tres cortes a los 30, 60 y 75 días después del inicio de la aplicación de tratamientos (ddt). Se realizaron análisis de varianza y comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$) con SAS 9.0 y análisis de regresión lineal y no lineal. Las variables evaluadas fueron: número de tallos, altura de la planta, diámetro del tallo, peso fresco y seco de tallos y hojas, área foliar, lectura SPAD y concentración de N en la planta, en hojas recientemente maduras y en el total de hojas. El tratamiento con 9 meq L^{-1} de NO_3^- originó las mejores respuestas en las variables evaluadas; con este se logró la mayor altura de la planta a los 75 ddt y más número de tallos en los tres muestreos realizados; se produjo el mayor peso fresco y seco (total, de hojas y de tallo) y área foliar a los 30 y 60 ddt. Una lectura SPAD de 40 se asoció a la mayor acumulación de peso seco de hoja a los 30 ddt, a los 60 ddt fue de 54, y a los 75 ddt fue de 57; la concentración de N en hojas recientemente maduras cuando la planta alcanzó mayor peso seco total fue de 3.4% de N a los 30 ddt, 3.5% a los 60 ddt y 3.0% a los 75 ddt. El requerimiento interno de N bajo el mejor tratamiento (9 meq L^{-1}) fue de 0.55 g de N/planta a los 30 ddt, de 1.72 g a los 60 ddt y 2.15 g a los 75 ddt, el valor del índice de cosecha a los 60 ddt fue de 0.47, es decir, de la materia seca producida el 47% corresponde a las hojas al final del ciclo.

Palabras clave:

Stevia, requerimiento interno de nitrógeno, rendimiento.

ABSTRACT

Stevia rebaudiana, also called sweet grass or Ka'a - He'e, is a semi-perennial herbaceous plant belonging to the Asteraceae family. Stevia is used by the food and pharmaceutical industry due to its glycosides compounds obtained from the leaf, which have a sweetening power up to 250-300 times that of sucrose. This research was conducted to evaluate the effect of different levels of nitrate on biomass production, leaf nitrogen (N) concentration and requirement in stevia plants in hydroponics. The experiment was conducted in a greenhouse of the Colegio de Postgraduados, Texcoco, Mexico. Drip irrigation and a substrate with a 70:30 mixture of red volcanic rock with coconut fiber, in an experimental design in randomized complete blocks was used. The effect of four concentrations of NO_3^- (12, 9, 6 and 3 meq L^{-1}) in nutrient solution with four replications each were evaluated. Three harvests at 30, 60 and 75 days after initiation of the treatment application (dat) variables were analyzed by an analysis of variance and mean separation procedure by Tukey ($\alpha = 0.05$) with SAS 9.0 and analysis of linear and nonlinear regression. The variables evaluated were: number of stems, plant height, stem diameter, fresh and dry weight of stems and leaves, leaf area, SPAD readings and concentration of N in the plant, in recently mature leaves and in total leaves. Treatment with 9 meq L^{-1} of NO_3^- resulted in the best responses in the variables evaluated, with the greater plant height at 75 dat and number of stems in the three samplings. In the same treatment we found the greatest fresh and dry weight (total, leaf and stem) and leaf area at 30 and 60 dat. A SPAD reading of 40 was associated with increased accumulation of dry weight of leaf at 30 dat, and at 60 dat it was 54, and at 75 dat it was 57. The concentration of N in recently mature leaves when the plant achieved greater dry weight was 3.4% of N at 30 dat, 3.5% at 60 dat and 3.0% at 75 dat. The internal N requirement under the best treatment (9 meq L^{-1} of NO_3^-) was 0.55 g N/plant at 30 dat, 1.72 g at 60 dat and 2.15 g at 75 dat. The harvest index at 60 dat was 0.47, that is, 47% of dry matter produced corresponded to leaves by the end of the cycle.

Keywords:

Stevia, internal nitrogen requirement, yield.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser mi fuente de energía abundante.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo otorgado para realizar mis estudios de postgrado.

Al Colegio de Postgraduados, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de postgrado que serán de gran utilidad para mi desempeño laboral.

Al Dr. Gabriel Alcántar González por su apoyo en mi formación académica en el Postgrado de Edafología y por la paciencia y precisión en la dirección de la presente investigación.

Al Dr. Manuel Sandoval Villa por sus valiosas aportaciones en todas las fases de la presente investigación.

Al M. en C. Alfonso Muratalla Lúa por brindarme la seguridad de trabajar con una especie exótica, gracias por compartir conmigo sus conocimientos.

A la Dra. Ma. de las Nieves Rodríguez Mendoza por sus sugerencias durante la fase de campo.

Al personal del Laboratorio de Nutrición Vegetal, Fertilidad de Suelos y Botánica por el apoyo y facilidades que me brindaron.

A todos los maestros y doctores que participaron y contribuyeron de manera valiosa en mi formación como Maestra en Ciencias.

A mis amigos y compañeros de estudio de postgrado, por su amistad, alegría y entusiasmo.

A mis amigos y amigas de siempre por estar al pendiente de mí, apoyándome y por compartir juntos experiencias de vida.

DEDICATORIA

A mi hijo Ezequiel, gracias por tu hermosa y contundente existencia en mi vida, eres mi alegría.

A mis padres Sara y Camerino, los amo y agradezco infinitamente su apoyo incondicional y paciencia que me han dado a manos llenas, Dios los bendiga.

A mis hermanos Ana, Jorge, Arturo, Enrique e Ismael, porque soy muy afortunada de tenerlos en mi vida, mis amigos y compañeros de batalla, los quiero mucho.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1. Generalidades de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	2
2.1.1. Origen y distribución	2
2.1.2. Descripción botánica	2
2.2. Valor nutricional y medicinal de <i>Stevia rebaudiana</i>	3
2.3. Importancia económica.....	5
2.4. Características de los glucósidos de <i>Stevia rebaudiana</i>	7
2.5. Aspectos de cultivo de <i>Stevia rebaudiana</i>	8
2.5.1. Requerimientos edafoclimáticos.....	8
2.5.2. Propagación.....	9
2.5.3. Siembra	9
2.5.4. Poda de formación	10
2.5.6. Fotoperiodo y tiempo de floración	10
2.5.7. Fertilización	10
2.5.8. Plagas y enfermedades	11
2.5.9. Prácticas culturales.....	11
2.5.10. Cosecha	11
2.5.11. Dormancia	12
2.5.12. Secado, beneficio y empaque	12
2.5.13. Industrialización	13
2.6. Nitrógeno en la producción de estevia	13
2.7. Solución nutritiva Universal Steiner	15
III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	16

3.1. Objetivo general.....	16
3.1.1. Objetivos particulares	16
3.2. Hipótesis general.....	16
3.2.1. Hipótesis particulares.....	16
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1. Localización del experimento.....	17
4.2. Material vegetal	17
4.3. Sustrato	17
4.4. Manejo del cultivo.....	17
4.5. Descripción de tratamientos.....	19
4.6. Diseño experimental	20
4.7. Variables evaluadas.....	21
4.8. Análisis de los datos	22
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
5.1. Producción de biomasa	23
5.1.1. Diámetro del tallo, altura de la planta y número de tallos	23
5.1.2. Peso fresco de tallo, hoja y total	24
5.1.3. Peso seco total, hoja, tallo y raíz	27
5.1.4. Área foliar	29
5.2. Efecto de los niveles de nitrato sobre la concentración de nitrógeno en tejido vegetal del cultivo de estevia	32
5.2.1. Concentración de nitrógeno en planta y lectura SPAD.....	32
5.3. Recomendación de suministro de nitrógeno	43
5.3.1. Índice de cosecha (IC).....	44
VI. CONCLUSIONES.....	46
VII. RECOMENDACIONES.....	47
VIII. LITERATURA CITADA	48

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Análisis de hojas secas de Stevia (g 100 g ⁻¹ peso seco).	3
Cuadro 2. Composición de aminoácidos en hojas de <i>Stevia rebaudiana</i>	4
Cuadro 3. Composición de soluciones nutritivas de los cuatro tratamientos aplicadas en el experimento.	19
Cuadro 4. Formulación de soluciones nutritivas empleadas en el cultivo de estevia en g L ⁻¹ modificando la solución universal de Steiner.	20
Cuadro 5. Promedio de diámetro del tallo, altura de la planta y número de tallos en plantas de estevia.	23
Cuadro 6. Peso fresco de parte aérea, hojas y tallo en plantas de estevia y relación hoja/tallo.	25
Cuadro 7. Peso seco de parte aérea, hojas, tallo y raíz en plantas de estevia.....	27
Cuadro 8. Área foliar en plantas de estevia.	29
Cuadro 9. Nitrógeno total en planta completa, hoja recientemente madura, hojas y lectura SPAD.	32
Cuadro10. Parámetros de concentración de nitrógeno total, nitrógeno en HRM y nitrógeno en el total de hojas, y lectura SPAD asociado a la mejor respuesta de peso seco en plantas de estevia.	42
Cuadro 11. Extracción de nitrógeno (kg ha ⁻¹) y rendimiento (Mg ha ⁻¹) de hoja seca para tres densidades de plantación de estevia.	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Arreglo espacial de las unidades experimentales dentro de los bloques.	20
Figura 2. Altura de planta (cm) de estevia a dosis crecientes de nitrógeno condiciones de invernadero e hidroponía	24
Figura 3. Peso fresco de parte aérea (A), hojas (B) y tallo (C) en plantas de estevia expuestas a dosis crecientes de nitrógeno bajo condiciones de hidroponía e invernadero.	26
Figura 4. Peso seco de parte aérea (A), hojas (B), tallo (C) y raíz (D) en plantas de estevia expuestas a dosis crecientes de nitrógeno bajo condiciones de hidroponía e invernadero.	28

Figura 5. Relación entre el incremento en el área foliar (cm ² /planta) y las dosis crecientes de N en plantas de estevia bajo condiciones de hidroponía e invernadero.	30
Figura 6. Incrementos en el área foliar a diferentes concentraciones de nitrógeno para los muestreos a 30 y 60 ddt en plantas de estevia bajo condiciones de hidroponía e invernadero.	31
Figura 7. Relación entre el incremento en el área foliar y la acumulación de peso seco de la parte aérea en plantas de estevia bajo condiciones de hidroponía e invernadero.	31
Figura 8. Lectura SPAD (A) y porcentaje de nitrógeno en hojas recientemente maduras (B) en plantas de estevia expuestas a dosis crecientes de nitrógeno bajo condiciones de hidroponía e invernadero.	33
Figura 9. Relación entre la lectura SPAD y el porcentaje de nitrógeno en plantas de estevia expuestas a dosis crecientes de nitrógeno bajo condiciones de hidroponía e invernadero.	34
Figura 10. Relación entre la Lectura SPAD y el peso fresco y seco de la parte aérea en plantas de estevia bajo condiciones de hidroponía e invernadero.	36
Figura 11. Tendencia de la lectura SPAD, porcentaje de nitrógeno de la parte aérea, (HRM) hojas recientemente maduras y hojas en plantas de estevia bajo condiciones de hidroponía e invernadero.	37
Figura 12. Correlación entre la Lectura SPAD y el peso seco de hojas (A) y total (B) en plantas de estevia bajo condiciones de hidroponía e invernadero.	39
Figura 13. Correlación entre la concentración total de nitrógeno y el peso seco total en plantas de estevia bajo condiciones de hidroponía e invernadero.	40
Figura 14. Correlación entre la concentración de nitrógeno en hojas recientemente maduras y el peso seco de hojas (A) y total (B) en plantas de estevia bajo condiciones de hidroponía e invernadero.	41
Figura 15. Correlación entre la concentración de nitrógeno en hojas y el peso seco total en plantas de estevia bajo condiciones de hidroponía e invernadero.	42

REQUERIMIENTO DE NITRÓGENO EN LA PRODUCCIÓN DE *Stevia rebaudiana* Bertoni EN HIDROPONÍA E INVERNADERO

I. INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales es una práctica tradicional en la población mundial, el cual se ha fomentado de generación en generación. Entre las especies con uso medicinal destaca el caso de la *Stevia rebaudiana* Bertoni por su alto poder edulcorante sin aportar calorías.

La *Stevia rebaudiana*, también llamada hierba dulce o Ka'a-He'e, es una herbácea perenne de la familia de las Asteraceae y es originaria de la Sierra de Amambay entre el oeste de Brasil y noreste de Paraguay; era usada por el grupo indígena Tupi-Guarani, para endulzar bebidas y mezclarla con otras plantas medicinales. Jarma *et al.* (2006) explican que es hasta 1899, cuando Moisés Santiago Bertoni obtiene ejemplares de estevia por los propios indígenas del lugar, los cuales cultivó y clasificó botánicamente en 1905.

Las hojas frescas de estevia maceradas son 15 veces más dulces que el azúcar de caña y secas son 30 veces más dulces; sus principios activos son el esteviósido y el rebaudiósido, glucósidos a los que se les atribuye el sabor dulce de la planta. El extracto puro de estos glucósidos es hasta 300 veces más dulce que la sacarosa. La estevia es usada por la industria alimenticia y farmacéutica de varios países para endulzar diversos productos.

La creciente necesidad de usar sustitutos de azúcar, que además no sean edulcorantes sintéticos como el aspartame, sacarinas o ciclamatos, hace de la estevia una planta con un gran potencial para cubrir esta necesidad, ya que además de su muy alto poder edulcorante y que no aporta calorías, tiene otras funciones benéficas en la salud, como regular la presión arterial, ser digestiva, diurética y antiácida, ayuda a eliminar las toxinas, además de ser antimicrobiana y antioxidante (Kim *et al.*, 2010).

La siguiente propuesta de investigación pretendió contribuir al desarrollo del conocimiento sobre aspectos técnicos del manejo nutricional del nitrógeno, ya que no hay información suficiente al respecto en *Stevia rebaudiana* bajo condiciones de hidroponía e invernadero, con el fin de apoyar su producción intensiva en México.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades de *Stevia rebaudiana* Bertoni

2.1.1. Origen y distribución

La *S. rebaudiana* es una planta originaria de la región de Amambay en el Noreste de Paraguay y sus colindancias con Brasil y Argentina (Brandle y Telmer, 2007), entre las latitudes 23° y 24° Sur, donde era conocida y usada por las tribus Guaranís desde hace cientos de años para endulzar los tés de yerba mate y medicinales y alimentos (Yadav *et al.*, 2011; Lemus-Moncada *et al.*, 2012).

En 1943 se exportaron las primeras semillas al Reino Unido, pero éstas no pudieron ser cultivadas; en 1968 fueron exportadas a Japón, donde fue cultivada y se dio a conocer y se dispersó al mundo; su cultivo se ha introducido a varios países de los diferentes continentes (Yadav *et al.*, 2011; Lemus-Moncada *et al.*, 2012).

2.1.2. Descripción botánica

Stevia es un género de cerca de 230 especies de hierbas y arbustos de la familia Asteraceae, de las cuales solo las especies *rebaudiana* y *phlebophylla* producen glucósidos esteviol (Lemus-Moncada *et al.*, 2012; Brandle y Telmer, 2007).

La estevia fue clasificada botánicamente en 1899 por Moisés Santiago Bertoni con el nombre de *Eupatorium rebaudianum*, pero en 1905 se cambió a *Stevia rebaudiana* (Lemus-Moncada *et al.*, 2012).

S. rebaudiana es una hierba semiperenne, con una altura de crecimiento de un metro, tiene un sistema radicular extensivo, tallos quebradizos y hojas elípticas. Las hojas son sésiles, de 3 a 4 cm de largo, elongado-lanceoladas o de forma espatulada con la punta

roma, margen serrado desde la mitad a la punta y abajo entera. El haz de la hoja es ligeramente pubescente granular. El tallo es leñoso y ligeramente pubescente en la parte inferior. Los rizomas son raíces ligeramente ramificadas. Las flores son pentámeras, pequeñas y blancas con una “garganta” púrpura pálido. Los capítulos son indeterminados, irregulares y cimas simpodiales (tipo candelabro). Los pequeños floretes blancos se presentan en pequeños corimbos de 2 a 6 floretes, organizados en panículas desatadas. El fruto es un aquenio en forma de uso con cinco nervaduras (Lemus-Moncada *et al.*, 2012).

2.2. Valor nutricional y medicinal de *Stevia rebaudiana*

Lemus-Moncada *et al.* (2012) indica que los beneficios asociados a las hojas de *Stevia* se le atribuye a su composición nutricional, la cual es un buena fuente de carbohidratos, proteína y fibra cruda, que promueven el bienestar y reducen el riesgo de ciertas enfermedades (Cuadro 1).

Cuadro 1. Análisis de hojas secas de *Stevia* (g 100 g⁻¹ peso seco).

Componente	Referencias						
	Mishra <i>et al.</i> (2010)	Goyal <i>et al.</i> (2010)	Serio (2010)	Savita <i>et al.</i> (2004)	Abou-Arab <i>et al.</i> (2010)	Tadhani y Subhash (2006)	Kaushik <i>et al.</i> (2010)
Humedad	7	4.65	ND	7	5.37	ND	7.7
Proteína	10	11.2	11.2	9.8	11.40	20.4	12
Grasa	3	1.9	5.6	2.5	3.73	4.34	2.7
Ceniza	11	6.3	ND	10.5	7.41	13.1	8.4
Carbohidratos	52	ND	53	52	61.9	35.2	ND
Fibra cruda	18	15.2	15	18.5	15.5	ND	ND

ND, No determinado

Fuente: Lemus-Moncada *et al.*, 2012.

Por otra parte, en el aceite de las hojas de *Stevia* se identificaron seis ácidos grasos, tales como ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico; de los cuales, los ácidos linolénico y linoleico son considerados como ácidos grasos esenciales (Lemus-Moncada *et al.*, 2012).

Asimismo, de las hojas de *Stevia* se han identificado de nueve a diecisiete aminoácidos. En el Cuadro 2, se indican los aminoácidos encontrados en hojas de *Stevia*, por lo que

éstas pueden ser un recurso valioso para productos que promuevan la salud (Lemus-Moncada *et al.*, 2012).

Lemus-Moncada *et al.* (2012) señalan que la presencia de importantes productos secundarios vegetales en las hojas de estevia contribuye a su valor medicinal, como son el ácido oxálico y los taninos, que le confiere actividad antioxidante y propiedades inmunológicas.

Cuadro 2. Composición de aminoácidos en hojas de *Stevia rebaudiana*.

Aminoácido esencial g 100g ⁻¹ m.s.		Aminoácido no esencial g 100g ⁻¹ m.s.	
Arginina ^a	0.45	Aspartato	0.37
Lisina	0.70	Serina	0.46
Histidina	1.13	Glutamina	0.43
Fenilalanina	0.77	Prolina	0.17
Leucina	0.98	Glicina	0.25
Metionina	1.45	Alanina	0.56
Valina	0.64	Cistina ^b	0.40
Treonina	1.13	Tirosina ^b	1.08
Isoleucina	0.42		
Total	7.67	Total	3.72

^a No es considerado como aminoácido indispensable

^b Considerados indispensable bajo situaciones específicas

Fuente: Abou-Arab *et al.*, 2010 citado por Lemus-Moncada *et al.*, 2012.)

La estevia y el esteviósido han sido usados como substitutos de la sacarosa, para el tratamiento de diabetes mellitus, obesidad, hipertensión y prevención de caries; también se le atribuyen beneficios terapéuticos como anti-hipoglucemiante, anti-hipertensivo, anti-inflamatorio, anti-tumoral, anti-diarreico, anticonceptivo, diurético y efectos inmunomodulatorios (Lemus-Moncada *et al.*, 2012; Yadav *et al.*, 2011).

En los estudios clínicos de estevia de Abudula *et al.* (2008) se indica que el rebaudiósido A puede reducir los niveles de azúcar en sangre en diabéticos Tipo II al potenciar la secreción de insulina, al igual que el esteviosido, solo que éste último requiere mayor concentración para mostrar un efecto significativo; de tal forma que en concentraciones de 10⁻¹³ a 10⁻⁷ M de rebaudiosido A en concentraciones de alta glucosa (16.7 mM) potencializan la secreción de insulina, mientras que el esteviosido logra un efecto similar a a concentraciones de 10⁻⁶ M.

Destaca que la acción sobre el páncreas de estos glucósidos diterpénicos se presentan cuando se tiene concentraciones altas de glucosa y por el contrario no hay un efecto estimulador cuando las concentraciones son bajas (Abudula *et al.*, 2008).

Los resultados de la investigación de Abudula *et al.* (2008) indican que el rebaudiósido A puede ofrecer una ventaja terapéutica sobre el uso de las sulfonilureas (un tipo de medicamento para diabéticos que actúa en la liberación de insulina de las células beta del páncreas), por presentar menor riesgo de causar hipoglucemia.

Carakostas *et al.* (2008) señalaron que la estevia al tener una larga historia tanto de uso terapéutico y alimenticio como de investigaciones ha ayudado a un mayor conocimiento y consumo, pero también ha obstaculizado el desarrollo de edulcorantes a base de estevia en países con sistemas de reglamentación de los alimentos, de tal suerte que existe una serie de intentos fallidos para llevar con éxito este edulcorante natural en el mercado en muchos países debido a las dudas sobre especificaciones, seguridad y efectos especiales en la población.

Carakostas *et al.* (2008), a través de la revisión de resultados de estudios de investigación recientemente concluidos sobre la toxicidad general y reproductiva del rebaudiósido A, demuestran la seguridad a la ingesta de altos niveles de glucósidos de esteviol en la dieta, dado que hallaron evidencia de que el rebaudiósido A purificado y producido con las especificaciones de calidad alimentaria y de acuerdo con las buenas prácticas de manufactura es seguro para el consumo humano, dado que no tiene ningún efecto ni en la presión arterial o en la homeostasis de la glucosa.

2.3. Importancia económica

Los glucósidos de esteviol han sido de gran interés científico y comercial por su intensa dulzura y su alto poder edulcorante desde que se dieron a conocer en 1899 en Europa, en la actualidad son ampliamente usados en productos alimenticios y suplementos dietéticos en muchos países alrededor del mundo (Brandle y Telmer, 2007).

El mercado de la estevia se enfoca principalmente en el área de alimentos (edulcorantes no calóricos y saborizantes), aunque recientemente se han desarrollado otros usos en el campo terapéutico y agropecuario (Instituto Boliviano de Comercio Exterior, 2011). Como

edulcorante, la estevia se emplea como endulzante de mesa y la industria la utiliza en la composición de sus productos como bebidas, panadería, confitería y lácteos.

Para el año 2008 se estimó que la estevia representó económicamente un total de un mil trescientos millones de dólares y se espera que alcance 8.2 mil millones de dólares para el año 2015 (Instituto Boliviano de Comercio Exterior, 2011).

En el reporte de la industria de la estevia 2009¹, indican que la preferencia por sector industrial que emplea la estevia es de 40% para bebidas, 28% para alimentos, 12% farmacéuticos, 12% lácteos, y 8% otras aplicaciones.

La Organización Mundial de la Salud ha reconocido que no es genotóxico y asignó una ingesta diaria admisible temporal de glucósidos de esteviol de 0-2 mg kg⁻¹ de peso corporal (Beneford *et al.*, 2006).

La FAO declaró que la estevia es un producto seguro para el consumo humano en junio del 2004 (Zubiate, 2007). La FDA de Estados Unidos prohibió su uso en 1991, pero en 1995 autorizó su comercialización como suplemento alimenticio². Por otra parte, la European Food Safety Authority (EFSA) confirmó que el extracto edulcorante del glucósido steviol de la *Stevia* es seguro para su uso en alimentos y bebidas (Food Business Week, via VerticalNews.com).

Para el año 2009 se estimó que se cultivaron en Asia 21,750 ha, en Sudamérica 2,220 ha, en América del Norte 130 ha, en África y Oceanía 190 ha y en Europa 50 ha. En ese año los principales productores de estevia fueron China (20,000 ha), Paraguay (1,700 ha), India (600 ha), Tailandia (350 ha), Taiwán (350 ha) e Indonesia (300 ha), pero su cultivo también se ha introducido en Argentina, Colombia, Brasil, México, Canadá, Estados Unidos, España, Grecia, Japón, Sudáfrica, Kenia, Egipto y Australia (Ministerio de Industria y Comercio Paraguay, 2011). Ochoa (2010) señaló que se cultivan 24,000 ha con estevia a nivel mundial, y de estas el 83% se encuentra en China.

¹ <http://www.steviaworldforum.com/downloads/SteviaReport2009.pdf>. Consulta 10 marzo de 2012.

² http://es.wikipedia.org/wiki/Stevia_rebaudiana. Consulta 11 de febrero de 2011.

Los principales compradores a nivel internacional son Japón, China, Corea, Canadá, Australia, Unión Europea, USA, Brasil y Paraguay. En Japón, el consumo de la estevia se realiza desde hace 40 años y actualmente cubre el 40% de su mercado nacional de edulcorantes.

2.4. Características de los glucósidos de *Stevia rebaudiana*

En 1909 se aisló el endulzante principal conocido como esteviósido, y hasta 1952 se determinó su estructura química como un glucósido diterpeno. En la década de los 70's se aislaron otros componentes, entre ellos el rebaudisido A, el cual tiene un poder edulcorante mayor que el esteviosido (Lemus-Moncada *et al.*, 2012).

El esteviosido es descrito como un glucósido compuesto por tres moléculas de glucosa adjuntas a una aglicona, la mitad esteviol. El esteviol es la aglicona común y columna vertebral de los glucósidos dulces de estevia (Lemus-Moncada *et al.*, 2012). Los glucósidos esteviol son diterpenos tetracíclicos derivados del mismo precursor kaurenoide de la vía del ácido giberélico (Brandle y Telmer, 2007).

Brandle y Telmer (2012) explicaron que la acumulación de glucósidos en la fase final es a través de la translocación del esteviol glucosilado fuera del citosol y su posterior introducción a la vacuola; de tal manera que se conoce que los glucósidos de esteviol se producen en la vacuola, pero es un proceso que aún no se conoce.

Los glucósidos diterpenos presentes en las hojas de *Stevia* son los responsables del sabor dulce de sus tejidos. Los glucósidos son esteviósido, esteviolbiósido, rebaudiósido A, B, C, D, E y dulcósido A y B (Leung y Foster, 1996; Lemus-Moncada *et al.*, 2012).

La dulzura de cualquiera de los compuestos de stevia es mayor que la de la sacarosa, éstos son para el esteviósido de 250 a 300 veces más dulce que la sacarosa, el rebaudiósido A (250-450 veces), rebaudiósido B (300-350 veces), rebaudiósido C (50-120 veces), rebaudiósido D (250-450 veces), rebaudiósido E (150-300 veces), dulcósido A (50-120 veces) y esteviolbiósido (100 a 125 veces). En promedio, los endulzantes de los glucósidos de esteviol son 250-300 veces más que la sacarosa, con baja solubilidad en agua y alto punto de fusión (Lemus-Moncada *et al.*, 2012).

El esteviósido es el más abundante de los glucósidos de la estevia con el 4-13% g/g de hoja seca encontrado en la planta; seguido del rebaudiósido A (2-4% g/g), rebaudiósido C (1-2%) y dulcósido A (0.4-0.7% g/g); mientras que el esteviolbiósido, rebaudiósido B, D, E y F también identificados en los extractos de las hojas, son constituyentes menores (Lemus-Moncada *et al.*, 2012).

El contenido de los glucósidos encontrados en las hojas de estevia pueden variar dependiendo de la variedad (Lemus-Moncada *et al.*, 2012) y de factores ambientales como son las condiciones del suelo, métodos de irrigación, luz solar, pureza del aire, prácticas agrícolas, sanidad, procesamiento y cosecha (Yadav *et al.*, 2011).

2.5. Aspectos de cultivo de *Stevia rebaudiana*

La *S. rebaudiana* crece, en su lugar de origen, en los bordes de pantanos o en praderas sobre suelos con mantos freáticos someros; en el Valle del Río Monday de la región montañosa de Amambay las altitudes van de 200 a 500 m; el clima se considera como subtropical subhúmedo con rangos de temperaturas de -6 a 43 °C, con un promedio de 23 °C, y precipitaciones desde 1500 a 1800 mm por año (Yadav *et al.*, 2011).

2.5.1. Requerimientos edafoclimáticos

FUNCFOS (2000) señala en su manual de la estevia que las condiciones agroclimáticas más favorables para el cultivo son las siguientes:

Altitud:	300 – 1200 m
Precipitación:	1000 a 2000 mm
Temperatura:	Rango de 24 °C a 28 °C
Vientos:	Moderados
Requerimientos de luz:	13 h
Topografía:	Plana, no mayor de 8% de pendiente
Suelos:	Franco arenosos, franco arcillosos Buen drenaje y pH de 5.5 a 6.5

2.5.2. Propagación

Existen varios métodos de propagación de la estevia. Uno de ellos es la propagación sexual por semillas, no es muy recomendable por el bajo porcentaje de germinación y la gran variabilidad fenotípica que puede resultar en una baja calidad de la hoja (Taware *et al.*, 2010; FUNCFOS, 2000).

La propagación vegetativa puede ser a través del cultivo de tejidos (Vázquez, 2012) así como la propagación por callos que representan una buena posibilidad para la producción de esteviósidos (Taware *et al.*, 2010), pero la baja aclimatación y supervivencia de los plantines en campo limita su uso (Zubiate, 2007). Otro método de propagación vegetativa es por medio de esquejes que permiten mantener las características deseadas; el enraizamiento de los esquejes se calcula mayor al 95% (FUNCFOS, 2000). Esta última es la más recomendada (Muratalla, 2013).

La reproducción asexual con esquejes terminales de ramas secundarias, terciarias y cuaternarias debe provenir de plantas madres, previamente seleccionadas por sus características como vigorosidad, rusticidad y productividad. La obtención de esquejes se hace de ramas con un mínimo de 5 pares de hojas abiertas y opuestas (las hojas alternas indican un estado de floración, por lo que el esqueje no debe presentar flor o botón floral) y de 8 a 10 cm de longitud; la reproducción de esquejes se hace en camas de enraizamiento. (FUNCFOS, 2000).

2.5.3. Siembra

La siembra a campo abierto se sugiere realizarla en los meses cuando inician las lluvias. FUNCFOS (2000) recomienda trasplantar el plantín enterrando los dos primeros pares de hojas, para permitir los rebrotes desde la superficie del suelo; el plantín se desinfecta con una solución de yodo orgánico (se sumerge el plantín por 30 segundos en la solución).

La densidad de siembra recomendada en campo es variable en función de las condiciones agroclimatológicas; para el caribe colombiano se recomienda de 180 mil a 200 mil plantas/ha; con una distribución de 20 cm entre hileras y 16 a 14 cm entre plantas (FUNCFOS, 2000); en Perú se recomienda 145 mil plantas ha⁻¹, FIRA (2010) señala que se requieren 42,000 plantas ha⁻¹, mientras que Ramírez (2012) recomienda de 100 mil a

120 mil plantas ha⁻¹ para el estado de Sinaloa. Bajo cubierta plástica en los Valles Altos de México se recomiendan 66,600 plantas ha⁻¹ (Muratalla, 2013).

2.5.4. Poda de formación

FUNCFOS (2000) señala que la poda de formación es una de las labores de mayor importancia para el buen desarrollo del cultivo. Esta comienza en las camas enraizadoras. Se eliminan los brotes floreciendo o por florecer, para lo cual se poda el ápice (yema terminal) de la plántula y se dejan solamente dos pares de hojas, dicha labor se realiza continuamente en campo para impedir una dominancia de ramas florales.

Se realiza una segunda poda de las ramas primarias, pueden dejarse de 2 a 3 pares de hojas, para favorecer la ramificación de la planta; se hacen otras podas si es necesario hasta que la planta alcance 25 cm de alto. Después de cada poda se hace un control fitosanitario preventivo.

2.5.6. Fotoperiodo y tiempo de floración

La estevia es una planta de día corto que florece de enero a marzo en el hemisferio sur y de septiembre a diciembre en el hemisferio norte. La floración bajo condiciones de día corto ocurre de los 54 a los 104 días siguientes al trasplante, dependiendo de la sensibilidad del cultivar al largo del día. La variabilidad de la sensibilidad al fotoperiodo es amplia, el rango va de 8 a 14 h; la floración es más precoz en fotoperiodos de 8 h, pero las plantas permanecen en estado vegetativo bajo un fotoperiodo de 8 h con noches interrumpidas (Yadav *et al.*, 2011).

2.5.7. Fertilización

FUNCFOS (2000) recomienda aplicar de 10 a 20 t ha⁻¹ de materia orgánica en la preparación de las camas de crecimiento. Con la aplicación suficiente de materia orgánica no es necesaria la aplicación de fertilizantes químicos durante todo el año.

Las necesidades nutritivas de la estevia, de acuerdo con FUNCFOS (2000) son: 103 kg de nitrógeno (N), 28 kg de fósforo (P), 83 kg de potasio (K) y trazas de magnesio, azufre, manganeso, cobre, zinc, boro, molibdeno, cobalto y cloro, entre otros.

2.5.8. Plagas y enfermedades

Jarma-Orozco *et al.* (2003) reportan que aislaron patógenos pertenecientes a los géneros *Fusarium*, *Sclerotium*, *Alternaria*, *Botriodiplodia*, *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Cercospora*, *Choanephora*, *Corinespora* y *Curvularia*, los cuales puede ser limitantes de la producción si no se da un manejo adecuado.

FUNCFOS (2000) indica que las principales plagas que se presentan son ácaros, áfidos y lepidópteros, éstos últimos se controlan con *Bacillus thuringensis*. En cuanto a las enfermedades, se encuentran la marchitez de la planta causada por hongos *Rhizoctonia* sp., *Sclerotium* sp., *Sclerotinia* sp., y *Fusarium* sp. En las hojas se puede presentar ataque de *Alternaria* sp. y *Septoria* sp., los cuales se controlan realizando una cosecha (poda) y establecer una densidad apropiada que no favorezca la alta humedad entre las plantas.

2.5.9. Prácticas culturales

Dado que el cultivo de estevia es para el consumo humano no es conveniente utilizar agroquímicos para controlar malezas, plagas o enfermedades, es preferible el uso de productos biológicos y métodos preventivos, físicos, manuales o mecánicos.

La planta de estevia no soporta periodos largos de sequía, por lo que es necesario aplicar riegos por goteo, y no riegos por aspersión, éstos últimos favorecen problemas fitosanitarios en los cultivos de estevia en campo; se recomienda una lámina de riego de 4 a 6 mm por semana dependiendo de las condiciones edafoclimáticas (FUNCFOS, 2000).

2.5.10. Cosecha

La cosecha se realiza en cuando se presenta un máximo de 5% de los botones florales (FUNCFOS, 2000). El corte se debe realizar en todas las plantas dejando únicamente de dos a tres pares de hojas (6 a 8 cm de la superficie del suelo). Es posible tener de 3 hasta 6 cosechas en el año, varían en tiempo y de la altitud y latitud, con un rendimiento de hoja seca de estevia es de 3 a 7 t ha⁻¹ (Zubiate, 2007).

La cantidad de hojas secas que pueden ser cosechadas varía de 15 a 35 g por planta (Mishra *et al.*, 2010). Serio (2010) reporta que una plantación de *S. rebaudiana* en una hectárea, en un corte puede producir entre 1000 y 1200 kg de hojas secas que contiene de 60 a 70 kg de esteviósido, lo cual es un rendimiento bajo comparado con la caña de azúcar. Sin embargo, 70 kg de esteviósido, logra ser 300 veces más dulce que la sacarosa, es equivalente a un rendimiento de 21,000 kg de azúcar por hectárea (Lemus-Moncada, 2012).

2.5.11. Dormancia

La dormancia, detención del crecimiento por causa de un factor externo a la planta, es una práctica que se sugiere para plantaciones en latitudes mayores a 8°, consiste en permitir la floración de la plantación a finales de octubre; una vez que la floración se haya dado en un 100% (noviembre), se debe cortar la planta sobre la superficie del suelo dejando 3 ó 4 cm (se elimina toda el área foliar). Al mes de realizada la poda, se corta el tallo seco de la planta. Durante la dormancia es necesario realizar las labores de fertilización y el control preventivo de patógenos en suelo (FUNCFOS, 2000).

2.5.12. Secado, beneficio y empaque

La calidad del producto final depende en gran medida del secado, que consiste en exponer las hojas al sol durante 4 a 8 horas continuas (dependiendo de la intensidad solar) o bien en un secador artificial, se extienden capas delgadas de ramas evitando el amontonamiento, el proceso de secado concluye cuando al apretar las hojas con la mano, éstas son quebradizas (FUNCFOS, 2000).

El beneficio es la práctica de quitar la mayoría de las hojas mediante el raspado de las ramas frescas o secas. Se deja terminar el secado de manera natural o por medio de un secador. Posteriormente, las hojas se prensan en pacas de 60x40x40 cm con un peso máximo de 50 kg; deben envolverse en papel parafinado para evitar el intercambio de humedad, y éstas se sellan con cinta adhesiva (FUNCFOS, 2000). Posteriormente las pacas las recibe la industria para su industrialización y empleo en diferentes productos.

2.5.13. Industrialización

La industrialización de la producción de estevia consiste en la extracción acuosa de los activos principales de las hojas de estevia, la extracción orgánica de los edulcorantes, la clarificación, cristalización y secado de los edulcorantes, la mezcla y empaque para su uso final (Lima *et al.*, 2004).

2.6. Nitrógeno en la producción de estevia

Das *et al.* (2009) explican que se ha reportado que el esteviosido es el principal constituyente de la estevia y que es altamente dependiente de las prácticas de cultivo, así como de las tecnologías de cultivo modernas. Zubiarte (2007) indica que la estevia no es muy exigente en macro y micronutrientes, recomienda que los suelos sean abonados con materia orgánica, para evitar el uso de fertilizantes sintéticos. Sin embargo, al ser un cultivo anual sus requerimientos nutricionales son moderados (Brandle *et al.*, 1998).

La utilización eficiente de nitrógeno es una meta esencial en el manejo de cultivos (Patil, 2010). Avila (2011) señaló que el exceso de nitrógeno en plántulas de estevia se caracteriza por la aparición de necrosis en ápice y bordes de hojas en dirección al peciolo, posteriormente afecta a los tallos, las hojas muertas tienen un enrollamiento hacia arriba, las hojas jóvenes presentan un encurvamiento hacia abajo, por último la necrosis se generaliza en las hojas medias y yema apical, lo que ocasiona la muerte de la planta, en tan solo seis días bajo tratamiento.

La deficiencia de nitrógeno en estevia se presenta con clorosis (color verde pálido o amarillento) en hojas inferiores, es decir, en hojas maduras; los síntomas se muestran inicialmente en el peciolo acompañado de necrosis con un encogimiento en el primer tercio de la hoja y con la presencia de sales en el segundo y tercer par de hojas; posteriormente se muestra en hojas medianas y superiores y se generaliza en toda la planta; se da una reducción del crecimiento (Avila, 2011; Utumi *et al.*, 1999).

La deficiencia de nitrógeno resulta en la menor producción de hojas y por tanto se tiene una menor producción de esteviosidos en las plantas de estevia (Utumi *et al.*, 1999; Lima

Filho *et al.*, 1997), pero la concentración de glucósidos no se afecta al provocar la deficiencia de nitrógeno (Jarma *et al.*, 2012).

Utumi *et al.* (1999) indica que los síntomas de deficiencia de nitrógeno en estevia son similares a los comúnmente verificados en la mayoría de las plantas.

Patil (2010) reportó en su investigación con estevia que el mejor tratamiento sobre altura, área foliar, clorofila, contenido de proteína y carbohidratos fue con una combinación de fertilizantes químicos (NPK) y vermicomposta.

Das *et al.* (2009) realizaron un estudio en la India sobre el efecto de la aplicación combinada de biofertilizantes (bacterias solubilizadoras de fósforo, *Azospirillum*, micorriza vesicular arbuscular) en el cultivo de estevia, encontraron que la disponibilidad de nitrógeno, fósforo y potasio incrementó en el suelo hasta el quinto mes del cultivo y al sexto mes ésta decreció en función del crecimiento de la planta de estevia. Asimismo, Borda-Molina *et al.* (2011) al estudiar la influencia de materia orgánica y *Azotobacter nigricans* en estevia encontraron que la concentración de 30 t ha⁻¹ de materia orgánica dio el mayor rendimiento de biomasa y la aplicación del biofertilizante tuvo una correlación positiva con la mineralización del compost y síntesis de glucósidos.

Jarma *et al.* (2006) determinó que la tasa de extracción de nitrógeno en un cultivo de estevia a una densidad de 100 mil plantas ha⁻¹ es de 24.5 kg ha⁻¹ de nitrógeno y 30.8 kg ha⁻¹ para las variedades Morita 1 y Morita 2, respectivamente.

Por su parte, Lima *et al.* (1997) estimaron que la demanda de nitrógeno para producir una tonelada de hojas secas de estevia es de 65 kg de nitrógeno. Chalapathi *et al.* (1999) explican que con la aplicación de 60 kg N/ha, 30 kg de P/ha y 45 kg K/ha, el cultivo de estevia logra altos rendimientos de hoja seca y simultáneamente mayor absorción de nutrientes.

Maheshwar (2005) concluyó que al aplicar 105 kg de nitrógeno ha⁻¹ es posible obtener el promedio mayor de altura en plantas de estevia, la mayor producción de materia seca (3.5 t ha⁻¹) y área foliar y retraso en días la presencia la primera floración. También Brandle *et*

a/. (1998) indican que se reporta en estudios en Japón que se requiere de 105 kg de nitrógeno para una hectárea y obtener un rendimiento alto.

2.7. Solución nutritiva Universal Steiner

La Solución nutritiva universal de Steiner se basa en la relación mutua entre aniones de nitrato, fosfato y sulfato (60:5:35) y la relación mutua entre cationes de potasio, calcio y magnesio (45:35:20), así como la relación de concentración total de iones; respetando dichas relaciones pueden darse diferentes “recetas” en las que resultarán valores de presión osmótica y pH distintos a 0.7 atm. y pH 6.5, indicados en la solución nutritiva universal.

Steiner (1984) señaló que dentro del rango de dichas relaciones mutuas es posible que cualquier cultivo se desarrolle muy bien. La solución nutritiva universal de Steiner se compone de 12, 1 y 7 meq L⁻¹ de nitrato (NO₃⁻), fosfato (H₂PO₄⁻) y sulfato (SO₄⁻), respectivamente; y de 7, 9 y 4 meq L⁻¹ de potasio (K⁺), calcio (Ca²⁺) y magnesio (Mg²⁺), respectivamente.

III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de diferentes niveles de nitrato en la solución nutritiva sobre la producción de biomasa, la concentración foliar y requerimiento de nitrógeno en *Stevia rebaudiana* Bertoni bajo invernadero e hidroponía.

3.1.1. Objetivos particulares

1. Cuantificar la producción de biomasa de *Stevia rebaudiana* con diferentes niveles de nitrato.
2. Determinar la concentración foliar de nitrógeno en *Stevia rebaudiana* con fines de diagnóstico.
3. Establecer la demanda de nitrógeno a 30, 60 y 75 días de cultivo.

3.2. Hipótesis general

La adecuada nutrición con nitrato incrementa el rendimiento de biomasa de *Stevia rebaudiana*.

3.2.1. Hipótesis particulares

1. Existe una respuesta directamente proporcional de la biomasa de *Stevia rebaudiana* conforme se incrementa el nivel de nitrato.
2. La concentración foliar de nitrógeno en *Stevia rebaudiana* es un estimador confiable del estatus nutricional de la planta.
3. La demanda (o estado óptimo nutricional) de nitrógeno en *Stevia rebaudiana* varía con la edad de la planta.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Localización del experimento

La investigación se desarrolló en instalaciones del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en el Km 36.5 de la Carretera Federal México-Texcoco, municipio de Texcoco, Estado de México a 19° 29' LN y 98° 53' LO y una altitud de 2,250 m.

El experimento se instaló en un invernadero de forma semicircular con orientación Norte-Sur y cubierta de plástico lechoso para la obtención de luz difusa. Las evaluaciones de laboratorio se llevaron a cabo en los Laboratorios de Nutrición Vegetal, Fertilidad de Suelos y, Biofísica y Fisiología Vegetal Ambiental.

4.2. Material vegetal

Se utilizaron plantas de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni cultivar Eirete), propagadas por esqueje. El material vegetal es originario de Paraguay y fue introducido a México en el 2008 por el M. en C. Alfonso Muratalla Lúa, adscrito al Programa de Genética del Colegio de Postgraduados.

4.3. Sustrato

El sustrato empleado fue una mezcla 50:50 de Agrolita® con fibra de coco y la otra 70:30 de tezontle rojo (granulometría de 0.3 a 0.7 cm) con fibra de coco, para dar una mayor retención de humedad. La fibra de coco fue lavada con abundante agua para retirar exceso de sales. Los sustratos empleados no fueron sometidos a tratamientos de esterilización.

Los contenedores empleados fueron bolsas de polietileno negro de 17 x 17 cm y de 37 x 37 cm.

4.4. Manejo del cultivo

El material vegetal para el establecimiento del experimento se obtuvo de plantas madres de estevia. La propagación vegetativa fue realizada mediante esquejes, los cuales se obtuvieron a finales del mes de diciembre de 2011; éstos se cortaron de 12 cm de largo con tres entrenudos, se eliminaron las hojas basales, dejando hojas en los dos

entrenados superiores, posteriormente se sumergieron los esquejes en una solución de Captan 400 Bayer ® (N-triclorometiltio-4-ciclohexeno-1,2,-dicarboximida) en una concentración de 1 mL L⁻¹ para desinfectarlos por un periodo de un minuto, después se sacaron de la solución y se les sacudió el exceso de solución e inmediatamente se tomó el esqueje y se sumergió la punta del extremo inferior en un polvo impregnable de enraizador Radix 1500 (ácido indol butírico 0.15%) para trasplantarlo en una cama con sustrato, compuesta de una mezcla de Agrolita® y fibra de coco en partes iguales previamente humedecido con agua corriente; se introdujo el esqueje en el sustrato hasta el nivel del segundo entrenado.

Durante 75 días se aplicaron riegos por nebulización, se empleó un nebulizador Rondo colgante con una tasa de flujo de 61 L h⁻¹ y un reloj electrónico (temporizador) modelo TEMP-08E marca Steren®, el suministro de agua fue de 4 L por día mediante cuatro riegos de un minuto a lo largo del día para mantener la humedad.

En el mes de marzo se trasplantaron los esquejes recién enraizados a bolsas de polietileno negro de 17x17cm, con una mezcla de sustrato tezontle y fibra de coco en una relación de 70:30. Se realizó una poda de formación de yemas apicales de las ramas con hojas, posteriormente se asperjó una solución de Amistar® (1 g L⁻¹) para evitar la presencia de hongos.

Para el mantenimiento se aplicaron dos riegos manuales de solución nutritiva universal Steiner al 10% hasta el 9 de mayo, en esta fecha se seleccionaron las plantas con características similares, tales como fortaleza del sistema de enraizamiento (el tallo se empujó manualmente con un toque ligero), tamaño de la planta (\bar{x} = 11 cm) y número de brotes (\bar{x} = 5 brotes). Una vez seleccionadas las plantas, se trasplantaron para favorecer su crecimiento a bolsas polietileno negro de 37x37 cm, con una mezcla de sustrato de tezontle:fibra de coco en una relación de 70:30, desde el trasplante hasta antes del 12 de junio se les suministró solución nutritiva universal Steiner al 25%.

El día 12 junio se inició la aplicación de tratamientos (Cuadro 3), el riego fue por goteo. Se utilizaron cuatro tanques con capacidad de 200 litros cada uno, con sus respectivas bombas eléctricas de ¼ CF. Las cuatro bombas se conectaron a un reloj electrónico (Modelo TEMP-08E marca Steren®), de manera que operaban al mismo tiempo. Se

instalaron mangueras y tubines de 70 cm de largo a un dosificador. Los riegos por goteo durante el primer mes aportaron 400 mL; en el segundo mes se suministraron 800 mL; y en el tercer mes 1200 mL de solución por planta por día.

4.5. Descripción de tratamientos

Se formularon soluciones nutritivas con base en la solución universal Steiner (1984). Se evaluaron los efectos de cuatro concentraciones de NO_3^- (12, 9, 6 y 3 meq L^{-1}) en la solución nutritiva, sobre el crecimiento y la producción de materia seca, así como la concentración foliar de nitrógeno y la extracción de nitrógeno total en planta completa en tres muestreos a 30, 60 y 75 días después de aplicar tratamientos (ddt).

En los tratamientos se mantuvo el balance iónico (20 meq L^{-1} cationes y 20 meq L^{-1} aniones) y el pH (6.0), el cual se ajustó mediante el uso de H_2SO_4 (97%).

Para preparar las soluciones se utilizaron las siguientes fuentes de fertilizantes, para macronutrientes: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , K_2SO_4 , KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_3PO_4 , CaCl_2 y $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Las soluciones nutritivas se complementaron con micronutrientes de las fórmulas comerciales de Ultrasol micro TM (SQM) y Tradecorp® Fe.

Cuadro 3. Composición de soluciones nutritivas de los cuatro tratamientos aplicadas en el experimento.

Tratamiento	Concentración de cationes y aniones (meq L^{-1})							
	NO_3^-	H_2PO_4^-	SO_4^{2-}	Total	Ca^{2+}	Mg^{2+}	K^+	Total
1	12	1	7	20	9	4	7	20
2	9	1	11	21	9	4	7	20
3	6	1	11	18*	9	4	7	20
4	3	1	14	18*	9	4	7	20

* Nota: Los cationes se complementaron con el suministro de ácido sulfúrico.

Cuadro 4. Formulación de soluciones nutritivas empleadas en el cultivo de estevia en g L^{-1} modificando la solución universal de Steiner.

Nombre del fertilizante	Fórmula química	Tratamiento g L^{-1}			
		1	2	3	4
Nitrato de calcio	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.90	0.90	0.71	0.35
Nitrato de potasio	KNO_3	0.44	0.14	--	--
Sulfato de potasio	K_2SO_4	0.23	0.49	0.52	0.52
Sulfato de magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.18	0.18	0.18	0.18
Fosfato monopotásico	KH_2PO_4	--	--	0.14	0.14
Ácido fosfórico	H_3PO_4	0.03	0.03	--	--
Sulfato de calcio	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	--	--	0.14	0.31
Cloruro de calcio	CaCl_2	--	--	--	0.06

Nota: Se consideró que el agua con la cual se prepararon las soluciones contenía 2.53 meq L^{-1} de magnesio y 3.89 meq L^{-1} de calcio; por lo que dichos datos se tomaron en cuenta para formular los tratamientos.

4.6. Diseño experimental

El diseño experimental fue bloques completos al azar, el cual estuvo formado por cuatro bloques, en cada uno de ellos se aplicó cada tratamiento con cuatro repeticiones. La unidad experimental fue una bolsa de polietileno negro de $37 \times 37 \text{ cm}$ con una planta de estevia. El diseño experimental se muestra en la Figura 1.

<i>Bloque I</i>		<i>Bloque II</i>		<i>Bloque III</i>		<i>Bloque IV</i>	
T1	T3	T3	T2	T1	T2	T2	T3
T4	T2	T1	T4	T4	T3	T1	T4
T3	T2	T2	T3	T4	T3	T1	T3
T1	T4	T4	T1	T2	T1	T4	T2
T2	T1	T3	T2	T3	T1	T4	T3
T3	T4	T1	T4	T2	T4	T2	T1

Figura 1. Arreglo espacial de las unidades experimentales dentro de los bloques.

4.7. Variables evaluadas

Se realizaron tres muestreos destructivos a los 30, 60 y 75 días después de la aplicación de tratamientos (ddt), antes de la floración, de acuerdo a lo recomendado por Das *et al.* (2006).

En cada corte se contó el **número de tallos**. Se midió la **altura de la planta** utilizando un escalímetro y la lectura se tomó desde donde inician todos los brotes de la planta hasta su altura máxima. Se midió el **diámetro del tallo** más largo de la planta, mediante el uso de un vernier electrónico.

Se registró el **peso fresco** de la parte aérea de cuatro plantas de cada tratamiento por separado, en cada muestreo. Las muestras se pesaron en una balanza Ohaus® CS 200 Capacity 200g x 0.1g.

Se determinó el **peso seco** de la parte aérea y de la raíz por separado, después de secar en una estufa (Riossa, HCF-125D, México) a 65 °C durante 72 h. Las muestras se pesaron en una balanza analítica.

Se calculó el **área foliar** de las plantas del primer y segundo muestreo con un medidor de área foliar LI-COR® LI3100C Area Meter.

La **clorofila** se estimó con un medidor portátil Minolta SPAD-502; se realizaron tres lecturas a lo largo de la lámina foliar de hojas recientemente maduras para obtener un valor promedio.

Para cuantificar la extracción (acumulación o demanda) de nitrógeno se molieron y tamizaron plantas completas (parte aérea) de cada muestreo en un molino tipo Thomas-Wiley Model 4 provisto por una malla No 20; posteriormente se realizó un análisis químico de nitrógeno total mediante el método de micro-Kjeldahl (Alcántar y Sandoval, 1999).

Para medir la concentración de N se colectaron hojas recientemente maduras en los tres muestreos (30, 60 y 75 días) y se realizó el procedimiento descrito en el párrafo anterior.

4.8. Análisis de los datos

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza mediante el procedimiento ANOVA y comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$) con apoyo del programa estadístico Statistical Analysis System versión 9.0.

El modelo estadístico empleado fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \mathcal{T}_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Es el valor de la variable respuesta del tratamiento i en su repetición j .

μ = Media general

\mathcal{T}_i = Efecto del i -ésimo nivel del tratamiento

β_j = Efecto del j -ésimo bloque

ε_{ij} = Efecto del error experimental, tienen distribución normal

$\varepsilon_{ij} \sim NIID (0, \sigma_e^2)$

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Producción de biomasa

5.1.1. Diámetro del tallo, altura de la planta y número de tallos

El análisis estadístico no mostró diferencias significativas ($P \geq 0.05$) para las variables de diámetro de tallo y altura en ninguno de los tres muestreos realizados (a los 30, 60 y 75 ddt). No obstante, para la variable altura de la planta, el tratamiento con mejor respuesta fue 12 meq L⁻¹ de NO₃⁻, a los 30 y 60 ddt, y 9 meq L⁻¹ a los 75 ddt.

En cuanto al número de tallos a 30 ddt, el tratamiento con 9 meq L⁻¹ de NO₃⁻ fue el de mayor respuesta, aun cuando no hubo diferencias con los tratamientos a 3 y 12 meq L⁻¹. A los 60 y 75 ddt tampoco se encontraron diferencias significativas ($P \geq 0.05$), aunque el mayor número de tallos se obtuvo con 6 y 9 meq L⁻¹ de NO₃⁻ a los 60 ddt y 9 meq L⁻¹ a los 75 ddt.

Cuadro 5. Promedio de diámetro del tallo, altura de la planta y número de tallos en plantas de estevia.

Muestreo	Tratamiento	Variables ‡		
		Diámetro	Altura	Número de tallos
		mm	cm	
30	NO ₃ ⁻ meq L ⁻¹ 3	6.5 a	26.8 a	5.3 ab
	6	6.4 a	28.1 a	3.5 b
	9	5.9 a	28.4 a	9.0 a
	12	6.0 a	28.8 a	7.5 ab
60	3	6.6 a	64.3 a	8.3 a
	6	6.7 a	61.6 a	10.5 a
	9	6.6 a	63.4 a	10.0 a
	12	6.6 a	67.0 a	7.5 a
75	3	7.0 a	83.5 a	8.0 a
	6	7.7 a	84.5 a	8.8 a
	9	7.2 a	87.8 a	10.8 a
	12	7.6 a	87.8 a	8.8 a

‡ Letras distintas en la misma columna y muestreo indican diferencias significativas, según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$); ddt: días después del inicio de la aplicación de los tratamientos.

Al ajustar los datos de altura de la planta a modelos de regresión no lineal (Figura 2), se encontró que las curvas de tendencia a los 30 y 75 ddt fueron ligeramente decrecientes,

sus valores más altos fueron para 9 y 12 meq L⁻¹ de NO₃⁻. La curva de tendencia a los 60 ddt mostró una tendencia creciente.

Al comparar el crecimiento obtenido en los muestreos se encontró que la altura fue mayor a los 75 ddt, pero es necesario aclarar que, en las condiciones de desarrollo del experimento, en ese momento el 100% de las plantas muestreadas se encontraban en un estado de floración y parte de la diferencia de altura comparada con el muestreo a los 60 ddt, se debió a un alargamiento de la planta por escapos florales. Dicho estado no es el recomendable para realizar una cosecha con enfoque comercial.

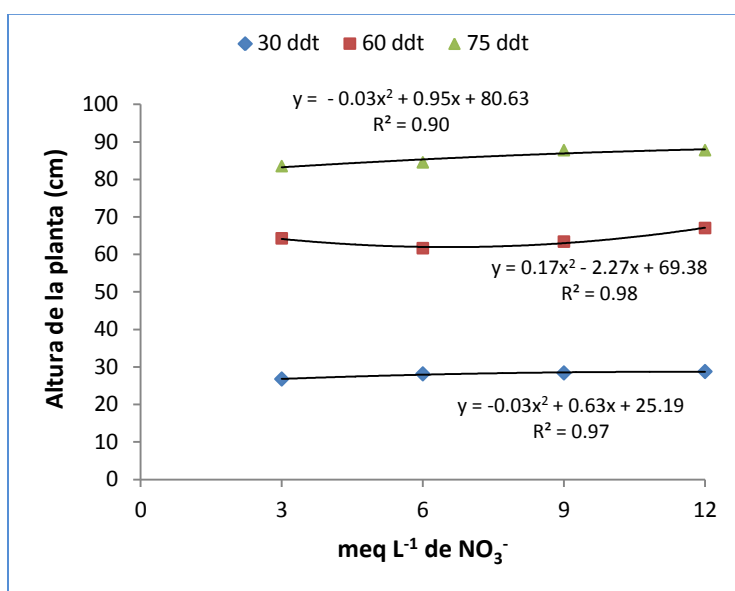


Figura 2. Altura de planta (cm) de estevia a dosis crecientes de nitrógeno condiciones de invernadero e hidroponía

5.1.2. Peso fresco de tallo, hoja y total

El peso fresco obtenido en el primer muestreo (30 ddt) exhibió diferencias significativas ($P \geq 0.05$) para las variables de peso total, de hoja y de tallo. En los tres casos el tratamiento con mejor respuesta fue 9 meq L⁻¹ de NO₃⁻, seguido de 12 y 6 meq L⁻¹.

En los muestreos a 60 y 75 ddt no hubo diferencias significativas ($P \geq 0.05$) en el peso fresco total, de hoja y de tallo. Sin embargo, el tratamiento con 9 meq L⁻¹ de NO₃⁻ en el muestreo a 60 ddt originó el mayor peso fresco total, de hoja y tallo, seguido del

tratamiento con 6 meq L⁻¹. A los 75 ddt el tratamiento con mayor peso en las tres variables observadas fue el de 12 meq L⁻¹ de NO₃⁻.

En cuanto a la relación del peso fresco de hoja/tallo a los 30 ddt los resultados fueron mayores comparados con los muestreos a 60 y 75 ddt (alrededor de 1), situación que pudo deberse a la mayor lignificación de los tallos conforme aumenta la edad de la planta o a una mayor cantidad de tejido foliar en plantas jóvenes.

Cuadro 6. Peso fresco de parte aérea, hojas y tallo en plantas de estevia y relación hoja/tallo.

Muestreo ddt	Tratamiento meq L ⁻¹ de NO ₃ ⁻	Variables (g)			Relación hoja/tallo
		Total	Peso fresco [‡]		
			Hoja	Tallo	
30	3	67.33 b	46.33 b	21.00 b	2.23 a
	6	92.93 ab	61.03 ab	31.90 ab	2.00 a
	9	125.95 a	78.93 a	47.02 a	1.69 a
	12	98.60 ab	64.50 ab	34.10 ab	1.91 a
60	3	264.13 a	140.45 a	123.68 a	1.14 a
	6	361.43 a	179.28 a	182.15 a	0.99 ab
	9	373.68 a	183.38 a	190.30 a	0.97 b
	12	351.45 a	173.05 a	178.40 a	0.96 b
75	3	292.68 a	151.33 a	141.35 a	1.07 a
	6	395.40 a	197.80 a	197.60 a	0.99 a
	9	426.67 a	204.10 a	222.57 a	0.94 a
	12	449.18 a	225.78 a	223.40 a	1.04 a

‡ Letras distintas en la misma columna y muestreo indican diferencias significativas, según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$); ddt: días después del inicio de la aplicación de los tratamientos.

En el muestreo a 75 ddt (Cuadro 6) se tuvo una mayor acumulación de peso fresco con respecto al muestreo a los 60 ddt, sin embargo, es necesario aclarar que a los 75 ddt se generalizó la floración en el cultivo, por lo que al momento del corte las inflorescencias se incluyeron con las hojas, pero una cosecha con enfoque comercial debe ser antes de la floración.

En las Figuras 3 A, B y C se presentan los datos ajustados a modelos de regresión no lineal, en las que se observa tendencias decrecientes para 12 meq L⁻¹ de NO₃⁻; a los 30 y 60 ddt. Los valores más altos se presentaron con 9 meq L⁻¹, pero a los 75 ddt ésta se alcanzó con 12 meq L⁻¹.

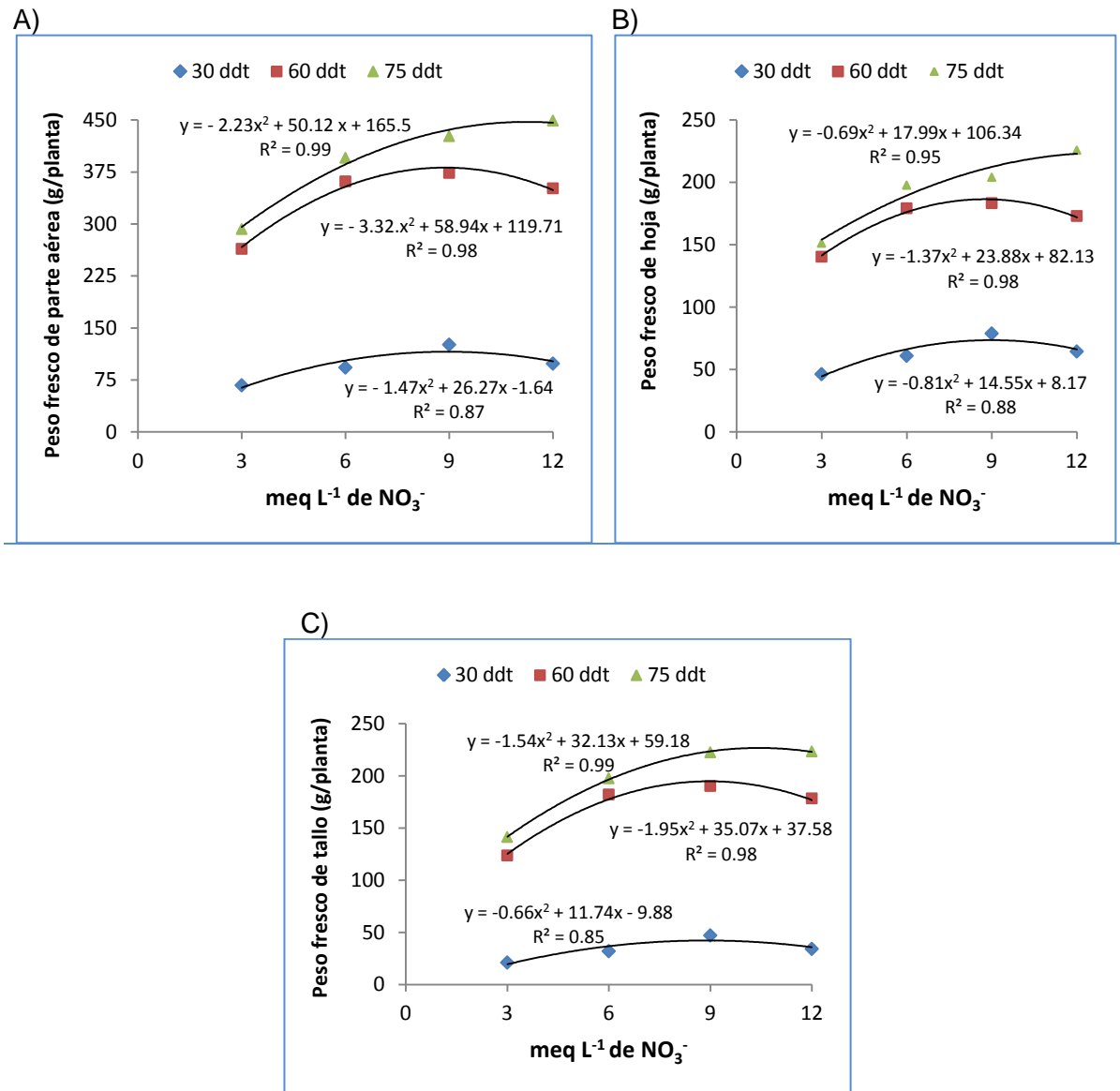


Figura 3. Peso fresco de parte aérea (A), hojas (B) y tallo (C) en plantas de estevia expuestas a dosis crecientes de nitrógeno bajo condiciones de hidroponía e invernadero.

5.1.3. Peso seco total, hoja, tallo y raíz

El peso seco obtenido en el primer muestreo (30 ddt) exhibió diferencias significativas ($P \geq 0.05$) para las variables de peso seco total, hoja y de tallo; en los tres casos el tratamiento con mejor respuesta fue 9 meq L⁻¹ de NO₃⁻, seguido de 12 y 6 meq L⁻¹.

En los muestreos a 60 y 75 ddt no hubo diferencias significativas ($P \geq 0.05$) en las variables de peso seco total, de hoja y tallo. A pesar de ello, en el muestreo a 60 ddt el tratamiento 9 meq L⁻¹ de NO₃⁻ originó el mayor peso seco total, de hoja y tallo, seguido del tratamiento 12 meq L⁻¹. En el muestreo a 75 ddt, el tratamiento con mayor peso seco total y de hoja fue el de 12 meq L⁻¹.

En peso seco de raíz obtenido en los muestreos a 30 y 75 ddt no mostró diferencias significativas ($P \geq 0.05$), pero a los 60 ddt si se presentaron diferencias significativas entre tratamientos. El mayor peso seco de raíz se obtuvo con 3 meq L⁻¹ de NO₃⁻. Mengel y Kirkby (1987) señalan que la deficiencia de nitrógeno afecta al crecimiento de la raíz y a su ramificación y la relación raíz/brote usualmente suele ser mayor; esto se presentó en los muestreos en los que a menor dosis de nitrógeno se tuvo menor peso seco de parte aérea y mayor peso seco de raíz.

Cuadro 7. Peso seco de parte aérea, hojas, tallo y raíz en plantas de estevia.

Muestreo	Tratamiento	Variables †			
		Peso seco (g/planta)			
ddt	meq L ⁻¹ de NO ₃ ⁻	Total	Hoja	Tallo	Raíz
30	3	11.63 b	7.73 b	3.90 b	1.475 a
	6	15.10 ab	9.62 ab	5.48 ab	1.300 a
	9	22.10 a	13.78 a	8.27 a	0.875 a
	12	15.98 ab	10.18 ab	5.80 ab	1.400 a
60	3	56.95 a	29.95 a	27.00 a	6.325 a
	6	71.48 a	33.05 a	38.43 a	3.750 b
	9	81.95 a	38.28 a	43.68 a	2.850 b
	12	75.73 a	36.20 a	39.53 a	3.225 b
75	3	78.98 a	37.23 a	41.75 a	11.850 a
	6	102.08 a	46.80 a	55.28 a	5.675 a
	9	113.23 a	50.60 a	62.63 a	8.200 a
	12	116.00 a	53.98 a	62.03 a	10.975 a

† Letras distintas en la misma columna y muestreo indican diferencias significativas, según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$); ddt: días después del inicio de la aplicación de los tratamientos.

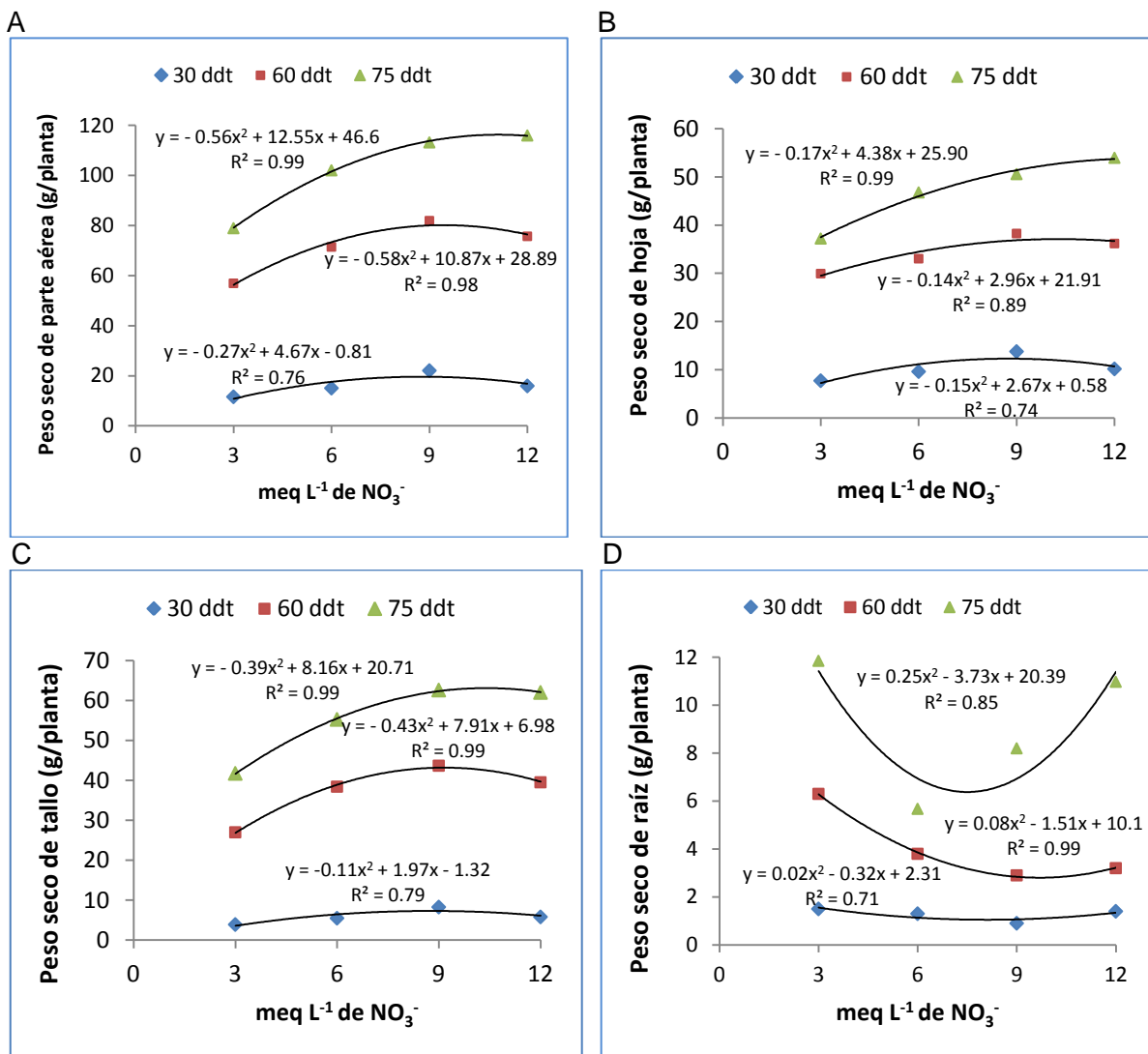


Figura 4. Peso seco de parte aérea (A), hojas (B), tallo (C) y raíz (D) en plantas de estevia expuestas a dosis crecientes de nitrógeno bajo condiciones de hidroponía e invernadero.

Las Figuras 4 A, B y C son similares a las obtenidas para el peso fresco (Figura 3).

La Figura 4D muestra respuesta hiperbólica inversa, es decir, el peso seco de la raíz fue mayor con 3 meq L⁻¹ de NO₃⁻ en todos los muestreos, mientras que a 6 y 9 L⁻¹ se obtuvo el menor peso y a 12 L⁻¹. Se muestra una tendencia positiva de acumulación de peso.

Cabe aclarar que en el muestreo realizado a los 60 ddt las plantas se encontraban en estado de floración inicial (botones florales), y a los 75 ddt estaban en floración plena, por lo tanto, el peso seco de hojas obtenido de este muestreo se compone, como en el caso de peso fresco, por hojas y flores; así el incremento de peso fue debido, en parte, al crecimiento y desarrollo de las inflorescencias.

5.1.4. Área foliar

El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($P \geq 0.05$) a los 30 ddt en la variable de área foliar; el tratamiento con mayor respuesta fue con 9 meq L⁻¹ de NO₃⁻. A los 60 ddt no hubo diferencias significativas ($P \geq 0.05$), aunque el tratamiento 9 meq L⁻¹ fue también el de mayor área foliar cuantificada.

Cuadro 8. Área foliar en plantas de estevia.

Muestreo ddt	NO ₃ ⁻ meq L ⁻¹	Área foliar total [‡] cm ² /planta
30	3	1,140.5 b
	6	1,537.9 ab
	9	2,015.9 a
	12	1,753.3 ab
60	3	3,569.0 a
	6	4,762.9 a
	9	5,113.1 a
	12	4,167.4 a

[‡] Letras distintas en la misma columna, dentro de cada muestreo, indican diferencias significativas, según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$); ddt: días después del inicio de la aplicación de los tratamientos.

Se encontró una tendencia creciente para 3, 6 y 9 meq L⁻¹ de NO₃⁻ y decreciente para 12 meq L⁻¹ en el modelo de regresión no lineal para los datos del área foliar; y conforme aumentó la dosis de nitrógeno (12 meq L⁻¹) las plantas tuvieron menor área foliar (Figura 5).

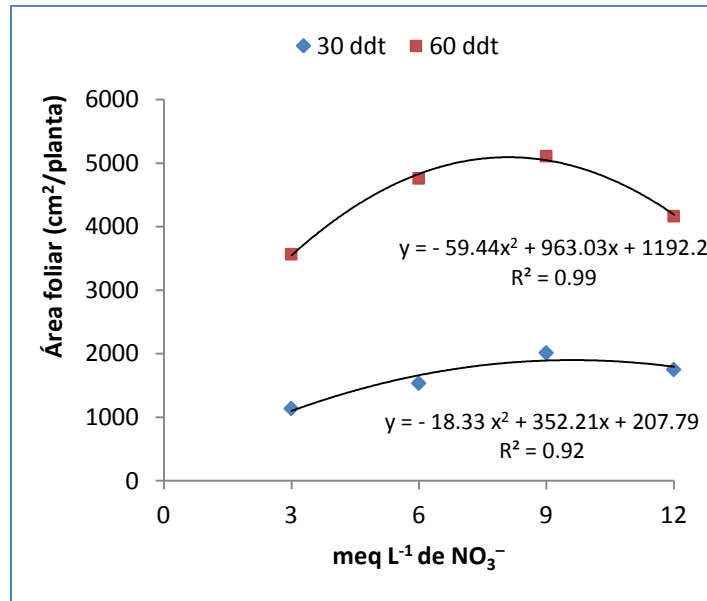


Figura 5. Relación entre el incremento en el área foliar (cm²/planta) y las dosis crecientes de nitrógeno en plantas de estevia bajo condiciones de hidroponía e invernadero.

La planta mostró una respuesta positiva en el área foliar con el transcurso del tiempo a la aplicación de nitrógeno, hasta 9 meq L⁻¹ de NO₃⁻ (Figura 6).

La Figura 7 muestra una relación creciente entre el peso seco (g) de la parte aérea con el área foliar (cm²), esto es que conforme aumentó el área foliar incrementó el peso seco. Como ya se mencionó en párrafos anteriores el tratamiento 9 meq L⁻¹ de NO₃⁻ mostró mayor acumulación de área foliar y en consecuencia también acumuló mayor peso seco.

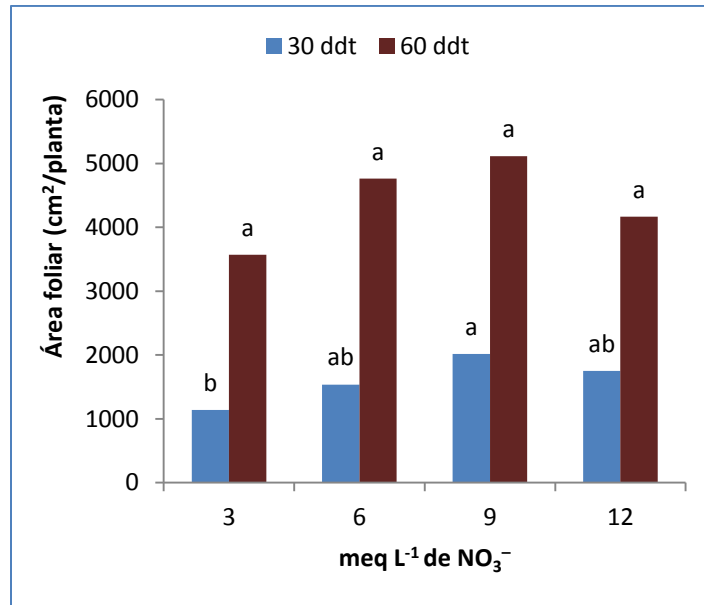


Figura 6. Incrementos en el área foliar a diferentes concentraciones de nitrógeno para los muestreos a 30 y 60 ddt en plantas de estevia bajo condiciones de hidroponía e invernadero.

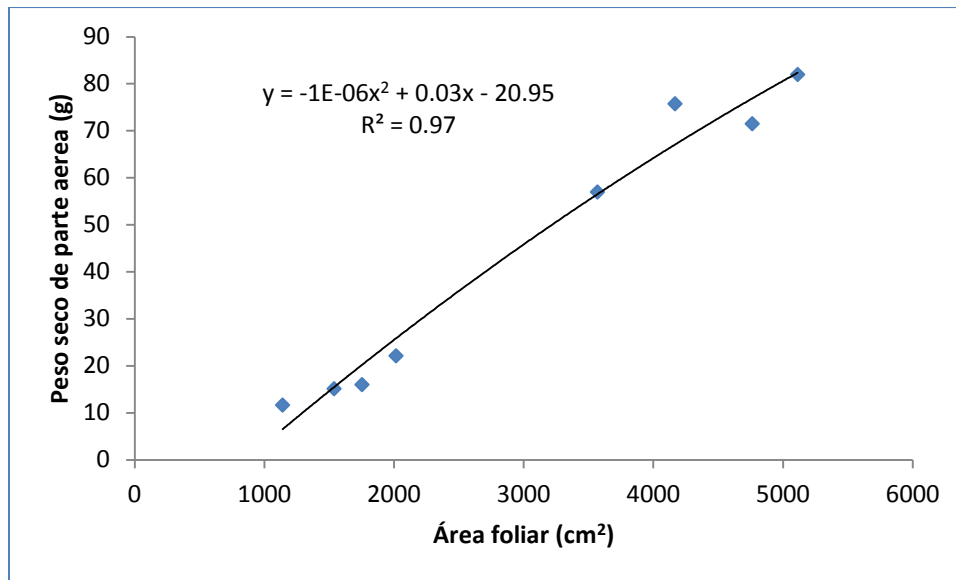


Figura 7. Relación entre el incremento en el área foliar y la acumulación de peso seco de la parte aérea en plantas de estevia bajo condiciones de hidroponía e invernadero.

5.2. Efecto de los niveles de nitrato sobre la concentración de nitrógeno en tejido vegetal del cultivo de estevia

5.2.1. Concentración de nitrógeno en planta y lectura SPAD

El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($P \geq 0.05$) entre los tratamientos para concentración de nitrógeno total, nitrógeno en hojas recientemente maduras (HRM) y nitrógeno en el total de las hojas para los muestreos a 30, 60 y 75 ddt. El tratamiento 3 meq L⁻¹ de NO₃⁻ mostró los menores valores en las tres variables antes mencionadas. Los tratamientos con 6, 9 y 12 meq L⁻¹ no mostraron diferencia estadística entre sí.

Para la lectura SPAD el análisis estadístico no mostró diferencias significativas ($P \geq 0.05$) en los muestreos a 30 y 60 ddt, excepto a los 75 ddt. El menor valor correspondió al tratamiento con 3 meq L⁻¹ de NO₃⁻, mientras que los tratamientos con 9 y 12 meq L⁻¹ obtuvieron los valores más altos.

Cuadro 9. Nitrógeno total en planta completa, hoja recientemente madura, hojas y lectura SPAD.

Muestreo	Tratamiento	Variables †			
		Concentración de nitrógeno (%)			
ddt	meq L ⁻¹ de NO ₃ ⁻	Total	HRM	Hojas	Lectura SPAD
30	3	2.2 b	3.0 b	2.6 b	37.7 a
	6	2.5 ab	3.6 a	2.9 ab	38.6 a
	9	2.5 ab	3.4 ab	3.0 ab	41.6 a
	12	2.7 a	3.5 ab	3.2 a	40.6 a
60	3	1.5 b	2.6 b	1.9 b	48.7 a
	6	2.1 a	3.3 a	2.9 a	50.8 a
	9	2.1 a	3.5 a	3.0 a	53.7 a
	12	2.1 a	3.6 a	2.8 a	53.8 a
75	3	1.2 b	1.9 b	1.8 b	48.5 b
	6	1.7 a	2.8 a	2.4 ab	53.8 ab
	9	1.9 a	3.1 a	2.8 a	57.3 a
	12	1.8 a	3.0 a	2.8 a	55.8 a

Total: datos que corresponde al nitrógeno encontrado en planta completa; HRM: hojas recientemente maduras; Hojas: corresponde a todas las hojas de la planta; ddt: días después del inicio de la aplicación de los tratamientos.

† Letras distintas en la misma columna, dentro de cada muestreo, indican diferencias significativas, según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Las correlaciones entre la dosis de nitrógeno y la lectura SPAD para los tres muestreos (Figura 8 A) indican que a mayor dosis de nitrógeno mayor lectura SPAD, se logró la más alta con 9 meq L⁻¹ de NO₃⁻ y después disminuyó al aplicar 12 meq L⁻¹.

Por otra parte, al correlacionar (Figura 8B) la dosis de nitrógeno y la concentración de nitrógeno en hojas recientemente maduras (HRM) para los tres muestreos se encontró que conforme aumentó la dosis de nitrógeno el porcentaje de nitrógeno en HRM fue mayor; sus valores más altos correspondieron a 9 y 12 meq L⁻¹ de NO₃⁻ a 60 y 75 ddt. A los 30 ddt la correlación fue baja (R² = 0.71).

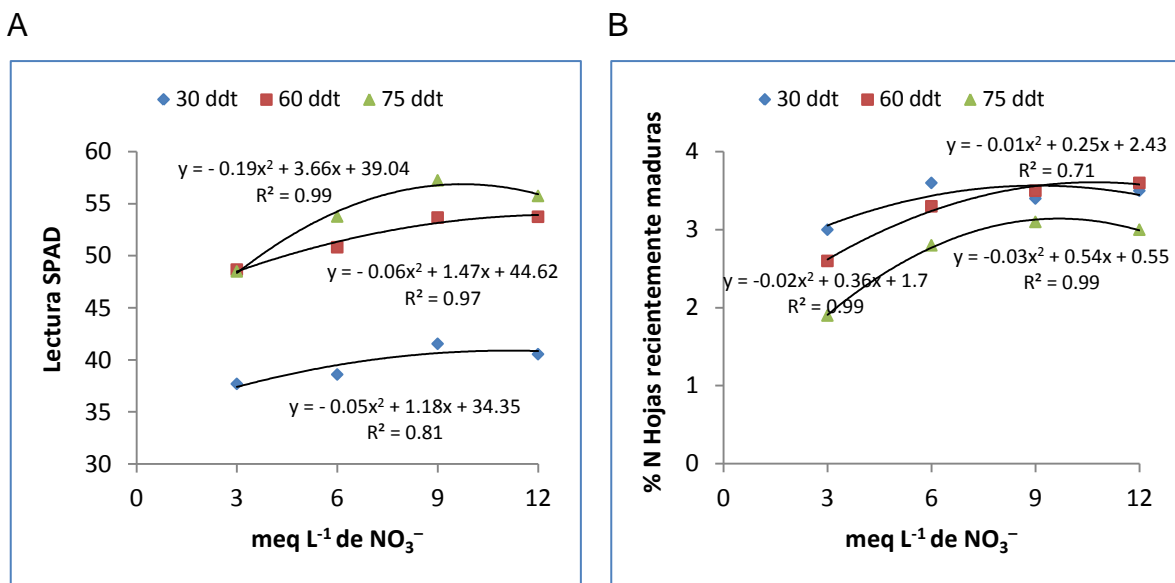
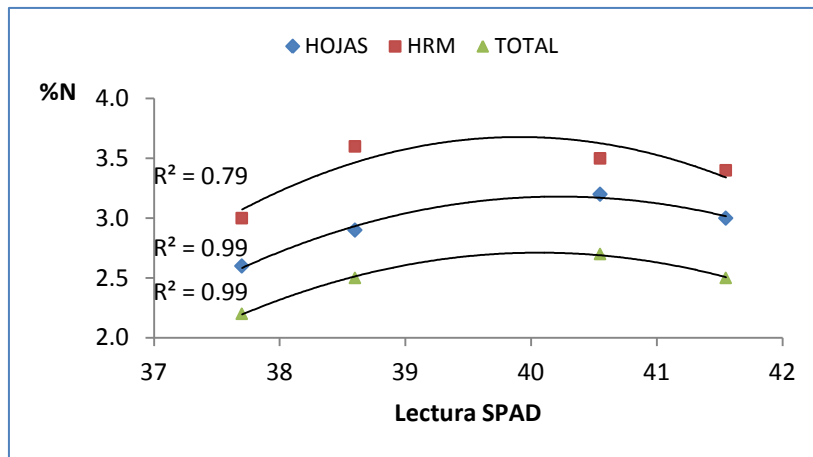


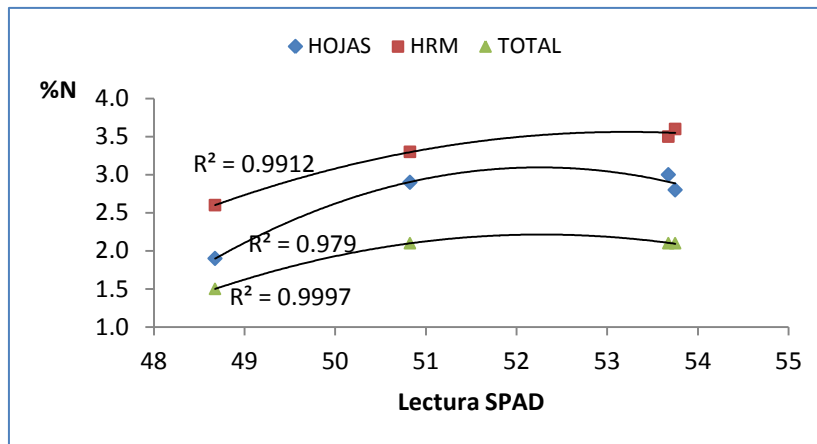
Figura 8. Lectura SPAD (A) y porcentaje de nitrógeno en hojas recientemente maduras (B) en plantas de estevia expuestas a dosis crecientes de nitrógeno bajo condiciones de hidroponía e invernadero.

En la Figura 9 A, B y C se observa que la concentración de nitrógeno es mayor en las HRM, esto se explica porque los nutrientes se concentran en las hojas más jóvenes de la planta, las cuales son los órganos de mayor demanda. El porcentaje de nitrógeno en el total de las hojas es menor al de las HRM, en la que se manifestó un efecto de dilución, ya que en este grupo se incluyen a las HRM y a las hojas más viejas que han traslocado más nutrientes hacia las partes de crecimiento de la planta.

A) Muestreo a 30 ddt



B) Muestreo a 60 ddt



C) Muestreo a 75 ddt

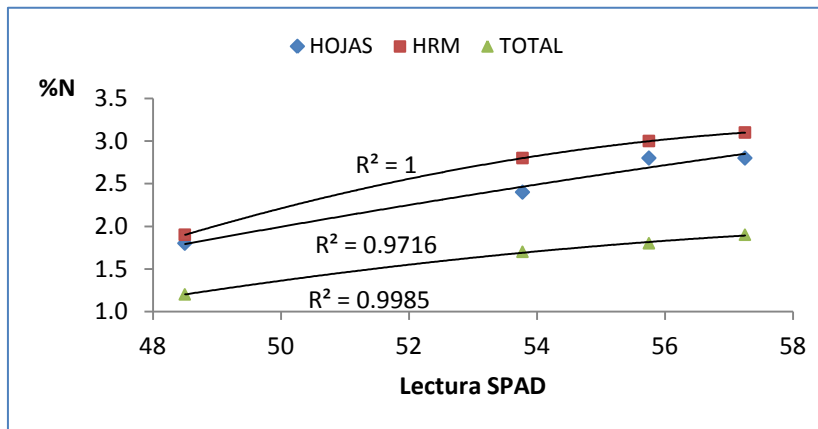


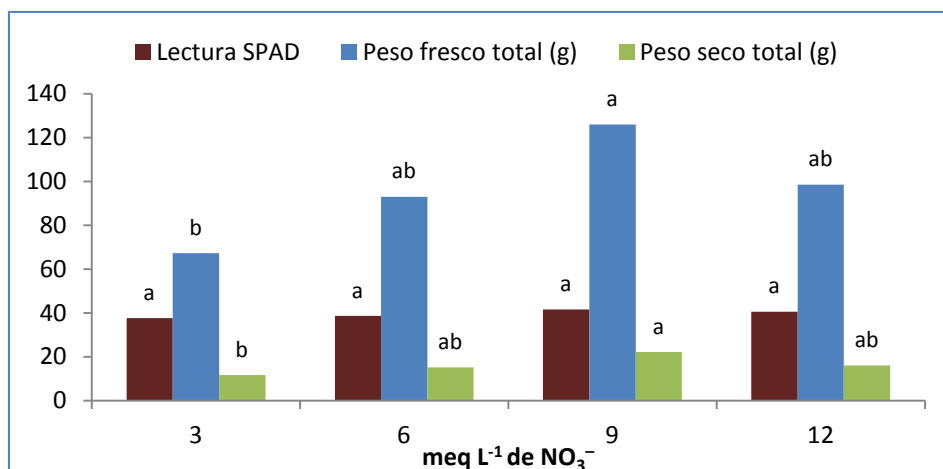
Figura 9. Relación entre la lectura SPAD y el porcentaje de nitrógeno en plantas de estevia expuestas a dosis crecientes de nitrógeno bajo condiciones de hidropnía e invernadero.

Por otra parte, la concentración de nitrógeno en la planta completa fue menor que en las hojas y en las HRM, sin duda alguna se tiene el efecto de dilución por incluir otras estructuras de la planta (tallos) con menor contenido de nitrógeno.

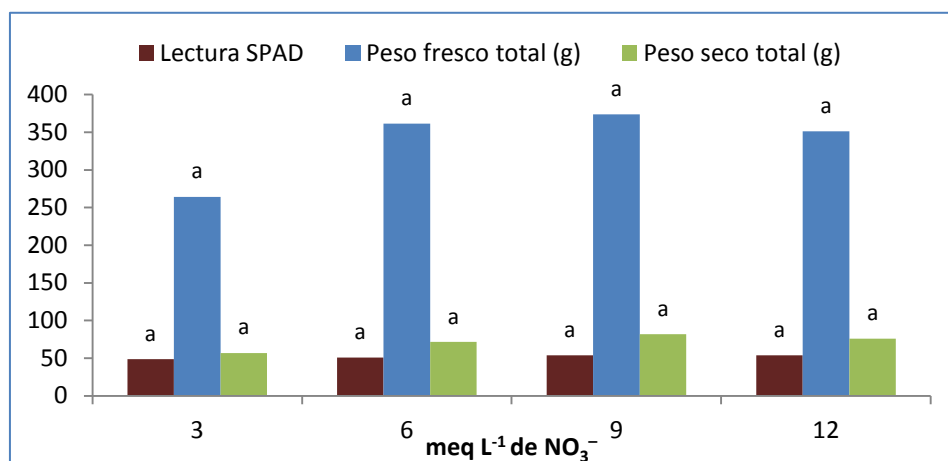
En la Figura 9 se observa que los valores más altos de la lectura SPAD no siempre se correlacionaron con mayor concentración de nitrógeno. En el muestreo a 30 ddt a una lectura SPAD de 40 se relaciona con la mayor concentración de nitrógeno, para los muestreos a 60 y 75 ddt la lectura SPAD fue entre 52 a 53 y 57 respectivamente.

En la Figura 10 A, B y C se presentan gráficos de barra de los tres muestreos realizados. Se tiene que el tratamiento 9 meq L^{-1} de NO_3^- en los muestreos a 30 y 60 ddt alcanzó los valores más altos en peso fresco y seco, los cuales se asocian a valores más altos de la lectura SPAD. En el muestreo a 75 ddt los valores mayores en peso fresco y seco se obtuvieron con 12 meq L^{-1} , pero la lectura SPAD fue menor que la tomada a 9 meq L^{-1} . El valor de la lectura SPAD representa una herramienta útil como indicador de la nutrición óptima con nitrógeno.

A) Muestreo a 30 ddt



B) Muestreo a 60 ddt



C) Muestreo a 75 ddt

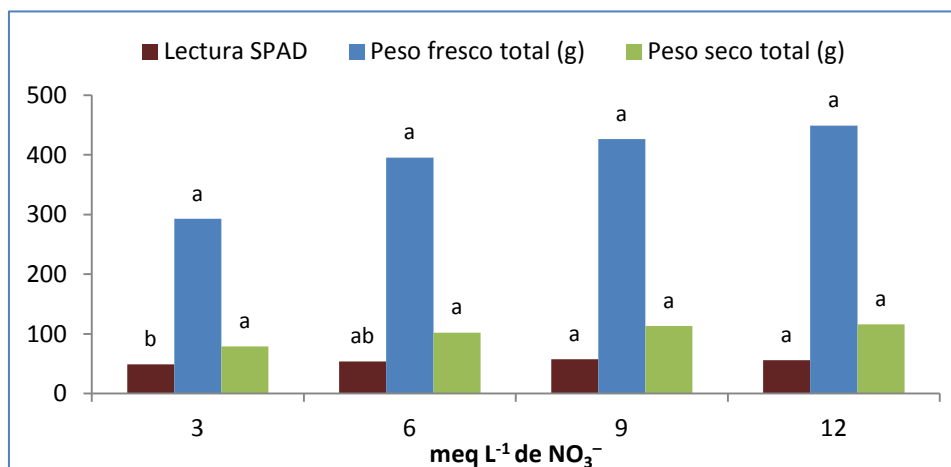


Figura 10. Relación entre la Lectura SPAD y el peso fresco y seco de la parte aérea en plantas de estevia bajo condiciones de hidroponía e invernadero.

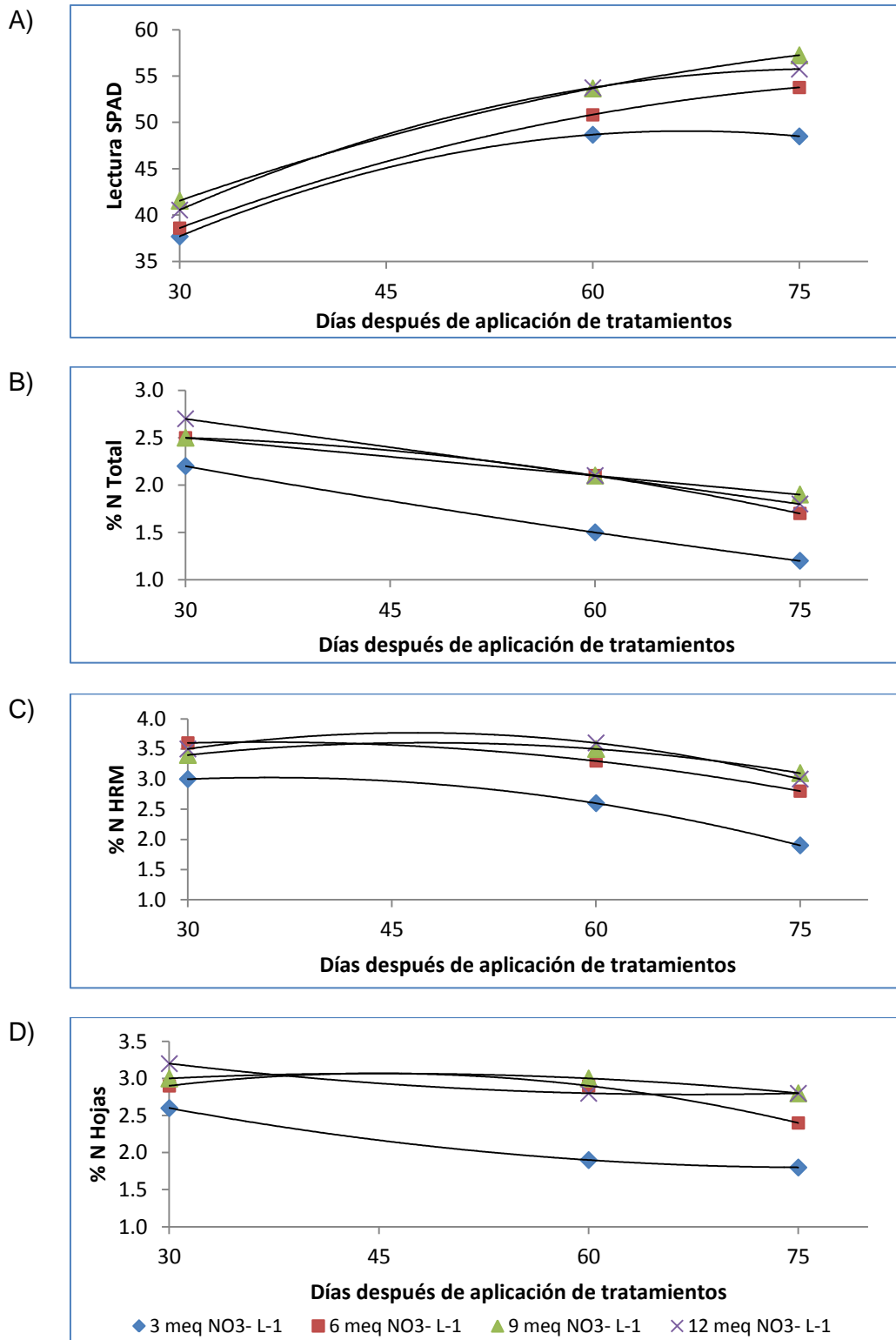


Figura 11. Tendencia de la lectura SPAD, porcentaje de nitrógeno de la parte aérea, (HRM) hojas recientemente maduras y hojas en plantas de estevia bajo condiciones de hidroponía e invernadero.

La Figura 11 A muestra que las lecturas SPAD obtenidas con 9 y 12 meq L⁻¹ de NO₃⁻ comparten una misma tendencia, mientras que con 3 y 6 meq L⁻¹ las lecturas SPAD siempre se mantienen más bajas que las lecturas a 9 y 12 meq L⁻¹, incluso a 3 meq L⁻¹ las lecturas SPAD a los 75 ddt decrecieron comparadas con las de 60 ddt.

En la Figura 11 B se tiene que conforme pasaron los días de aplicación de tratamientos la concentración de nitrógeno total disminuyó, la gráfica muestra que a 3 meq L⁻¹ de NO₃⁻ la concentración de nitrógeno siempre fue menor en comparación a 6, 9 y 12 meq L⁻¹. Las curvas a 6, 9 y 12 meq L⁻¹ coinciden en valores a los 60 ddt.

En la Figura 11 C y D conforme pasó el tiempo de los muestreos la concentración de nitrógeno en HRM y hojas decreció. Es notable que la menor dosis de nitrógeno aplicada produjo una baja y caída de la concentración de nitrógeno en los muestreos. Las curvas de los tratamientos con 6, 9 y 12 meq L⁻¹ de NO₃⁻ tienen valores cercanos entre sí, pero en los muestreos a 60 y 75 ddt, la curva de 6 meq L⁻¹ se mantuvo por debajo de las curvas con 9 y 12 meq L⁻¹.

En las Figuras 12, 13, 14 y 15 se analizan las variables de peso seco, lectura SPAD y concentración de nitrógeno con el fin de recomendar el mejor momento de muestreo.

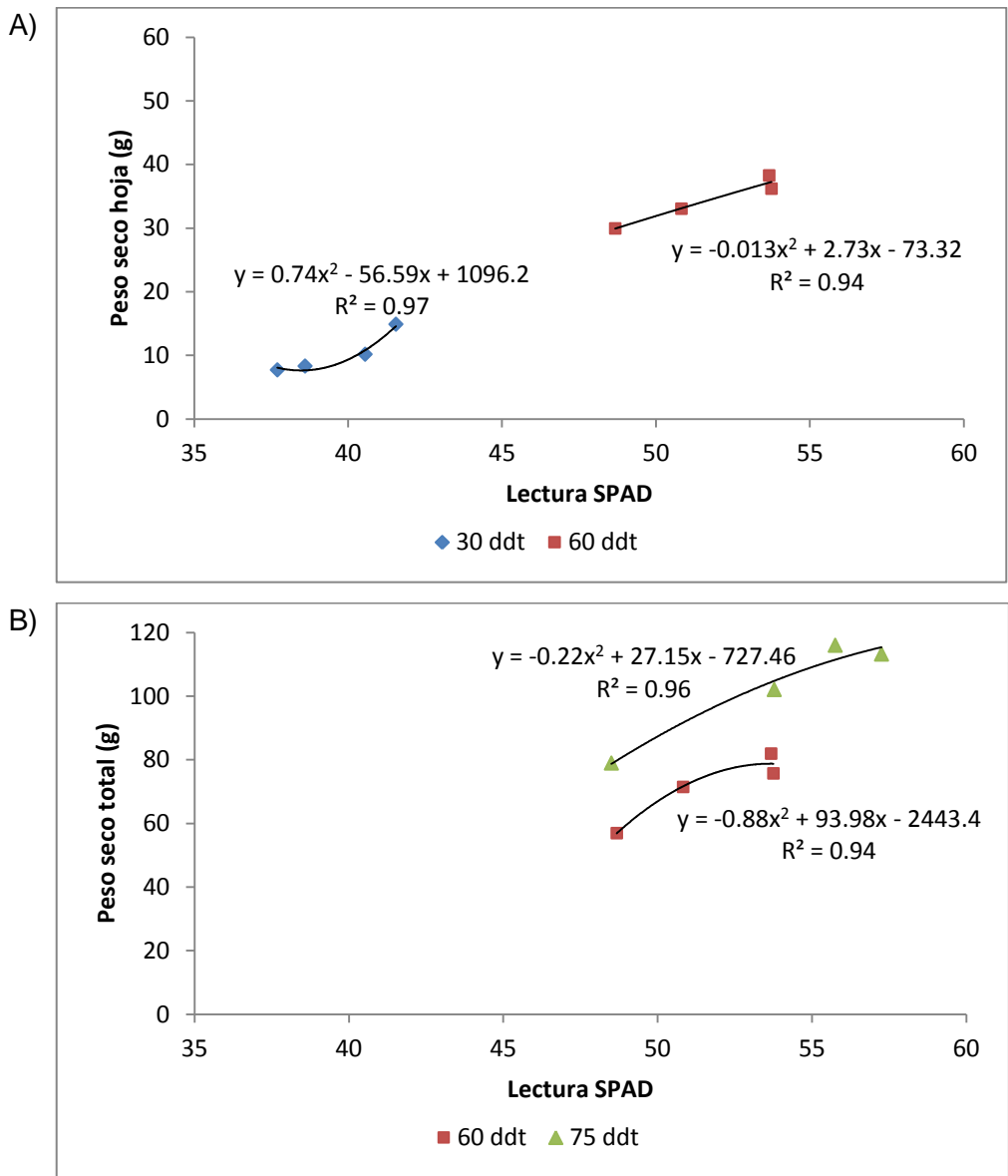


Figura 12. Correlación entre la Lectura SPAD y el peso seco de hojas (A) y total (B) en plantas de estevia bajo condiciones de hidroponía e invernadero.

La Figura 12 A muestra las curvas obtenidas de la correlación entre la lectura SPAD y el peso seco de hoja; en el muestreo a 30 ddt una lectura SPAD de 42 puede dar la mayor acumulación de peso seco de hoja; en el muestro a 60 ddt cuando la planta alcanzó mayor peso seco de hoja la lectura SPAD fue cercana a 54. En la Figura 12 B al correlacionar la lectura SPAD con el peso seco total, se observa que la lectura SPAD 54 se tuvo el mayor peso seco total a los 60 ddt y la lectura SPAD cercana a 57 se asoció al mayor peso seco total a los 75 ddt.

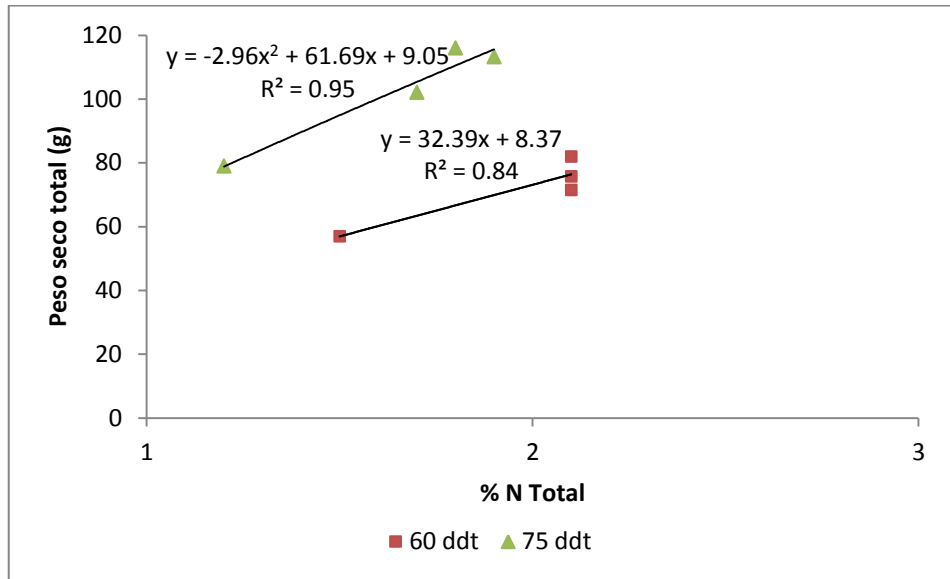


Figura 13. Correlación entre la concentración total de nitrógeno y el peso seco total en plantas de estevia bajo condiciones de hidroponía e invernadero.

La Figura 13 muestra las curvas obtenidas de la correlación entre la concentración de nitrógeno y el peso seco total; en el muestro a 60 ddt cuando la planta alcanzó mayor peso seco total fue cuando se tuvo una concentración poco mayor de 2% de nitrógeno; mientras que a los 75 ddt la concentración que se asocia a un mayor peso seco total fue un poco menor a 2% de nitrógeno.

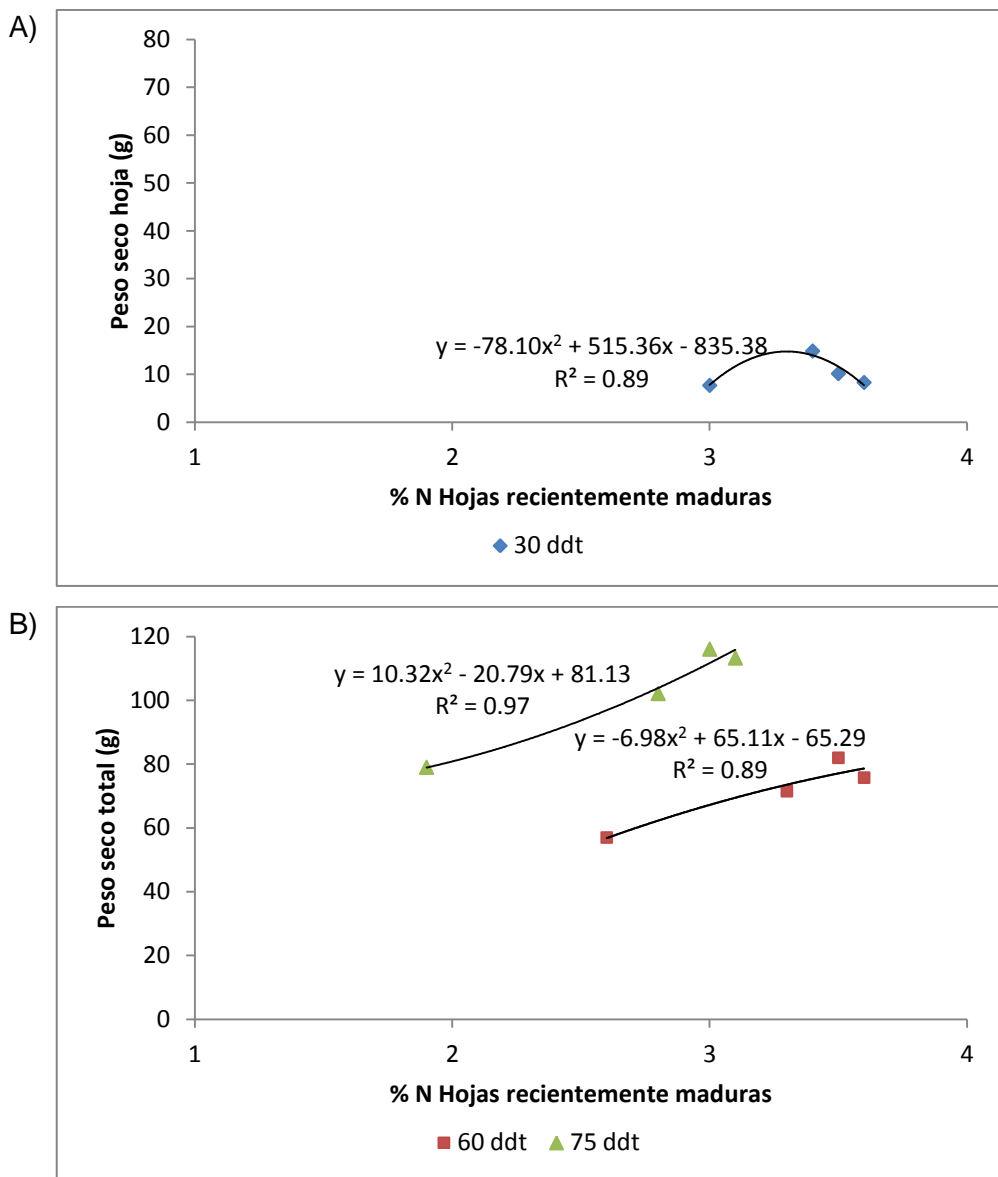


Figura 14. Correlación entre la concentración de nitrógeno en hojas recientemente maduras y el peso seco de hojas (A) y total (B) en plantas de estevia bajo condiciones de hidroponía e invernadero.

La Figura 14 A muestra la curva obtenida de correlacionar la concentración de nitrógeno en HRM y el peso seco de hoja en el muestreo a 30 ddt, se tiene que a una concentración cercana a 3.4% de nitrógeno se obtuvo la mayor acumulación de peso seco de hoja. En la Figura 14 B, en el muestreo a los 60 ddt, cuando la planta alcanzó mayor peso seco total corresponde a la concentración de nitrógeno de 3.5% en HRM; mientras que a los 75 ddt la concentración que se asoció a un mayor peso seco total fue de 3.0% de nitrógeno en HRM.

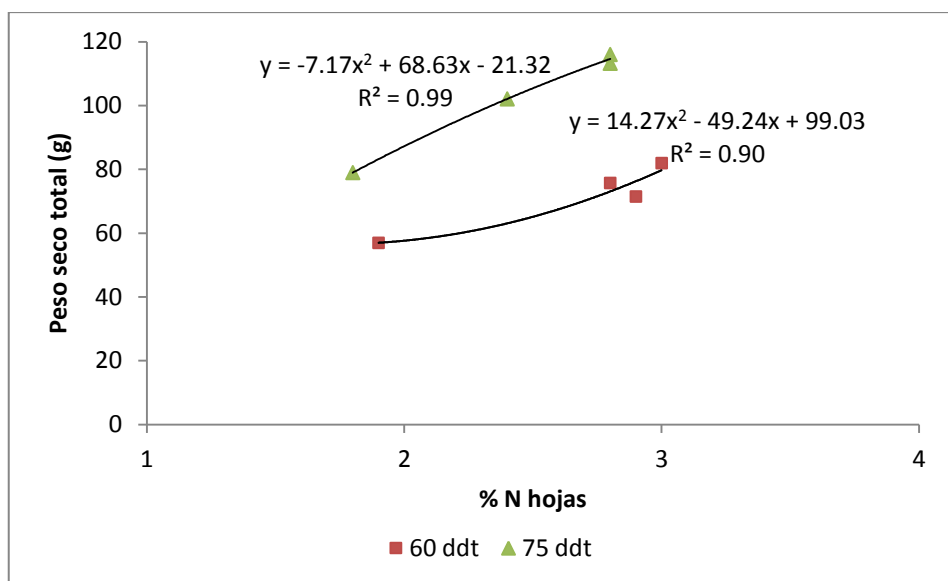


Figura 15. Correlación entre la concentración de nitrógeno en hojas y el peso seco total en plantas de estevia bajo condiciones de hidroponía e invernadero.

La Figura 15 muestra la correlación entre la concentración de nitrógeno en hojas y el peso seco total; en el muestro a 60 ddt la planta alcanzó mayor peso seco total con una concentración de 3% de nitrógeno en hojas; mientras que a los 75 ddt la concentración que se asoció a un mayor peso seco total fue de 2.9% de nitrógeno en hojas.

Cuadro10. Parámetros de concentración de nitrógeno total, nitrógeno en HRM y nitrógeno en el total de hojas, y lectura SPAD asociado a la mejor respuesta de peso seco en plantas de estevia.

Muestreo ddt	Concentración de nitrógeno (%)			Lectura SPAD
	Total	HRM	Hojas	
30	---	3.4	---	40
60	≥ 2.0	3.5	3.0	54
75	≤ 2.0	3.0	2.9	57

ddt: días después del inicio de la aplicación de los tratamientos.

5.3. Recomendación de suministro de nitrógeno

El requerimiento interno (RI) se define como la concentración del nutriente de interés en la biomasa total en plantas con una nutrición óptima alcanzando el rendimiento máximo (Opazo *et al.* 2008).

Con los datos de peso seco total y su concentración de nitrógeno se determinó la extracción de nitrógeno. Para calcular el requerimiento interno (RI) se empleó la siguiente fórmula:

$$RI = \frac{\text{Peso seco planta (g)} * \% \text{ nitrógeno en planta}}{100 \%} \quad (1)$$

El RI se calculó para el mejor tratamiento, el cual fue de 9 meq L⁻¹ de NO₃⁻; en la fórmula (1) se sustituyeron los valores obtenidos para los tres muestreos realizados para este tratamiento.

Muestreo:

a) 30 ddt: $RI = \frac{22.10 \text{ g} * 2.5 \% N}{100\%} = 0.55 \text{ g nitrógeno/planta}$

b) 60 ddt: $RI = \frac{81.95 \text{ g} * 2.1 \% N}{100\%} = 1.72 \text{ g nitrógeno/planta}$

c) 75 ddt: $RI = \frac{113.23 \text{ g} * 1.9 \% N}{100\%} = 2.15 \text{ g nitrógeno/planta}$

El Cuadro 11 muestra la extracción de nitrógeno (kg ha⁻¹) para una plantación de estevia a tres densidades considerando una dosis de nitrógeno de 9 meq L⁻¹ de NO₃⁻ para diferentes momentos de cultivo.

Cuadro 11. Extracción de nitrógeno (kg ha^{-1}) y rendimiento (Mg ha^{-1}) de hoja seca para tres densidades de plantación de estevia.

Densidad de plantación	Días después del inicio de la aplicación de los tratamientos					
	30		60		75	
	Dosis de nitrógeno	Rendimiento	Dosis de nitrógeno	Rendimiento	Dosis de nitrógeno	Rendimiento
Plantas ha^{-1}	kg ha^{-1}	Mg ha^{-1}	kg ha^{-1}	Mg ha^{-1}	kg ha^{-1}	Mg ha^{-1}
55 mil	30.3	0.76	94.6	2.11	118.3	2.78
80 mil	44.0	1.10	137.6	3.06	172.0	4.05
100 mil	55.0	1.34	172.0	3.83	215	5.06

5.3.1. Índice de cosecha (IC)

El índice de cosecha está definido por la relación entre el rendimiento (biomasa del órgano de interés económico) y la biomasa aérea total, por lo que sus valores van de 0 a 1 (Flores *et al.*, 2010; Jarma *et al.*, 2006). En particular, para la estevia, la hoja se consideró como el órgano de interés comercial. La fórmula empleada fue:

$$\text{IC (Índice de cosecha)} = \frac{\text{Peso seco hoja/planta}}{\text{Peso seco parte aérea/planta}} \quad (2)$$

En el caso del experimento a los 60 ddt las plantas de estevia se encontraban en el momento de la cosecha, es decir, iniciaba la floración en la mayoría de las plantas evaluadas.

Los índices de cosecha calculados con los datos del experimento para las cuatro dosis de nitrógeno evaluadas a los 60 ddt fueron los siguientes, al sustituir los valores en la fórmula (2):

$$3 \text{ meq L}^{-1} \text{ de NO}_3^-, \quad \text{IC} = \frac{29.95 \text{ g}}{56.95 \text{ g}} = 0.53$$

$$6 \text{ meq L}^{-1} \text{ de NO}_3^-, \quad \text{IC} = \frac{33.05 \text{ g}}{71.48 \text{ g}} = 0.46$$

$$9 \text{ meq L}^{-1} \text{ de NO}_3^-, \quad \text{IC} = \frac{38.28 \text{ g}}{81.95 \text{ g}} = 0.47$$

$$12 \text{ meq L}^{-1} \text{ de NO}_3^-, \quad \text{IC} = \frac{36.20 \text{ g}}{75.73 \text{ g}} = 0.48$$

Los valores de IC de los cuatro tratamientos se encuentran alrededor de 0.5, es decir, de la materia seca producida el 50% corresponde a las hojas al final del ciclo. Jarma *et al.* (2006) encontraron valores similares, que en este experimento, de IC para estevia (variedades Morita 1 y Morita 2), aunque el valor más alto fue cercano a 60% al final del ciclo para la variedad Morita 2; los autores indican que los valores de IC son similares a los reportados en plantas altamente intervenidas por el mejoramiento genético, como el maíz.

En el caso del experimento, el IC más alto se asoció con el tratamiento a 3 meq L⁻¹ de NO₃⁻, pero el rendimiento obtenido fue el menor. Este resultado puede explicarse porque la deficiencia de nitrógeno en las plantas no permitió el desarrollo de estructuras de soporte con mayor peso.

Para los tratamientos a 6, 9 y 12 meq L⁻¹ de NO₃⁻ la tendencia de IC fue que a mayor dosis de nitrógeno mayor el IC.

VI. CONCLUSIONES

1. La acumulación de biomasa de *Stevia rebaudiana* es directamente proporcional conforme se incrementa el nivel de nitrato hasta 9 meq L⁻¹ de NO₃⁻.
2. La medición de la concentración de nitrógeno en el total de las hojas y en hojas recientemente maduras, así como el uso de un lector SPAD son herramientas útiles para estimar el estatus nutrimental de la planta.

La concentración de nitrógeno fue mayor en HRM, seguido del nitrógeno total de las hojas y del total de la planta, en ese orden, lo cual muestra un efecto de dilución.

3. La demanda (o estado óptimo nutrimental) de nitrógeno en *Stevia rebaudiana* si varía con la edad de la planta.

VII. RECOMENDACIONES

La lectura SPAD y la concentración de nitrógeno en HRM pueden ser utilizadas como herramientas para estimar la nutrición óptima de nitrógeno en plantas de *Stevia rebaudiana*.

Las correlaciones entre la dosis de nitrógeno y la lectura SPAD para los tres muestreos indican que a mayor dosis de nitrógeno mayor lectura SPAD. Una lectura SPAD de 40 se asoció a la mayor acumulación de peso seco de hoja a los 30 ddt, a los 60 ddt fue de 54, y a los 75 ddt fue de 57. La concentración de nitrógeno en HRM cuando la planta alcanzó mayor peso seco total fue de 3.4% de nitrógeno a los 30 ddt, 3.5% a los 60 ddt y 3.0% a los 75 ddt (Cuadro 10).

Se recomienda el suministro de 94.6 kg ha⁻¹ de nitrógeno (N) para una densidad de 55 mil plantas de estevia ha⁻¹, para un rendimiento estimado de 2.11 Mg ha⁻¹; para una plantación de 80 mil plantas ha⁻¹ se recomienda aplicar 137.6 kg ha⁻¹ de N para obtener 3.06 Mg ha⁻¹ y para 100 mil plantas ha⁻¹ habría que aplicar 172 kg ha⁻¹ de N para un rendimiento de 3.83 Mg ha⁻¹ (Cuadro 11). Se consideró el resultado obtenido a los 60 ddt, dado que fue el momento en el que el cultivo iniciaba la floración de forma generalizada.

Los índices de cosecha (IC) de los cuatro tratamientos fueron cercanos al 0.5, es decir, de la materia seca producida el 50% corresponde a las hojas al final del ciclo.

VIII. LITERATURA CITADA

- Abudula, R., V. V. Matchkov, P. B. Jeppesen, H. Nilsson, C. Aalkjaer and K. Hermansen. 2008.** Rebaudioside A directly stimulates insulin secretion from pancreatic beta cells: a glucose-dependent action via inhibition of ATP-sensitive K⁺-channels. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 10:1074-1085.
- Alcántar G., G. y M. Sandoval V. 1999.** Manual de análisis químico de tejido vegetal. Guía de muestreo, preparación, análisis e interpretación. Publicación especial 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Chapingo, México. 155 p.
- Avila R., U. 2011.** Nutrición mineral en plántulas de stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.). Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia. Tesis de licenciatura. Chapingo, México. pp. 59-60
- Beneford, D. J., M. DiNovi, J. Schlatter. 2006.** Steviol glycosides. Safety Evaluation of Certain Food Additives. WHO Food Additive Series. WHO, Geneva, pp. 117-143.
- Borda-Molina, D., J. M. Pardo-García; J. S. Montaña-Lara, M. M. Martínez-Salgado. 2011.** Influencia de la materia orgánica y *Azotobacter nigricans* en un cultivo de *Stevia rebaudiana* B. *Universita Scientiarum, Colombia* 16(3):282-293.
- Brandle, J. E., P.G. Telmer. 2007.** Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry* 68:1855-1863.
- Brandle, J. E., A. N. Starratt, M. Gijzen. 1998.** *Stevia rebaudiana*: qualities agricoles, biologiques et chimiques. *Can. J. Plant Sci.* 78: 527-536.
- Carakostas, M. C., L. L. Curry, A. C. Boileau and D. J. Brusick. 2008.** Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food and Chemical Toxicology* 46:1-10.
- Chalapathi, M., V. S. Thimmegowda, N. D. Kumar, R. G. Gangadhar E., J. Chandraprakash. 1999.** Influence of fertilizer levels on growth, yield and nutrient uptake of ratoon crop of stevia. *Crop Res.* 21:947-949.
- Das, K., R. Dang, T. N. Shivanada. 2009.** Effect of biofertilizers on the nutrient availability in soil in relation to growth, yield and yield attributes of *Stevia rebaudiana*. *Archives of Agronomy and Soil Science* 55(4):359-366.
- Das, K., R. Dang, T. N. Shivanada. 2006.** Effect on N, P and K fertilizers on their availability in soil in relation to the *Stevia* plant (*Stevia rebaudiana* Bert.). *Archives of Agronomy and Soil Science* 52(6):679-685.
- Fira, 2010.** Situación actual y perspectiva del cultivo *Estevia* en México. Subdirección de consultoría. México. <http://es.scribd.com/doc/64629119/Situacion-actual-y-perspectivas-del-cultivo-Estevia-en-Mexico>.
- Flores M., A., R. A. Miranda F., A. Galvis S., M. T. Hernández M., G. Ramos E. 2010.** Estudio sobre el requerimiento interno de nitrógeno en lechuga (*Lactuca sativa*). *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente.* 10(19):83-100.

- FUNCFOS. Fundación Colombiana para el Desarrollo y el Fomento Social. 2000.** Manual de la Stevia. *Stevia rebaudiana* Bertoni. Kaá-hé-é. 23 p. http://es.scribd.com/doc/39933345/Manual-Stevia#open_download, (Consulta: abril 9, 2011).
- Instituto Boliviano de Comercio Exterior. 2011.** El dulce negocio de la Stevia. Comercio Exterior 19:191.
- Jarma, A., T. Rengifo y H. Aramendiz-Tatis. 2006.** Fisiología de estevia (*Stevia rebaudiana*) en función de la radiación en el Caribe colombiano. II.: Análisis de crecimiento. Agron. Colomb. 24(1):38-47.
- Jarma-Orozco, A., R. Montoya y H. Aramendiz. 2003.** *Stevia rebaudiana*, alternativa de sustitución de cultivos ilícitos en el Caribe colombiano. Memorias XXXIII Congreso de Comalfi. Montería, Colombia. pp. 64-65.
- Jarma O, A. E. Combatt C., J. Polo S. 2012.** Contenido de glucósidos en función de deficiencias nutricionales en *Stevia rebaudiana* BERT. Rev.udcacatual.divulg.cient. (online). 2012, vol. 15, no.1 pp. 107-116. <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262012000100012&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 0123-4226 (Consulta: octubre 23, 2013).
- Kaushik, R., N. Pradeep, V. Vamshi, M. Geetha, A. Usha. 2010.** Nutrient composition of cultivated stevia leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts. J. Food Sci. Technol. 47(1):27-37.
- Kim, J.-H., N.-Y. Sung, S.-K. Know, P.-m. Jung, J.-I. Choi, Y. Yoon, B.-S. Song, T.-Y. Yoon, H.-J. Kee, J.-W. Lee, 2010.** Antioxidant activity of stevia leaf extracts prepared by various extraction methods. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 39(2):313-318.
- Lemus-Moncada, R., A. Vega-Gálvez, L. Zura-Bravo, K. Ah-Hen. 2012.** *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Food Chemistry 132: 1121-1132.
- Leung, A. Y., S. Foster. 1996.** Encyclopedia of Common Natural Ingredients- Used in Food, Drugs and Cosmetics. John Wiley and Sons, New York. p. 478.
- Lima F., O. F. de, A. C. Candeira V., Z. Martinez L. 2004.** Estévia. Sistemas de Produção 5. Embrapa, Stevi Farma.
- Lima F., O. F. de, E. Malavolta, y H. Y. Yabico. 1997.** Influência de estresses nutricionais no teor e produção de esteviosídeo durante o desenvolvimento da estévia. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 32(5):489-494.
- Maheshwar, H. M. 2005.** Effect of diferent levels of nitrogen and dates of planting on growht and yield of stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.). University of Agricultural Sciences, Department of Horticulture. Dharwad, India.
- Mengel, K., E.A. Kirkby. 1987.** Principles of Plant Nutrition. International Potash Institute. Switzerland.

- Ministerio de Industria y Comercio Paraguay. 2011.** Stevia rebaudiana Bertoni, Oro verde de Paraguay. http://www.fao.org/fileadmin/templates/olq/documents/costa_rica/ppp/Jueves/STEVIA.pdf (Consulta: Noviembre 14, 2013).
- Muratalla L., A. 2013.** Entrevista personal con experto en cultivo de *Stevia rebaudiana*. Noviembre 10. Colegio de Postgraduados, México.
- Ochoa N., M.G. 2010.** Estevia, potente edulcorante, 13 abril 2010. <http://eleconomista.com.mx/columnas/agro-negocios/2010/04/13/estevia-potente-edulcorante> (Consulta: febrero 14, 2011).
- Opazo A., J. D., A. Luchsinger L., O. Neira V. 2008.** Factores de suelo y planta para determinar la fertilización nitrogenada en maíz dulce en la zona central de Chile. IDESIA (Chile) 26(2):53-58.
- Patil, N. M. 2010.** Biofertilizer effect on growth, protein and carbohydrate content in Stevia rebaudiana var. Bertoni. Recent Research in Science and Technology. 2(10):42-44.
- Ramírez V., J. 2012.** Paquete tecnológico para el cultivo de la estevia en México. <http://www.monografias.com/trabajos93/paquete-tecnologico-cultivo-stevia-sinaloa-mexico/paquete-tecnologico-cultivo-stevia-sinaloa-mexico.shtml> (Consulta: octubre 3, 2012).
- Steiner, A. A. 1984.** The universal nutrient solution. ISOSC. Proceedings of 36th. International congress on Soilless Culture. The Netherlands. pp 633-650.
- Taware, A. S., S. N. Harke, D. S. Mukadam, A.M. Chavan, S. D. Taware. 2010.** Effect of different extracts of callus and plantlets of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) on seed germination of some agricultural crops. Afr. J. Biotech. 9(49):6675-6683.
- Utumi, M. M., P. E. Monnerat, P. R. Gomes-Pereira, P. C. Rezende-Fontes y V. P. Campos-Godinho. 1999.** Deficiência de macronutrientes em estévia: sintomas visuais e efeitos no crescimento, composição química e produção de esteviosídeo. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 34(6):1039-1043.
- Vázquez B., L. 2012.** Cultivo *In vitro* de Stevia rebaudiana Bertoni. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados, Texcoco, México. 76 p.
- Yadav, A. K., S. Singh, D. Dhyan and P. S. Ahuja. 2011.** A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. Can. J. Plant Sci. 91:1-27.
- Zubiate, F. 2007.** Manual del cultivo de la stevia (yerba dulce). <http://www.engormix.com/MA-agricultura/cultivos-tropicales/articulos/manual-cultivo-stevia-yerba-t1337/078-p0.htm> (Consulta: febrero 14, 2011).