



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGIA

**Glucósidos en *Stevia rebaudiana* Bertoni
en respuesta a dos fuentes de nutrición
orgánicas en invernadero**

CARLOS JAVIER VILLALBA MARTÍNEZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2015

La presente tesis titulada: **“Glucósidos en *Stevia rebaudiana* Bertoni en respuesta a dos fuentes de nutrición orgánicas en invernadero”**, realizada por el alumno: Carlos Javier Villalba Martínez bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
EDAFOLOGIA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dra. Rosa María López Romero

ASESOR



Dr. Antonio Trinidad Santos

ASESOR



M.C. Alfonso Muratalla Lúa

ASESOR



Dr. Abel Quevedo Nolasco

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio de 2015

Glucósidos en *Stevia rebaudiana* Bertoni en respuesta a dos fuentes de nutrición orgánicas en invernadero

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar rendimiento y la concentración del esteviósido y rebaudiosido A de *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Eirete cultivada en invernadero con dos fuentes de abonos orgánicos (gallinaza y lombricompost), en tres dosis cada una. El experimento llevó se cabo del 29 de mayo al 9 de agosto del 2014 en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco estado de México. El estudio se realizó en macetas y en sustratos, se empleó una mezcla de suelo, tezontle y abono orgánico. Se midió la altura de planta, brotes basales, peso fresco y seco. En los sustratos se determinó: agua fácilmente disponible (Afd) porosidad total (Pt), porosidad de aireación (Pa), capacidad de retención de humedad (Crh) y densidad aparente (Da) al inicio y final de la investigación para observar la variación en estas propiedades. Las hojas y tallos se analizaron para conocer la concentración nutrimental y con estos datos se determinó la absorción N, P y K. También se cuantificó la concentración del esteviósido y del rebaudiosido A al final del ciclo y durante el desarrollo vegetativo del cultivo, ello permitió elaborar un modelo fenológico. Los resultados indican que la lombricompost en la dosis alta (4 g planta^{-1} de nitrógeno) fue el mejor tratamiento, para la emisión de brotes y producción de biomasa total. En las propiedades físicas se observó una disminución del agua fácilmente disponible de los tratamientos con gallinaza no así en lombricompost, en cuanto a la concentración nutrimental, el potasio se encontró en mayor cantidad en hojas y en tallos respecto a lo reportado en la literatura. El modelo fenológico muestra que la energía requerida para realizar la cosecha de la stevia en la aparición de las flores es de 604 grados días desarrollo (GDD) con una temperatura base de 15°C , sin embargo, la concentración máxima del esteviósido y del rebaudiosido A se dio a los 562 GDD, los que corresponden a los 63 días después del trasplante y diez días antes de la cosecha total.

Palabras claves: *esteviósido, rebaudiosido A, grados días desarrollo.*

Glucosides in *Stevia rebaudiana* Bertoni in Response to Two Organic Nutrition Sources in the Greenhouse

Abstract

The objective of this work was to evaluate the yield and concentration of the stevioside and rebaudioside A of *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Eirete grown in the greenhouse with two sources of organic fertilizers (chicken manure and vermicompost), in three doses each. The experiment was done in the Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, the State of Mexico from May 29th to August 9th, 2014. The study was done in planting pots with substrates using a mixture of soil, tezontle (porous volcanic rock), and organic fertilizer. The plants were measured for height, basal shoots, fresh weight, and dry weight. The substrates were determined for: easily available water (Afd), total porosity (Pt), airing porosity (Pa), water retention capacity (Crh), and apparent density (Da) at the beginning and at the end of the research to observe their variation. The leaves and stems were analyzed to learn nutrient concentration and with these data, N, P, and K absorption was determined. The concentrations of stevioside and rebaudioside A were also measured at the end of the cycle and during the vegetative growth of the crop, which allowed us to elaborate a phenological model. The results indicate that the high dose of vermicompost (4 g plant⁻¹ nitrogen) was the best treatment for shoot emission and total biomass production. A decrease in easily available water was observed in the physical properties in the treatments with chicken manure, but not in the treatments with vermicompost. With regard to nutrient concentration, potassium in leaves and stems was higher than reported in the literature. The phenological model shows that the energy required for stevia crops to reach flowering is 604 heating degree days (HDD) with a base temperature of 15°C. However, the maximum concentrations of stevioside and rebaudioside A were at 562 HDD, which corresponds to 63 days after transplantation, and ten days before total harvest.

Key words: stevioside, rebaudioside A, heating degree days.

Agradecimientos

Agradezco a Dios, Jesús y la Virgen por haberme dado salud en estos dos años.

Al Instituto Interamericano y Cooperación para la Agricultura (IICA) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento otorgado para realizar mis estudios de Maestría.

Al Colegio de Postgraduados, por darme la oportunidad de realizar mis estudios en esta institución, en especial a los profesores del postgrado de Edafología por la transferencia de conocimiento para mejorar mi formación académica.

A los miembros de mi consejo por apoyarme en la investigación y en especial a la Dra. Rosa María López Romero por su orientación y amistad durante estos dos años.

A todos los trabajadores administrativos y en especial a los trabajadores del Laboratorio de Fertilidad de Suelos y Química Ambiental por apoyarme en los análisis.

Dedicatorias

A mis padres Josefina Martínez Benítez y Carlos Villalba Galeano, por darme la vida y enseñarme valores morales y éticos, en especial a mi madre por apoyarme desde el inicio en este desafío.

A mis hermanas y sobrino por siempre apoyarme en la distancia.

A Andrea Verónica Solaeche Escobar por darme la fuerza y motivación para seguir siempre, gracias por apoyarme y escucharme siempre.

Al Señor Julio Solaeche y familia por su apoyo incondicional, gracias por sus oraciones y palabras de aliento en el día a día.

Contenido

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIAS	IV
ÍNDICE DE CUADROS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
I INTRODUCCIÓN	1
II Objetivos	
2.1 Objetivo General.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
III HIPÓTESIS	
3.1 Hipótesis general.....	4
3.2 Hipótesis específicas.....	4
IV REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
4.1 Origen.....	5
4.2 Descripción botánica.....	6
4.3 Siembra a nivel mundial.....	6
4.4 Propiedades de la hoja de stevia.....	8
4.5 Síntesis de diterpenos glucósidos.....	9
4.6 Determinación de glucósidos.....	12
4.7 Utilización de glucósidos de la stevia.....	12
4.8 Beneficios para la salud.....	12
4.9 Condiciones ambientales y agronómicas para el cultivo de stevia.....	13
4.10 Enfermedades y plagas de la stevia.....	14
4.11 Fenología de la <i>Stevia</i>	15
4.12 Variedades.....	17
4.13 Requerimientos nutrimentales y fertilización orgánica.....	18
4.14 Concentración nutrimental de las hojas de stevia.....	19

4.15	Agricultura orgánica.....	21
4.15.1	Composición química y concentración nutrimental de los abonos orgánicos.....	22
4.15.2	Tasa de mineralización de algunos estiércoles.....	24
4.16	Sustratos.....	26
4.16.1	Propiedades de los sustratos.....	27
V	MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1	Ubicación del experimento.....	29
5.2	Material vegetal.....	29
5.3	Manejo del cultivo.....	30
5.4	Análisis de abonos orgánicos.....	31
5.5	Descripción de tratamientos.....	32
5.6	Diseño experimental.....	33
5.7	Variables estudiadas.....	33
5.7.1	Número de brotes basales y altura de planta.....	33
5.7.2	Peso fresco y seco.....	34
5.7.3	Concentración nutrimental de hojas y tallos.....	34
5.7.4	Absorción y extracción de N, P y K por la planta de stevia	35
5.7.5	Propiedades físicas de los sustratos.....	35
5.7.6	Modelo fenológico y eficiencia en la utilización del agua en stevia.....	35
5.7.7	Determinación de glucósidos en las hojas de stevia.....	36
5.8	Control de calidad en las mediciones analíticas.....	43
5.9	Análisis estadístico.....	43
VI	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
6.1	Variables Agronómicas.....	44
6.2	Concentración nutrimental al final del ciclo de cultivo de la stevia....	47
6.3	Concentración nutrimental durante el ciclo de cultivo.....	52
6.4	Absorción nutrimental de stevia.....	54
6.5	Fenología de la stevia.....	56
6.6	Eficiencia en el uso del agua en stevia.....	58
6.7	Propiedades físicas de los sustratos.....	60
6.8	Determinación de glucósidos.....	64

6.8.1 Pruebas preliminares.....	65
6.8.2 Concentración de glucósidos al final del ciclo del cultivo.....	68
6.8.3 Concentración de glucósidos durante el ciclo del cultivo.....	70
VII CONCLUSIONES.....	73
IIX RECOMENDACIONES.....	74
IX BIBLIOGRAFÍA.....	75
X ANEXOS.....	93

Lista de cuadros

Cuadro 1	Concentración de glucósidos en <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	11
Cuadro 2	Fenología de la <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni en Colombia, Valle del Cauca.....	17
Cuadro 3	Rendimientos máximos alcanzables por la variedad Eirete.....	18
Cuadro 4	Elementos esenciales y sus concentraciones en plantas superiores (Salisbury y Ross, 1994).....	20
Cuadro 5	Concentraciones de macronutrientes y micronutrientes en hojas de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	21
Cuadro 6	Concentración nutrimental de gallinaza y lombricompost.....	31
Cuadro 7	Características químicas del suelo.....	32
Cuadro 8	Descripción de los tratamientos.....	32
Cuadro 9	Arreglo espacial de los tratamientos.....	33
Cuadro 10	Metodologías para la determinación de glucósidos por HPLC.....	36
Cuadro 11	Determinación de glucósidos por HPLC.....	39
Cuadro 12	Efecto de la gallinaza y lombricompost, en la altura de planta, brotes basales, peso fresco y peso seco.....	44
Cuadro 13	Concentración nutrimental de las hojas de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni y su comparación con otros autores.....	51
Cuadro 14	Concentración nutrimental de los tallos de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni y su comparación con otros autores.....	52
Cuadro 15	Absorción nutrimental de la <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni var. Eirete a los 73 DDT.....	55
Cuadro 16	Extracción nutrimental de N, P y K en hojas de stevia.....	56
Cuadro 17	Estados fenológicos de la <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni var. Eirete.....	57
Cuadro 18	Uso del agua en <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni var. Eirete.....	59
Cuadro 19	Propiedades físicas de los sustratos al iniciar la investigación.....	60
Cuadro 20	Propiedades físicas de los sustratos al finalizar la investigación.....	62
Cuadro 21	Efecto de gallinaza y lombricompost en la concentración de	

	estevisido y rebaudiosido A al final ciclo de cultivo.....	68
Cuadro 22	Concentración de estevisido y rebaudiosido A durante el ciclo del cultivo de la stevia.....	70

Lista de figuras

Figura 1	Distribución a nivel mundial del cultivo de la <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	7
Figura 2	Ruta de síntesis de los glucósidos de la <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	10
Figura 3	Estructura química del esteviósido y rebaudiosido A.....	11
Figura 4	Variación de la temperatura máxima y mínima durante el ciclo del cultivo.....	29
Figura 5	Detalles de la poda y riego localizado.....	30
Figura 6	Cuantificación de brotes basales y altura de planta.....	34
Figura 7	Peso seco de hojas en dosis crecientes de nitrógeno como gallinaza y lombricompost.....	47
Figura 8	Concentración de macronutrientes en hojas de stevia en los tratamientos con gallinaza y lombricompost.....	48
Figura 9	Concentración nutrimental en diferentes cortes de la <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	53
Figura 10	Temperatura media durante el desarrollo fenológico de la <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	57
Figura 11	Fenología de la <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni var. Eirete.....	58
Figura 12	Variación de las características físicas: porosidad total, porosidad de aireación y capacidad de retención de humedad de los sustratos.....	63
Figura 13	Variación de las características físicas: densidad aparente, y agua fácilmente disponible de los sustratos.....	64
Figura 14	Concentración del rebaudiosido A a diferentes tiempos de agitación.....	65
Figura 15	Recuperación del procedimiento de elución.....	66
Figura 16	Cromatograma de un estándar del esteviósido.....	65
Figura 17	Cromatograma de un extracto de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.....	65
Figura 18	Concentración del esteviósido y del rebaudiosido A durante el ciclo de cultivo.....	71
Figura 19	Concentración del esteviósido y del rebaudiosido A durante el ciclo cultivo en grados días desarrollo.....	72

I. Introducción

En los últimos tiempos se han presentado en todo el mundo cambios importantes en la producción y el consumo de alimentos. Esta tendencia se vincula principalmente con la salud y con nuevas exigencias de los consumidores y una mayor conciencia de la importancia del cuidado del medio ambiente (Alvajana *et al.*, 2004; Pérez y Landeros, 2009). La demanda de productos del campo libres de agroquímicos y de fertilizantes inorgánicos, ha desarrollado un nuevo mercado dispuesto a pagar un precio extra por frutas, verduras, etc, obtenidas bajo un sistema de producción orgánico (Tourat, 2000).

Esta preferencia de los consumidores en adquirir alimentos orgánicos es debida principalmente al incremento de enfermedades atribuidas al alto consumo de productos sintéticos, tal es el caso de los edulcorantes artificiales utilizados para adelgazar y pacientes con diabetes. En México existen 10 millones de personas con esta enfermedad, y es preocupante que sea la segunda causa de muerte en el país en mayores de 45 años (OMS, 2010), y que el 30% de los pacientes con pie diabético sufran una amputación (FMD, 1992). Por lo que este sector de la población debe ser atendido y deberían contar con alternativas de edulcorantes inocuos.

La *Stevia rebaudiana* Bertoni es nativa del Paraguay y ha sido utilizada por décadas por los nativos guaraníes como endulzante tradicional y medicina natural (Soejarto, 2002; Brandle y Telmer, 2007). El dulce sabor de las hojas se debe al contenido de compuestos no calóricos diterpenicos. La stevia es ideal para personas que desean mantener el peso y para los diabéticos que deben controlar su ingesta de calorías. Los dos compuestos principales que aportan el dulzor son el esteviósido y el rebaudiosido A. Al primero se le atribuyen propiedades para el tratamiento de diabetes, obesidad, hipertensión y prevención de caries, al segundo es de mayor importancia para la industria en la producción de edulcorantes y bebidas (Soejarto, *et al.*, 1983; Kinghorn y Soejarto, 1985; Geuns, 2003). Lo

anterior ha llevado a esta planta a ganar espacio en el rubro agrícola, como diversificación de cultivo o como actividad principal; países como China, Brasil, Corea, Estados Unidos, Israel y Tailandia entre otros, han aumentado sus investigaciones para incrementar la superficie de cultivo y poder abastecer la creciente demanda de stevia por la industria o por los consumidores (Kinghorn y Soejarto, 1985; Kim *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2011).

De acuerdo a los avances agronómicos en el manejo de esta planta existe abundante información sobre fertilización química con N, P y K. Sin embargo, son escasas las investigaciones sobre fertilización orgánica en el cultivo de la stevia, pero estas han demostrado que aumenta la concentración de glucósidos, mejorando la actividad de la raíz e incrementando la tasa fotosintética durante la etapa de crecimiento vegetativo, y en consecuencia, la biomasa total (Xiangyang Liu *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013).

La stevia es una planta cuya propagación y producción está sujeta a diversos factores como el fotoperiodo, temperatura y humedad, además de plagas y enfermedades que afectan principalmente las hojas y los tallos, por lo que el manejo agronómico y la sanidad del cultivo son fundamentales para llegar a altos rendimientos. Así mismo, los beneficios de la agricultura orgánica han demostrado la calidad e inocuidad de los productos agrícolas, además de proteger el medio ambiente y la salud humana. Para contribuir al conocimiento de esta especie, en este trabajo se evaluó el rendimiento y la concentración del esteviósido y rebaudiosido A de *Stevia rebaudiana* Bertoni cultivada en invernadero con dos fuentes orgánicas (gallinaza y lombricompost).

II. Objetivos

2.1 Objetivo General

Evaluar el rendimiento y concentración de glucósidos en *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Eirete mediante el uso de dos fuentes de nutrición orgánica.

2.2 Objetivos específicos

Evaluar el efecto de la gallinaza y lombricompost en el rendimiento de la *Stevia rebaudiana* Bertoni, var. Eirete.

Evaluar el efecto de gallinaza y lombricompost en la concentración de glucósidos en *Stevia rebaudiana* Bertoni, var. Eirete.

Evaluar el efecto de gallinaza y lombricompost en la concentración nutrimental de las hojas y tallo de *Stevia rebaudiana* Bertoni, var. Eirete.

Establecer un modelo fenológico y la eficiencia en el uso del agua en la *stevia rebaudiana* Bertoni, var. Eirete.

Determinar el período de acumulación de glucósidos conforme a la fuente de nutrición y en diferentes momentos del desarrollo de la *Stevia rebaudiana* Bertoni, var. Eirete.

III. Hipótesis

3.1 Hipótesis general

Existen diferencias en el rendimiento de *Stevia rebaudiana* Bertoni conforme a la fuente de nutrición orgánica.

3.2 Hipótesis específicas

Hay variación en los parámetros de rendimiento y concentración de glucósidos y nutrimental en *Stevia rebaudiana* Bertoni, var. Eirete de acuerdo a la fuente de nutrición orgánica.

La concentración de glucósidos varía según el período de corte y de la fuente de nutrición orgánica.

IV. Revisión bibliográfica

4.1 Origen

Stevia rebaudiana Bertoni se originó en las regiones altas del noreste de Paraguay, entre las latitudes 23° y 24° sur, donde el dulce sabor de sus hojas y sus propiedades medicinales eran conocidas por los nativos guaraníes hace cientos de años (Brandle *et al.*, 1998; Geuns, 2003; Yadav *et al.*, 2011).

Durante siglos, las tribus guaraníes de Paraguay y Brasil han utilizado diversas especies de stevia, que llaman ka'a he'e (hierba dulce) y han sido empleadas como edulcorante; en yerba mate, en tés medicinales para el tratamiento de la acidez estomacal y en otras dolencias (Brandle y Telmer, 2007). En su estado nativo la stevia crece a orillas de los pantanos, en los montes de la región del Alto Paraná y en las montañas con altitudes entre 200 y 300 msnm. (Madan *et al.*, 2010; Yadav *et al.*, 2011).

La stevia fue llevada a España por el botánico y médico Pedro Jaime Esteve (1500–1556) quien en esos años convivía con los guaraníes. La planta fue clasificada botánicamente en 1899 por el naturalista suizo Moisés Santiago Bertoni, y el compuesto dulce se aisló por primera vez en 1909 por el químico italiano Ovidio Rebaudi, por lo tanto el nombre científico de la planta se estableció en honor a los que la han descubierto; *Stevia* (Jaime Esteve), *Rebaudiana* (Ovidio Rebaudi), *Bertoni* (Moises Bertoni).

La estructura química de la stevia se estableció en 1952, como un glucósido diterpeno que comprende tres moléculas de glucosa, unida a una aglicona la fracción steviol. Durante la década de 70's se aislaron otros compuestos, incluyendo el rebaudiosido A, con un poder edulcorante incluso más alto que del esteviósido (Barriocanal *et al.*, 2008; Cacciola *et al.*, 2011).

4.2 Descripción botánica

El género *Stevia* consta de aproximadamente 150 a 200 especies de plantas herbáceas, arbustos y subarbustos (Prakash *et al.*, 2008; Wolwer, 2012) y es uno de los más distintivos dentro de las Eupatoriaceae, debido a la uniformidad entre sus flores y capítulos (Singh y Rao, 2005). En Brasil, se han encontrado 36 especies distribuidas, en la región sur y central (Shock, 1982).

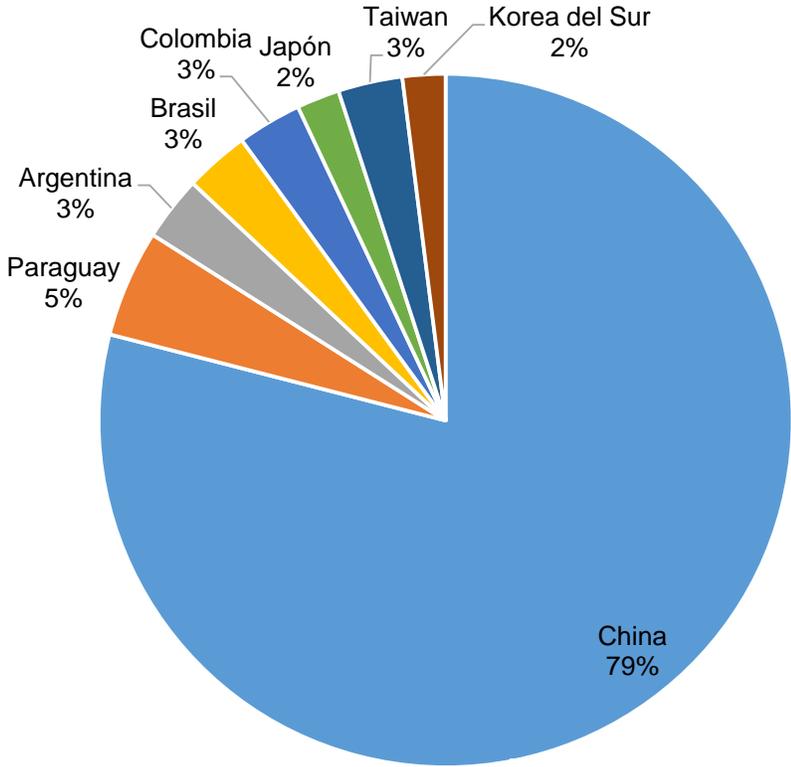
La planta puede llegar a tener un metro de altura, es perenne, con una vida útil de 5 años, el sistema radicular es fasciculado, no muy profundo; esta parte es la única zona en donde no contiene glucósidos (Carneiro, 1997; Madan *et al.*, 2010). Las hojas son sésiles, de 3 a 4 cm de largo, lanceoladas con pequeñas pubescencias en el envés, las flores son pequeñas y blancas con la garganta purpura pálida; el fruto consta de un eje de cinco nervaduras en forma de aquenio (Blumenthal, 1996; Rahmesh *et al.*, 2006, Lemus-Moncada *et al.*, 2011).

4.3 Siembra a nivel mundial

El creciente interés de la industria edulcorante y la búsqueda de un compuesto inocuo que reemplace a la sacarosa, ha permitido que la *Stevia rebaudiana* Bertoni prospere en países como Brasil, China, Corea, Estados Unidos, México, Israel y Tailandia (Kim *et al.*, 2002; Kinghorn, 2002; Sivaram y Mukundam, 2003). China es el mayor productor de *Stevia*, con el 79% de la producción mundial; este país, desde su introducción con éxito desde el Japón en 1977, ha convertido a la *Stevia* en la tercera fuente natural edulcorante más popular, después de la caña de azúcar y de la remolacha azucarera (Ramesh *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2011). La producción en China se realiza en invernaderos, con la finalidad de obtener tres cosechas anuales. Actualmente, Israel se encuentra realizando investigaciones para desarrollar variedades de *Stevia* de acuerdo a las condiciones ambientales de ese país (Mordechai *et al.*, 2013). Cabe destacar que Japón es el país con mayor cantidad de fábricas procesadoras y extractoras del esteviósido y rebaudiosido A (Seema, 2010; Goyal *et al.*, 2010).

Paraguay, segundo productor de stevia a nivel mundial, dedica aproximadamente 5 000 hectáreas a este cultivo, generando empleo directo en toda la cadena productiva para unas 10 000 personas. En este país se pretende aumentar las ventas a 10 millones de dólares anuales, lo que significa 10% de la facturación, en comparación con los países del sudeste asiático, equivalente a 100 millones de dólares (CAPASTE, 2010).

En México, el INIFAP ha realizado estudios en Nayarit, Yucatán y Sinaloa, estados que cuentan con las condiciones apropiadas para la producción de dicho cultivo. Se espera que el desarrollo de paquetes tecnológicos permita impulsar la producción de stevia y que este país pueda abrir el mercado nacional e internacional y fomentar el consumo de hojas secas de esta planta (INIFAP, 2011).



Fuente: Steviaone, 2012.

Figura 1. Distribución a nivel mundial del cultivo de la *Stevia rebaudiana* Bertoni.

En el Valle de México, el Colegio de Postgraduados ha llevado a cabo investigaciones sobre la productividad bajo invernaderos, micropropagación, producción orgánica, calidad de producto y manejo de la planta en maceta con el fin de familiarizarse con la especie y su consumo directo por la familia. Se espera que el desarrollo de paquetes tecnológicos permita impulsar la producción de stevia y que este país pueda abastecer el mercado nacional y participar en el internacional fomentando el consumo de hojas secas de la *Stevia rebaudiana* Bertoni (Muratalla *et al.*, 2010).

4.4 Propiedades de la hoja de stevia

Los beneficios de la stevia son principalmente su composición nutricional: la hoja es fuente de carbohidratos, proteínas y fibra cruda, que promueven el bienestar de la salud y reducen el riesgo de contraer enfermedades. Braz de Olivera *et al.*, (2011) encontraron en las raíces y hojas fructooligosacáridos tipo inulina, un polisacárido natural de origen vegetal, con propiedades funcionales importantes como el control de probióticos y como posible extracción como suplementos dietéticos.

En cuanto a proteínas Mohammad *et al.*, (2007) identificaron 9 aminoácidos en las hojas, ácido glutámico, ácido aspártico, lisina, serina, isoleucina, alanina, prolina, tirosina y metionina. Igualmente, en las extracciones el ácido fólico fue encontrado en mayor cantidad seguido por la vitamina C (Latham, 2002; Lemus-Moncada *et al.*, 2010).

Lo anterior demuestra que las hojas de esta planta son un suplemento completo; por consiguiente no solamente la extracción de los esteviósido y rebaudiosido A son importantes en la stevia sino también los aminoácidos esenciales, proteínas, vitaminas y lípidos presentes en las plantas que benefician la salud constituyéndola en un suplemento nutrimental completo (WHO, 2007; Abou-Arab *et al.*, 2010; Mishra *et al.*, 2010).

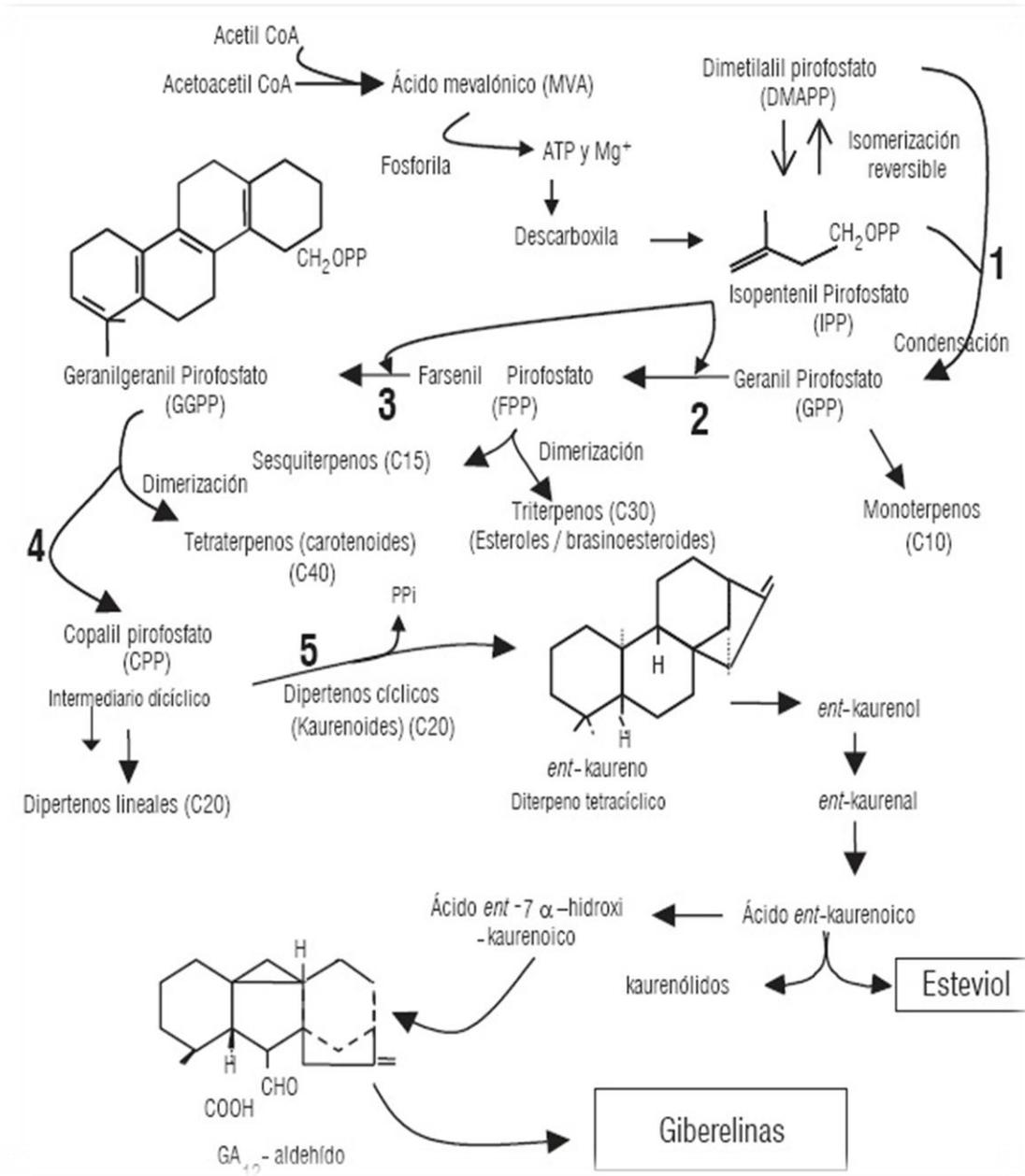
4.5 Síntesis de diterpenos glucósidos

Las especies vegetales al igual que otros organismos sintetizan y acumulan proteínas, polisacáridos, azúcares y lípidos a partir de nutrimentos inorgánicos. En particular las plantas poseen rutas para sintetizar sus metabolitos, estos se clasificando en dos, por un lado los primarios, abundantes en la naturaleza e indispensables para el desarrollo de su fisiología, que se encuentran en grandes cantidades; y por otro lado, los secundarios que son derivados del primero y su cantidad es menor y no cumplen funciones esenciales. Se ha observado que la acumulación de los metabolitos secundarios varía de acuerdo a la especie, época del año, características del suelo y a las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente. Entre los principales metabolitos secundarios se encuentran: fenilpropanoides, alcaloides y terpenoides en este último se encuentran los glucósidos de la stevia.

La ruta de síntesis de los glucósidos de la stevia es la del ácido giberélico (Figura 2), en donde la cadena de terpenos se alarga a partir de uniones sucesivas de isopentenil pirofosfato (IPP), considerado como el isómero activo (Richman *et al.*, 1999; Buchanan *et al.*, 2000). Las enzimas que catalizan el alargamiento de la cadena diterpenica son las prenil transferasas, de las cuales se han aislado hasta ahora, la geranil pirofosfatasa sintasa, enzima identificada que requieren Mg^{2+} y/o Mn^{2+} como cofactores (Suga y Endo, 1991; Kim *et al.*, 1996).

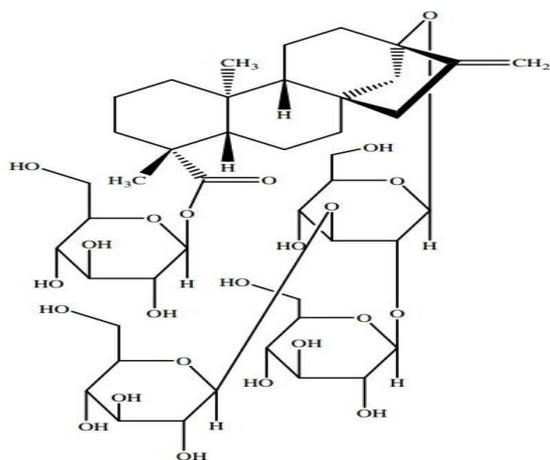
Los compuestos no calóricos denominados diterpenos glucósidos los constituyen el esteviósido, stebiolbiosido, rebaudiosido A, B, C, D y E (Soejarto, *et al.*, 1983; Kinghorn y Soejarto, 1985; Geuns, 2003). Entre estos, los que se encuentran en mayor cantidad son el esteviósido y el rebaudiosido A (Álvarez *et al.*, 1984; Tavarini y Angelini, 2013); el dulzor de los glucósidos difiere unos de otros, el rebaudiosido A por ejemplo, tiene una unidad de glucosa adicional en relación al esteviósido y es superior en términos de dulzura y en calidad de sabor, en cambio el segundo compuesto suele producir un sabor amargo al gusto, pero

se le atribuyen propiedades medicinales (Braz de Olivera *et al.*, 2011). Las estructuras químicas del esteviósido y rebaudiosido A se muestran en la Figura 3.

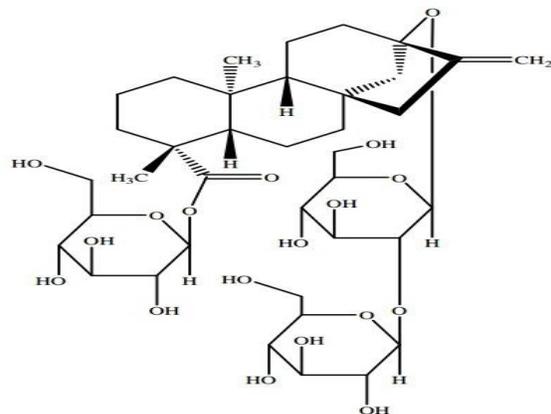


Fuente: Srivastara, 2002.

Figura 2. Ruta de síntesis de los glucósidos de la *Stevia rebaudiana* Bertonii.



Rebaudiosido A



Esteviósido

Fuente: Prakash *et al.*, 2008

Figura 3. Estructura química del esteviósido y rebaudiosido A.

Las concentraciones de los glucósidos de la stevia reportadas se ilustran en el Cuadro 1. Estas variaciones en el contenido son debido a las condiciones agronómicas, la variedad, las condiciones climáticas y la adopción de nuevas tecnologías agrícolas (Vani *et al.*, 1997; Pol *et al.*, 2007; Ceunen y Geuns, 2013). Actualmente la industria de los refrescos y edulcorantes, entre otras, requieren plantas de stevia con mayor contenido de rebaudiosido A que de esteviósido. Las concentraciones del primero oscilan de 3-10% y del segundo de 4-10%.

Cuadro 1. Concentración de glucósidos en *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Esteviósido	Rebaudiosido A	Referencias
%		
10.0	4.0	Kinghorn y Soejarto, 1985
3.1	8.6	Kolb <i>et al.</i> , 2001
5.3	1.8	Gardana <i>et al.</i> , 2010
9.1	3.8	Goyal <i>et al.</i> , 2010
5.2	8.0	Woelver-Riek <i>et al.</i> , 2010
6.1	10.1	Jiménez <i>et al.</i> , 2010

4.6 Determinación de glucósidos

Diversas técnicas analíticas han sido descritas para el análisis de los glucósidos de la stevia, la más utilizada es la cromatografía de líquidos (HPLC *High performance liquid chromatography*, por sus siglas en inglés). En el punto 5.7.7 se aborda ampliamente este aspecto.

4.7 Utilización de glucósidos de la stevia

Los extractos de las hojas de esta planta están disponibles comercialmente en Japón, Corea, China y América del sur, donde se han utilizado durante varios años para endulzar bebidas (Koyama *et al.*, 2003). En los Estados Unidos, el polvo de hojas de stevia y sus extractos se utilizan solo como suplemento dietético y como producto del cuidado de la piel (Wolwer y Rieck, 2012). Desde diciembre de 2008, la FDA (*Food and Drug Administration*, por sus siglas en inglés) declaró como seguros para su consumo al esteviósido y al rebaudiosido A.

La stevia es el edulcorante más utilizado en el mercado Coreano y Japonés. Durante los últimos 20 años, millones de consumidores japoneses han utilizado el extracto de stevia como un edulcorante seguro, para salsas, confites, gaseosas y pastas de dientes (Kinghorn y Soejarto, 1985; Geuns, 2003).

4.8 Beneficios para la salud

En 2007, Pol y Hohnovai, destacan al esteviósido para el tratamiento de personas con diabetes mellitus, obesidad, hipertensión y en la prevención contra la caries. Kapica *et al.*, 2014 evaluó los extractos de la stevia contra soluciones de sacarosa con objeto de determinar el efecto sobre las variables que fomentan la formación de caries dental en pacientes cooperantes, los autores llegaron a la conclusión de que los extractos de stevia pueden considerarse idóneos para la salud dental.

El estudio de Gregersen *et al.*, 2004 demostró que alimentos suplementados con 1 g de esteviósido en personas con diabetes tipo II era capaz de reducir los niveles de glucosa en sangre en aproximadamente 18%. Además, se han comprobado los efectos antioxidantes de las hojas de stevia, con altos contenidos de ácido fólico y compuestos de pirogalol (Brandle *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2011; Woelwer-Rieck, 2012).

4.9 Condiciones ambientales y agronómicas para el cultivo de stevia

El rendimiento de esta planta depende en gran medida de la especie y el genotipo con la cual se está trabajando. La temperatura óptima para el desarrollo de la stevia es de 26°C y la temperatura base es de 15°C. Por debajo de 9°C se detiene totalmente el crecimiento y por arriba de 30°C la planta transpira en mayor cantidad y en consecuencia hay un menor rendimiento del cultivo (Álvarez *et al.*, 1996; Carneido, 1997; Lemus-Moncada *et al.*, 2011). En cuanto al riego, este es fundamental en lugares en donde la precipitación anual es menor de 1440 mm; si la deficiencia de agua es prolongada, la planta puede no recuperarse (Shi *et al.*, 2000; Singh y Rao, 2005; Casaccia y Álvarez, 2008; Lemus-Moncada *et al.*, 2011).

De acuerdo a investigaciones realizadas la stevia es capaz de adaptarse a diversas condiciones ambientales (Zubiate, 2007; Mordechai *et al.*, 2013), la principal limitante para este cultivo es el fotoperiodo; se ha observado que la mayor cantidad de hojas y la concentración de glucósidos son favorecidas por los días largos, lo cual contribuye al aumento del desarrollo vegetativo de la planta (Tavarini y Angelini, 2014).

En Japón se utiliza una densidad de plantas por hectárea de 40 000 a 400 000 (Katajama, 1987). En general, una población de 100 000 plantas por hectárea es recomendable para un manejo eficiente en cuanto al control de malezas y fertilización (Carneiro, 1997; Brandle y Telmer, 2007;). Cabe resaltar que los diferentes agroecosistemas influyen en el cultivo de stevia, por lo que es

aconsejable llevar a cabo ensayos en diversas zonas con la finalidad de establecer una densidad adecuada de plantas en esa área en particular.

La floración disminuye la cantidad de glucósidos por lo que recomiendan el corte de la planta cinco días antes de la aparición de los botones florales (Funcfos, 2000; Geuns, 2012; Ceunen *et al.*, 2013). El corte se debe realizar en todas las plantas dejando únicamente de dos a tres pares de hojas (5 a 8 cm de la superficie del suelo).

La cantidad de hojas secas que pueden ser cosechadas varía de 15 a 35 g por planta (Carneiro, 2007; Casaccia y Álvarez, 2008; Mishra *et al.*, 2010). Serio (2010) reporta que una plantación de *Stevia rebaudiana* Bertoni en un corte puede producir entre 1000 y 1200 kg de hojas secas por hectárea, que contienen 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 es 300 veces más dulce que la sacarosa y es equivalente a un rendimiento de 21 000 kg de azúcar por hectárea.

4.10 Enfermedades y plagas de la stevia

La stevia es una planta que es susceptible al ataque de patógenos principalmente en las hojas, lugar donde se concentran los glucósidos (Prakas *et al.*, 2008), razón por la cual se debe cultivar bajo las mejores condiciones posibles y con las prácticas agronómicas eficientes.

Actualmente no existen ácaros o insectos que produzcan daño económico que ameriten denominarlos plagas del cultivo y que requieran un control sistematizado. Sin embargo, se recomienda inspeccionar el cultivo para evitar daños de pulgones o gusanos, además de hormigas cortadoras y langostas (Casaccia y Álvarez, 2008; INIFAP, 2011). A continuación se describen las enfermedades que afectan este cultivo:

a) Mal del talluelo

Los síntomas principales son fallas en la emergencia o marchitamiento, decoloración, vuelco y finalmente muerte de las plantas, debido a la pudrición fúngica al nivel del área del cuello de las mismas, este se manifiesta por manchones en una o varias partes. Los factores predisponentes: suelo mal tratado o condiciones de humedad y sombra excesiva (Funcfos, 2000; Casaccia y Álvarez, 2008).

b) Marchites o pudrición violácea

El agente causal es *Rhizoctonia solanani*, los síntomas característicos se presentan en las hojas de las plantas recién cortadas que adquieren un color rosado violáceo y las lesiones en el tallo y raíces son hundidas y oscuras, finalmente, las plantas se marchitan y mueren (Katayama *et al.*, 1976).

c) Seda blanca

El hongo *Sclerotium rolfsii* Sacc, ataca principalmente el cuello de la planta causando marchites y muerte de la planta (Funcfos, 2000; Zubiato, 2007).

d) Podredumbre del cuello

Esta enfermedad es causada por el hongo *Sclerotinia sclerotium* de Bary, afecta a las plantas de stevia en dos fases distintas en almácigos causando la pudrición violácea y en estado adulto afectando la base del tallo y las hojas inferiores, dando lugar tanto a la pudrición del cuello como a la formación de esclerocios negros de varios tamaños.

4.11 Fenología de la *Stevia rebaudiana* Bertoni

La aparición y transformación de órganos vegetales como la germinación, emergencia, desarrollo vegetativo de una planta es conocida como fenología. Un modelo fenológico permite predecir en el tiempo un evento en el desarrollo de la

planta. La fisiología vegetal depende en gran medida de la temperatura y del fotoperiodo; sin embargo, en el trópico la temperatura es la variable con mayor influencia en el rendimiento de los cultivos (Baker y Reddy, 2001; Bonhomme, 2000; Norman *et al.*, 2003).

Los modelos fenológicos se clasifican en dos grupos; por un lado, los descriptivos cuyas características reflejan poco o nada los mecanismos causales del comportamiento del sistema, y por otro, los modelos explicativos que se caracterizan por tratar de establecer relaciones entre el fotoperiodo, temperatura y humedad y su efecto en el sistema de cultivo (Hajek *et al.*, 1976; Penning de Vries *et al.*, 1989). El cálculo del tiempo térmico o grados días de desarrollo se puede llevar a cabo por varios métodos el más utilizado es el simple, este se calcula mediante la temperatura máxima y mínima del día y posteriormente se le resta la temperatura base (Jenni *et al.*, 1996; Confalone y Navarro, 1999).

En el cultivo de la stevia la fenología está determinada por el fotoperiodo, la etapa más importante es el momento de la aparición de los brotes basales ya que son fundamentales para el desarrollo de brotes axilares y posteriormente de hojas. En Brasil, Carneiro *et al.*, (1989) realizaron el corte a los 54 días después de la poda de uniformización, el mayor rendimiento de hojas en el estado vegetativo se obtuvo entre 72 a 82 días después del corte. Resultados similares son reportados por Bonilla *et al.*, (2007) en donde desarrollaron un modelo fenológico para la stevia en Colombia en el Valle del Cauca, al estudiar esta planta desde la siembra con semilla hasta la senescencia; el período de desarrollo de la planta fue de 169 días. Las etapas se observan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Fenología de la *Stevia rebaudiana* Bertoni en Colombia, Valle del Cauca.

Estado de desarrollo	Días después de la siembra	Duración días
Emergencia	6	11
Desarrollo vegetativo	17	54
Inicio de la floración	71	44
Fructificación	115	54
Senescencia	169	34

4.12 Variedades

Las dos variedades más cultivadas en Latinoamérica son la Eirete y la Morita II. Actualmente, se busca desarrollar plantas de stevia con mayor cantidad de glucósidos, principalmente de rebaudiosido A y de esta manera disminuir el ligero sabor amargo del esteviósido.

En el 2005 se lanzó oficialmente la variedad denominada Eirete que significa muy dulce; esta se desarrolló en el Instituto Paraguayo de Tecnología Agrícola (IPTA), que es una variedad con características agronómicas ampliamente superiores a la criolla. La variedad Eirete debe ser propagada asexualmente, es decir multiplicada por esquejes. En caso de que la propagación se realice por semilla botánica, la descendencia sería muy variada en sus características morfológicas y fisiológicas, debido a la segregación genética. La variedad Eirete florece totalmente en forma uniforme, lo cual facilita la realización del corte en el momento más oportuno. (Ministerio de Agricultura y Ganadería – Paraguay, 2008). Otra característica es la concentración de principios edulcorantes, Eirete presenta 7% más de rebaudiosido A que la variedad criolla

El rendimiento potencial de la variedad Eirete obtenido en condiciones experimentales en el IPTA, sin riego complementario, a una densidad de 100 000 plantas por hectárea en el primer año de producción, fue de 4990 kg ha⁻¹ (Álvarez,

et al., 2006; Casaccia y Álvarez, 2008). En el Cuadro 3 se pueden observar los rendimientos de stevia en las tres épocas de corte, siendo el más productivo el segundo con 2400 kg de hojas secas por hectárea.

Cuadro 3. Rendimientos máximos alcanzables por la variedad Eirete, Álvarez, *et al.*, (2006).

Variedad	Primer corte	Segundo corte	Tercer corte	Total
	kg ha ⁻¹			kg ha ⁻¹ año
Eirete	929	2400	1665	4995

4.13 Requerimientos nutrimentales y fertilización orgánica

Zubiate (2007) indica que la stevia no es muy exigente en macronutrientes 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 aumentan más aún si se realizan varios cortes al año (Brandle *et al.*, 1998; Casaccia y Álvarez, 2008).

Maheshwar (2005) concluyó que al aplicar 105 kg de nitrógeno ha⁻¹ es posible obtener una producción de hojas secas de 3.5 toneladas por hectárea. Estudios recientes del requerimiento de nitrógeno en hidroponía fueron estudiadas por Salgado *et al.*, (2013), encuentran que la acumulación de biomasa de *Stevia rebaudiana* Bertoni es directamente proporcional a medida que se incrementa el nivel de nitratos hasta 9 meq L⁻¹. En esta investigación se determinó el requerimiento interno del cultivo de 2 g de nitrógeno por planta.

De acuerdo con Prakash *et al.*, (2008), la fertilización con potasio aumentó al 7% el rendimiento de la stevia, con 9% de esteviósido en hojas, lo que hace significativo a la aplicación de este elemento para aumentar la cantidad de glucósidos en planta. Otras investigaciones indican que la fertilización química con zinc y fósforo no han sido significativas (Pól *et al.*, 2007); de igual manera, la aplicación excesiva de fósforo inhibe la absorción de zinc en las plantas de stevia (Das *et al.*, 2005).

El efecto del abono orgánico y químico en el rendimiento de la stevia se ha estudiado en parcelas experimentales en la Universidad de Qingdao, China. Los resultados mostraron que el estiércol promueve el crecimiento de la raíz, 40 días después del trasplante, en comparación con el cultivo con fertilizantes químicos. Así mismo; la fertilización orgánica mejora la actividad de la raíz y aumenta la tasa fotosintética en la etapa de crecimiento vegetativo, así como la biomasa de la stevia (Xiangyang Liu *et al.*, 2011). Yang *et al.*, 2013 observaron que el cultivo orgánico en comparación a los fertilizantes sintéticos obtuvo más esteviósido, en relación con el rebaudiosido A.

4.14 Concentración nutrimental de las hojas de stevia

Las plantas sintetizan sus compuestos metabólicos y estructurales con nutrimentos químicos que se encuentran en concentraciones de 2% a 10% del peso seco y ejercen una influencia vital sobre el crecimiento. Se han aislado 17 elementos considerados esenciales y se clasifican por su cantidad en macronutrimentos y micronutrimentos. En el Cuadro 4 se ilustran estos con las concentraciones y su forma de absorción en la mayoría de las plantas superiores.

Diversos estudios corroboran que el aspecto nutrimental de los cultivos influye en su capacidad productiva. Utumi *et al.*, (1998) al someter a deficiencias a la stevia concluyó que los síntomas visuales son similares a la mayoría de las especies vegetales, además que las deficiencias de N, P y Mg disminuyen el rendimiento de hojas secas; las deficiencias de K, Ca y S disminuyen la concentración de glucósidos.

Cuadro 4. Elementos esenciales en plantas superiores y sus concentraciones promedio (Salisbury y Ross, 1994).

Elemento	Símbolo	Forma disponible al vegetal	Concentraciones en tejido seco
			mg kg ⁻¹
Molibdeno	Mo	MoO ₄ ²⁻	0.1
Níquel	Ni	Ni ²⁺	6
Cobre	Cu	Cu ³⁺ , Cu ²⁺	6
Zinc	Zn	Zn ²⁺	20
Manganeso	Mn	Mn ²⁺	50
Boro	B	H ₃ BO ₃	20
Hierro	Fe	Fe ³⁺ , Fe ²⁺	100
Cloro	Cl	Cl ⁻	100
Azufre	S	SO ₄ ²⁻	1 000
Fósforo	P	H ₂ PO ₄ ⁻ , HPO ₄ ²⁻	2 000
Magnesio	Mg	Mg ²⁺	2 000
Calcio	Ca	Ca ²⁺	5 000
Potasio	K	K ⁺	10 000
Nitrógeno	N	NO ₃ , NH ₄ ⁺	15 000
Oxígeno	O	O ₂ , H ₂ O	450 000
Carbono	C	CO ₂	450 000
Hidrógeno	H	H ₂ O	60 000

En investigaciones realizadas en Colombia con la var. Morita mostraron que la deficiencia de nitrógeno causa una disminución en el crecimiento y desarrollo de las partes morfológicas de la planta, principalmente en hojas, órgano de interés comercial. En cuanto al fósforo, este es esencial para la formación de los glucofosfatos como uridin difosfato glucosa y su deficiencia disminuye la síntesis de glucósidos diterpenos entre otros procesos metabólicos, mientras que las deficiencias de potasio ocasionan reducción de ramas por planta, Jarma *et al.*, (2009). En el Cuadro 5 se ilustra la concentración nutrimental reportada por diversos autores.

Cuadro 5. Concentraciones nutrimentales de macronutrientes y micronutrientes en hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Elemento	Tavarini – Angelini (2014)	Atteh <i>et al.</i> , (2011)	Lena (2010)	Jarma <i>et al.</i> , (2010)	Utumi <i>et al.</i> , (1998)
Nitrógeno %	2.18	-	2.15	2.07	2.56
Fósforo	0.20	0.26	0.34	0.20	0.74
Potasio	2.25	1.73	3.45	0.99	4.36
Calcio	-	0.82	0.61	-	0.52
Magnesio	-	0.24	0.50	-	0.26
Hierro $\mu\text{g g}^{-1}$	-	366	702	-	-
Cobre	-	6	17	-	-
Manganeso	-	30	68	-	-

En lo que concierne al tallo Tavarini y Angelini, (2014) encontraron 1.13%, 0.14% y 3.0% de nitrógeno, fósforo y potasio, respectivamente. Cabe señalar que el tallo de la stevia no se utiliza para la extracción de glucósidos debido a su baja concentración.

4.15 Agricultura orgánica

El compost es el resultado de la conversión de los desechos orgánicos procedentes del hogar, agricultura y mercado en un material relativamente estable llamado humus, obtenido por descomposición aeróbica bajo condiciones controladas, particularmente de humedad y aireación, en el cual participan bacterias, hongos y actinomicetos. Este material es utilizado en el cultivo de plantas y en prácticas agrícolas con la finalidad de abastecer de nutrientes y mejorar las características físicas y biodiversidad ecológica del suelo (Gómez *et al.*, 1999; Pérez y Landeros, 2009). Este sistema de producción no solo implica fertilizar con abonos orgánicos, sino impulsar un cambio de paradigma y de toma de conciencia al considerar prácticas amigables con el medioambiente (Feliz *et al.*, 2008). Espinoza *et al.*, (1988), señalan que la agricultura orgánica es una estrategia para el desarrollo ambiental que trata de cambiar algunas limitaciones

encontradas en la producción convencional. El uso de abonos orgánicos más que una nueva tecnología es una práctica que mejora el suelo y fomenta el uso de insumos locales, que favorecen un valor agregado en la cadena de comercialización.

La producción de hortalizas y frutales en parcelas orgánicas cada día va en incremento ya que cumple con las normas de calidad exigida por los consumidores (Gómez *et al.*, 2001; Félix *et al.*, 2008), sin embargo, en el mundo, la agricultura orgánica todavía es limitada por falta de conocimientos que se requiere para el control de plagas y enfermedades en los cultivos, sin la utilización de productos fitosanitarios, pero, para la producción en pequeña escala es decir, para autoconsumo, es una alternativa que puede ser fácilmente adoptada por los productores (Arrollo, 2005). Cabe resaltar que, en el cultivo de la stevia cada día aumenta el interés por producir esta planta orgánicamente.

4.15.1 Composición química y concentración nutrimental de los abonos orgánicos

Los abonos orgánicos están compuestos por un gran grupo de diversos materiales, y se utilizan en la agricultura como mejoradores fitosanitarios y de características físicas y químicas del suelo, y como fuente de nutrimentos para los cultivos (Cruz, 1982). El uso de los abonos orgánicos para mantener la disponibilidad y mejorar los rendimientos de las cosechas se ha utilizado desde la antigüedad; entre los que más se utilizan se encuentran los abonos verdes, compost, lombricompost, estiércoles, y residuos de cosechas etc. (López *et al.*, 1979; Castellanos *et al.*, 1982). Los fertilizantes orgánicos poseen características variables principalmente en su composición química y la aplicación constante mejora las características físicas y biológicas de los suelos (Ruiz, 1966).

El manejo de los abonos orgánicos ha sido utilizado por los pequeños agricultores incorporándolos directamente como estiércoles o desechos de frutas y verduras producidos en su agroecosistema. En la mayoría de los cultivos, se observa que las aplicaciones son principalmente en forma de estiércoles, esto es

porque se obtienen respuestas favorables en el rendimiento de las cosechas (Trinidad, 1987). Lo anterior se explica porque los estiércoles influyen en la fertilidad física de los suelos como: porosidad, aireación, capacidad de retención de humedad, infiltración y estabilidad de agregados, lo que influye directamente en el desarrollo radical y en la facilidad de la planta para adquirir agua y nutrimentos. Además con la aplicación de abonos orgánicos aumentan la fertilidad, hay mayor disponibilidad nutrimental y contenido de materia orgánica.

Los residuos orgánicos contienen prácticamente todos los elementos esenciales que requieren las plantas para su desarrollo, pero para poder ser absorbidos necesitan estar disponibles y pasar por el proceso de mineralización, es decir la liberación de nutrimentos de compuestos orgánicos (Fink, 1988; Trinidad, 1999).

La composición química de los abonos orgánicos es variable aunque en la mayoría de los casos contiene todos los nutrimentos. En el caso de los estiércoles está determinada por: la especie animal, la edad, alimentación, tipo de cama y manejo (Cruz, 1995). La gran ventaja de los abonos orgánicos, en comparación a los fertilizantes químicos, es que cuando se aplica por ejemplo urea o superfosfato solo, se están agregando uno o dos nutrimentos, en cambio, los abonos orgánicos aportan casi todos los nutrientes esenciales, además de aminoácidos que pueden ser aprovechados por la planta.

La concentración de N, P y K en los abonos orgánicos es relativamente variable y la suma de todos ellos raramente excede el 10% del peso seco de los estiércoles. Castellanos (1982) determinó que la concentración química de los abonos orgánicos es efecto del manejo y la nutrición de los animales. El nitrógeno tiende a ser el elemento esencial más importante en los abonos orgánicos por su mineralización y su movilidad; los factores que controlan la disponibilidad de nitrógeno en los estiércoles son: a) la concentración de N en el abono b) la distribución de N entre formas orgánicas e inorgánicas y c) la velocidad de la mineralización del abono orgánico.

El fósforo de los estiércoles es mucho menos soluble que el potasio, cerca del 30% de su totalidad se encuentra en forma orgánica, el 25% en forma soluble en agua y un 45% se encuentra formando minerales inorgánicos insolubles (Ruiz, 1966).

4.15.2 Tasa de mineralización de algunos estiércoles

Los elementos como el nitrógeno, fósforo y azufre que se encuentran formando parte de las estructuras orgánicas de los abonos, deben de pasar por un proceso de mineralización para poder ser absorbidos por las plantas.

La mineralización de los abonos orgánicos se expresa en forma progresiva en su primera aplicación, por ejemplo, en la descomposición del nitrógeno orgánico el 30% se libera en el primer año, 10% el segundo y 5% el tercero. De esta manera el efecto residual del abono orgánico se prolonga a través del tiempo en comparación a los fertilizantes químicos (Pratt *et al.*, 1973).

La descomposición de cualquier abono orgánico es afectada por la cantidad de microorganismos del suelo, la temperatura, humedad y la composición del material (Pratt *et al.*, 1973).

Gallinaza

Cuando se habla de gallinaza se refiere a los excrementos de las gallinas, con o sin los materiales que se utilizan como camas en los establecimientos; este material es un abono con alto contenido nutrimental y de composición heterogénea (Labrador, 2001; Garret, 2004), debido a la alimentación de las aves y a los materiales empleados en las camas utilizadas en los gallineros.

En lugares en donde la gallinaza se utiliza como fertilizante orgánico, primeramente se dejan compostear los materiales con una relación C/N alta; durante 2 a 3 meses de compostaje se obtiene el compost y de esta manera se equilibra su composición convirtiéndolo en un material con una relación C/N baja

(10-15). Este proceso se debe de realizar con cuidado debido a que un manejo inadecuado puede producir pérdidas de nitrógeno.

Martínez (1977) menciona que aquellas hortalizas que requieren niveles elevados de nitrógeno se benefician con la fertilización de la gallinaza, recomendándolo para las hortalizas como las coles y lechugas con aplicaciones de 11 a 16 t ha⁻¹, no así para el cultivo del tomate, pimiento y calabaza donde recomiendan cantidades moderadas, de 2.5 a 5 t ha⁻¹, debido a que una alta cantidad de nitrógeno puede producir un exceso de tallos y hojas con poca fructificación.

El estudio de la gallinaza como enmienda agrícola ha sido estudiado por Orozco *et al.*, (1999), quienes concluyen que este abono elevó el pH del suelo debido a la alta concentración de calcio e incremento la capacidad amortiguadora del mismo. En cuanto a la fertilización de árboles frutales, la gallinaza mostró que influye en la floración y en el rendimiento de los frutos así como en la concentración nutrimental de las hojas (Peralta *et al.*, 2014). Por lo anterior, en esta investigación se utilizó gallinaza como fuente orgánica.

Lombricompost

Es un abono orgánico resultado de las excretas de las lombrices, es de gran uniformidad y de buen contenido nutrimental, excelente estructura, densidad, porosidad, aireación y capacidad de retención de humedad (Soto y Munos, 2002; Salazar, 1999), según el análisis nutrimental el humus de lombriz presenta hasta un 5% de nitrógeno, fósforo y potasio; 4% de calcio y un pH entre 7 a 7.5 (Fernández, 1986; Hernández y Cruz, 1993). La lombricompost contiene elevada carga enzimática y bacteriana que incrementa la solubilidad de los elementos nutritivos, liberándolos en forma paulatina, lo que facilita la absorción por las raíces y disminuye la lixiviación (Martínez, 1996; Atiyeh *et al.*, 2000).

Aunado a lo anterior, los ácidos húmicos y fúlvicos que contiene este abono mejoran las características químicas de los suelos. Además contiene hormonas

que favorecen el crecimiento vegetal. Últimamente se ha estudiado a la lombricompost para el control de patógenos del suelo, por lo que no solo aporta nutrimentos si no también controla hongos y nematodos que afectan a los cultivos (Romero, 1997).

Se ha demostrado que la lombricompost mejora las propiedades físicas, químicas y biológicas del sustrato original (Castillo *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2012). Estos resultados, demuestran las bondades que se presentan al utilizar lombricompost como sustrato, favoreciendo el crecimiento de los cultivos tanto en vivero o invernadero (Hernández-Valencia, 1999; Saeker *et al.*, 2012). Por las características anteriores y por el impulso que se pretende dar para que pequeños productores composteen residuos orgánicos vía el lombricompostaje se utilizó el lombricompost en este estudio.

4.16 Sustratos

El sustrato es todo material sólido orgánico o mineral, distinto al suelo, que colocado dentro de una maceta permite el anclaje del sistema radical (Abad, 1991; Abad y Noguera, 1998). Puede ser un material activo como abonos orgánicos o inertes como tezontle. Cuando la finalidad es producir una planta hortícola, es conveniente utilizar una mezcla de sustratos para encontrar las mejores propiedades, físicas, químicas y biológicas, además de disminuir el costo del sustrato (Abad *et al.*, 1993).

Los sustratos pueden proporcionarle al cultivo, además de soporte, nutrimentos, y un mejor control de los factores relacionados al sistema radical de la planta. La cantidad del sustrato depende del cultivo, tamaño de la maceta y sistemas de riego para el manejo de las soluciones nutritivas o del agua. Las funciones de un sustrato según De Boodt (1975) y Bastida (2002) son el de proporcionar agua al sistema radical y nutrimentos necesarios además de oxígeno y anclaje para la raíz.

Los materiales utilizados como sustratos para una gran variedad de cultivos, pueden ser mezclados o solo un material. Para el cultivo de las plantas la elección del material depende de su disponibilidad, costo y finalidad de la producción (Bunt, 1998).

4.16.1 Propiedades de los sustratos

En un sustrato las propiedades físicas tienden a ser las más importantes, debido a que no se pueden modificar una vez que ha sido establecido el cultivo (Raviv *et al.*, 1986); las partículas sólidas y los espacios libres constituyen al sustrato.

La porosidad de un sustrato es el porcentaje de su volumen que no se encuentra ocupado por partículas sólidas, es decir, es el volumen de poros (aire o agua) y el volumen total que ocupa el sustrato en la maceta (Bett, 2005; Gonzales *et al.*, 2005). La variación de la porosidad se encuentra en intervalos de 30 a 95% en la mayoría de los materiales utilizados; pero el valor óptimo se encuentra entre 80 y 85% (De Boodt y Verdonck, 1972; Verdonck *et al.*, 1984; Bunt, 1988; Abad *et al.*, 1993; Ansorena, 1994).

Los sustratos con partículas de mayor diámetro requieren un riego más frecuente ya que gran parte de los poros están ocupados por aire, en cambio los poros pequeños retienen mayor volumen de agua, por lo tanto, la frecuencia de riego es menor. Así también el diámetro de las partículas y su distribución determinan la capacidad de retención de humedad y el flujo del agua dentro del sustrato que es muy importante para el desarrollo del cultivo (Baber *et al.*, 1991; Adler, 1992; Terés *et al.*, 1995).

La densidad del sustrato es la relación entre la masa en peso seco y el volumen en húmedo (Bunt, 1988). El intervalo de la densidad de los sustratos es de 0.03 g cm^{-3} a 0.8 g cm^{-3} donde las densidades más bajas corresponden a los materiales orgánicos (Abad y Noguera, 1998). Las densidades óptimas para los sustratos mencionadas por Abad *et al.* (1993) son de 0.6 g cm^{-3} hasta 1.13 g cm^{-3} ,

en donde se observa el mejor crecimiento radical y de la parte aérea de las plantas. Los abonos orgánicos disminuyen la densidad de los sustratos, por lo que es recomendable combinarlas con materiales inorgánicos con partículas de mayor diámetro para elevar la densidad y obtener mejor aireación y movimiento del agua.

Las propiedades químicas de los sustratos se caracterizan por proveer a las plantas de nutrimentos en concentraciones adecuadas durante su crecimiento. Los materiales orgánicos además de mejorar las propiedades físicas son fuente de nutrimentos para las plantas, contribuyen en la formación y presencia de sustancias húmicas, así también, son de importancia el pH y la salinidad. La conductividad eléctrica, es decir, la presencia de sales es determinante para las plantas por arriba de 2 dS m^{-1} , ya que las plantas se ven afectadas y disminuyen su rendimiento, por esta razón los abonos orgánicos no pueden ser utilizados como sustratos únicos y se debe de tener precaución debido a que altas dosis afectan el rendimiento de la planta (Eghball *et al.*, 2000; Rosen y Bierman, 2005). En esta investigación se combinaron mezclas de gallinaza, lombricompost, tezontle y suelo para propiciar un medio adecuado del crecimiento de las plantas de stevia.

Los desechos urbanos podrían ser una alternativa en el empleo como sustratos y de esta manera mejorar las propiedades biológicas del medio de crecimiento, además de esta forma mitigar la acumulación de residuos que pueden causar un efecto negativo en el ambiente (Capistrán *et al.*, 2001).

Los sustratos orgánicos se deben utilizar en cantidades adecuadas para que los microorganismos no compitan con las plantas por oxígeno y nutrimentos; además altas cantidades de sustratos orgánicos pueden aumentar la conductividad eléctrica disminuyendo el rendimiento y en algunos casos ocasionando la muerte de la planta; por esta razón los materiales orgánicos no pueden ser utilizados en un 100% como medio de crecimiento. En cambio estos mejoran la retención de humedad y pueden ser utilizados como mecanismos de control biológico para algunas enfermedades (Hoitink *et al.*, 1991; Boehm *et al.*, 1997).

V. Materiales y métodos

5.1 Ubicación del experimento

El estudio se realizó en el invernadero de la LPI 4 en el Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados, estado de México. El invernadero está ubicado geográficamente a 19° 29' LN y 98° 53' LO, a una altitud de 2250 metros (INEGI, 2010). La investigación se desarrolló de mayo a agosto de 2014. La variación de la temperatura máxima y mínima durante el desarrollo del experimento se presenta en la Figura 4.

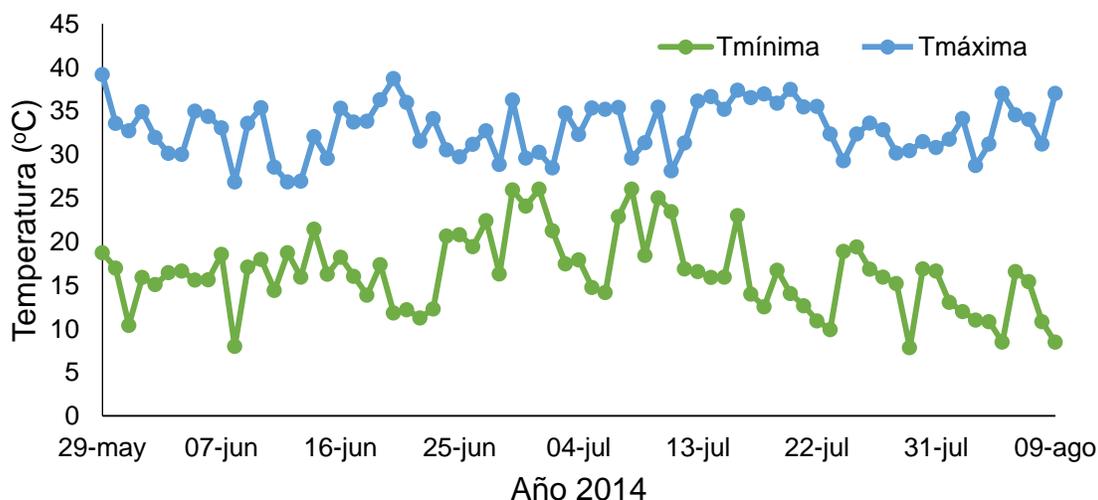


Figura 4. Variación de la temperatura máxima y mínima durante el ciclo del cultivo (29 de mayo al 9 de agosto del 2014).

5.2 Material vegetal

Se utilizaron plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, de la variedad Eirete, introducida desde su centro de origen, Paraguay, por el M.C. Alfonso Muratalla en 2008. Este material se reprodujo al inicio por semilla. La variedad se caracteriza por la resistencia a enfermedades y por tener rendimientos superiores a la variedad nativa, con un rendimiento potencial de 4995 kg ha⁻¹ en un año de cultivo, para una densidad de siembra de 100 000 plantas ha⁻¹ (Casaccia y Álvarez, 2008). Para esta investigación el material se multiplico asexualmente de plantas madres plenamente caracterizadas.

5.3 Manejo del cultivo

El trasplante de los esquejes se realizó el 15 mayo con una planta por maceta; primeramente se observó que las plantas se establecieron de manera que no hubiera ninguna pérdida que podría afectar la investigación. Una vez que las plantas se adaptaron al medio de crecimiento (suelo + tezontle + gallinaza o lombricompost) se realizó la poda de uniformización a 5 cm de altura de la base del sustrato, de esta manera se aseguraba el rebrote. Se recomienda este manejo para que las plantas puedan emitir brotes basales, ya que estas son las más importantes para la producción de biomasa.

Se aplicó riego por goteo en el experimento. La cantidad de agua a aplicar se manejó mediante una olla de evapotranspiración donde se asume que el agua evaporada es el equivalente a lo perdido por el cultivo. Diariamente se medía el agua evaporada, de esta forma se conocía la cantidad de agua a aplicar al siguiente día. Por un lado, con este sistema de riego, se reponía el agua perdida y por otro lado, con el riego localizado, se aumentó la eficiencia en la utilización de este recurso, además de disminuir la lixiviación de los nutrientes.



Poda de uniformización



Riego localizado

Figura 5. Detalles de la poda y el riego localizado.

El agua evaporada se multiplicó por el área de la maceta. Mediante la siguiente fórmula se determinó el tiempo que se debía de regar.

$$Q = \frac{\text{Volúmen}}{\text{Tiempo}} \rightarrow T = \frac{\text{Volúmen}}{\text{Caudal}}$$

Donde:

Q= caudal, cantidad de agua del sistema de riego.

V= Volumen requerido.

T= Tiempo a regar.

5.4 Análisis del suelo y abonos orgánicos

Los abonos orgánicos utilizados en el experimento fueron lombricompost y gallinaza; el primero se consiguió por donación del M. C. Rubén Zepeda Piña Profesor de la Universidad Autónoma Chapingo y el segundo se obtuvo del campo experimental del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Los dos materiales se secaron y fueron solarizados para eliminar patógenos. Los abonos se tamizaron en malla N° 10 (2.00 mm), se homogenizaron y se tomaron muestras representativas para conocer la concentración nitrógeno que se realizó por el método micro Kjeldahl (Bremmer, 1965), fósforo, potasio, calcio, magnesio y sodio por la digestión HNO₃-HClO₄ (Jackson, 1964). Los resultados se observan en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Concentración nutrimental de los abonos utilizados.

Abono	Nitrógeno	Fósforo	Potasio	Calcio	Magnesio	Sodio
	%					
Gallinaza	2.14	1.14	0.76	11.55	0.64	0.20
Lombricompost	1.00	0.67	1.90	2.43	0.58	0.23

Las determinaciones analíticas en el suelo fueron las siguientes: pH (Jackson, 1976), materia orgánica (Jackson, 1976), nitrógeno total (Bremmer, 1965), fósforo Olsen (Olsen y Dean, 1965), las bases intercambiables con acetato de amonio 1N pH 7 (Chapman, 1965), y los micronutrientes por DTPA (Lindsay y Norvell 1978). En el Cuadro 7 se presentan los resultados de los análisis químicos.

Cuadro 7. Características químicas del suelo.

pH	CE	N	P	K	Ca	Mg	Na	Fe	Cu	Mn	Zn
H ₂ O			Olsen	NH ₄ OAc 1N pH7				DTPA			
	mmho cm ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	cmol kg ⁻¹				mg kg ⁻¹			
6.8	0.11	0.17	15	1.37	16.5	1.37	0.17	41	0.5	3.6	20

5.5 Descripción de tratamientos

Con base en el análisis nutrimental del suelo, de la gallinaza, lombricompost y la tasa de mineralización de estos, 36% y 20% respectivamente para 4.8 meses de desarrollo de la planta, se diseñaron los tratamientos que consistieron en 3 dosis de cada uno de los abonos, haciendo un total de seis tratamientos. Para la dosis media de nitrógeno se tomó en cuenta el requerimiento interno de la stevia, 2 g por planta, determinado por Salgado *et al.*, (2013). Por lo tanto, las dosis consistieron de 1, 2 y 4 gramos de nitrógeno por maceta que corresponden a las dosis baja, media y alta. Como sustrato se usó una mezcla de suelo-tezontle en la proporción 60:40% (v/v) más la cantidad de abono orgánico que se utilizó como fuente de nitrógeno de acuerdo a los tratamientos generados.

En el Cuadro 8 se indican los tratamientos con gallinaza y lombricompost para obtener las dosis de nitrógeno; de acuerdo a la concentración nutrimental y su tasa de mineralización se obtuvo la cantidad de estos abonos que se agregaron por maceta. Los cálculos realizados se pueden observar en el Anexo A.

Cuadro 8. Descripción de los tratamientos.

Tratamiento	g N/maceta	Fuente orgánica	AO ¹ g/maceta
T1	1	Gallinaza	176
T2	2	Gallinaza	353
T3	4	Gallinaza	706
T4	1	Lombricompost	549
T5	2	Lombricompost	1099
T6	4	Lombricompost	2198

¹ Abono orgánico (gallinaza o lombricompost)

5.6 Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar con 6 tratamientos y 4 repeticiones. La unidad experimental fue una maceta de peso base de 10 kg (suelo–tezontle) y se le agregó la cantidad correspondiente de cada uno de los abonos orgánicos. El sustrato y la cantidad de abono orgánico se mezclaron perfectamente y se depositó en una bolsa de polietileno negro de 12 L de capacidad con una planta de stevia la que recibió a la semana de establecida la poda de uniformización. Dentro de cada bloque se repitió cada tratamiento para realizar la cosecha a los 33, 43, 53 y 63 días después del trasplante (DDT) y una cosecha final a los 73 DDT. En el Cuadro 9 se puede observar el arreglo espacial de los tratamientos; las fechas que se indican en el cuadro corresponden a los tiempos de corte, para conocer concentración del esteviósido y el rebaudiosido A en los diferentes períodos del desarrollo vegetativo de la planta de stevia.

Cuadro 9. Arreglo espacial de los tratamientos en bloques al azar.

Bloque 1		Bloque 2		Bloque 3		Bloque 4	
T1	T1	T6	T6	T2	T2	T6	T6
T2	T2	T5	T5	T4	T4	T3	T3
T3	T3	T4	T4	T5	T5	T2	T2
T4	T4	T3	T3	T6	T6	T4	T4
T5	T5	T2	T2	T1	T1	T5	T5
T6	T6	T1	T1	T3	T3	T1	T1
30-Jun*	9-Ago	10-Jul	9-Ago	20-Jul	9-Ago	30-Jul	9-Ago

* Fechas de corte

5.7 Variables estudiadas

Todas las variables a excepción de la concentración de glucósidos que se determinaron en diferentes tiempos, se realizaron al término del ciclo comercial de la planta, los métodos empleados se describen a continuación:

5.7.1 Número de brotes basales y altura de planta

El conteo de brotes basales se realizó de manera manual antes de la cosecha a los 73 DDT. La altura de la planta se midió con una flexómetro desde la base del suelo.



Cuantificación de brotes basales



Altura de planta

Figura 6. Cuantificación de los brotes basales y altura de planta.

5.7.2 Peso fresco y seco

Las plantas fueron pesadas en peso fresco en una balanza electrónica con una precisión de centésimas de gramos (Ohaus pro SP402). Posteriormente se dejaron secar por 48 horas a temperatura ambiente y se pesaron nuevamente para calcular el peso seco de las hojas y de los tallos por separado.

5.7.3 Concentración nutrimental de hojas y tallos

Para los análisis vegetales se cuantificó nitrógeno por el método micro Kjeldahl (Bremmer, 1965). Para la determinación de fósforo, potasio calcio, magnesio y micronutrientes la digestión se realizó vía húmeda con $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ 4:1 (Westerman *et al.*, 1990) y la cuantificación de estos se realizó por absorción

atómica con excepción del fósforo que se determinó por colorimetría. Los resultados se muestran en el Anexo B.

5.7.4 Absorción y extracción de N, P y K por la planta de stevia

Con los datos obtenidos de la concentración nutrimental y del rendimiento del mejor tratamiento se determinó la absorción nutrimental en hojas, tallos y en la planta entera para los macronutrientes primarios.

5.7.5 Propiedades físicas de los sustratos en tratamientos

Los seis tratamientos (suelo + tezontle y abono orgánico) utilizados en el experimento fueron analizados en el Laboratorio de Física de Suelos del Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados. Se tomaron muestras de estos al iniciar y finalizar la investigación para determinar el mejor tratamiento para el crecimiento de las plantas y para conocer la variabilidad en sus propiedades. Se determinaron: densidad aparente (D_a), porosidad de aireación (P_a), porosidad total (P_t), capacidad de retención de humedad (C_{rt}) y agua fácilmente disponible (A_{fd}) con base en las técnicas de Ansorena (1994). Las curvas de liberación de agua se evaluaron por el método De Boodt *et al.*, (1974).

5.7.6 Modelo fenológico y eficiencia en la utilización del agua en stevia

Para el desarrollo del modelo fenológico, con un datta logger (HOBO U12) se tomaron datos diarios cada hora. A partir de la temperatura máxima y mínima, se obtuvo la temperatura media. Los grados días de desarrollo con la siguiente fórmula:

$$GDD = \frac{T_{MAX} + T_{MIN}}{2} - T_{Base}$$

Donde:

GDD: Grados días desarrollo.

Tmax: Temperatura máxima.

Tmin: Temperatura mínima.

Tbase: Temperatura base (15°C).

El riego se realizó de manera localizada con una aplicación diaria equivalente al agua evaporada el día anterior. Los datos de la fenología y el riego se muestran en los Anexos C y D.

5.7.7 Determinación de glucósidos en las hojas de stevia

Una de las finalidades de la química analítica es el uso de metodologías, rápidas, económicas y poco contaminantes, por lo que constantemente se reportan métodos analíticos que tienen como objetivo cumplir los puntos antes mencionados. La búsqueda de técnicas para la cuantificación de los glucósidos se realizó en SciFinder (<https://scifinder.cas.org>). A la fecha han sido publicadas diversas metodologías analíticas para determinar glucósidos en stevia, la más común es la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (Bergs *et al.*, 2012). En el Cuadro 10 se muestran los métodos de extracción de glucósidos reportados, estos difieren en la cantidad de muestra a utilizar, el volumen y el disolvente de extracción. Así la cantidad de muestra varía de 0.25 g a 5 g y el volumen del extractante de 10 mL hasta 50 mL. Las diferentes combinaciones dan relaciones de masa/volumen de; 1:10, 1:40 y 1:100. Como solventes de extracción se han empleado metanol, agua y acetonitrilo (ACN). Además de las variables anteriores, se reportan diferentes procedimientos para extraer los glucósidos de las hojas de stevia; sonicación (Tavarini y Angelini, 2013), extracciones a 60°C (Bergs *et al.*, 2012), 70°C (Kolb *et al.*, 2001) o 100°C (Woelwer–Rieck *et al.*, 2010) que combinan calentamiento y agitación.

Con la finalidad de cuidar el medio ambiente, la química verde promueve el uso de disolventes poco contaminantes, por lo que en este trabajo se seleccionó el H₂O como extractante para los glucósidos, como lo propone González *et al.*, 2013, Bergs *et al.*, 2012 y Woelwer–Rieck *et al.*, 2010. Si se parte del supuesto que la stevia contiene cantidades importantes de glucósidos, sería suficiente con pesar 0.25 g de muestra evitando el hacer diluciones, ya que ello contribuye a incrementar el error en la medición. Por lo que, en este trabajo se utilizó 0.25 g y

10 mL de agua grado HPLC, dando una relación de masa/volumen de 1:10 como lo proponen Bergs *et al.*, 2012 y González *et al.*, 2013 pero empleando menor cantidad de muestra, ya que estos autores utilizaron 2 g y 0.5 g de muestra, respectivamente.

Cuadro 10. Metodologías para la extracción de glucósidos.

Peso de muestra	Volumen del extractante	Solvente de extracción	Referencias	U
g	mL			na
0.50	50	Metanol	Argelini y Tavarini, 2013	vez
0.50	5	Agua	González <i>et al.</i> , 2013	real
5.00	50	Metanol	Afandi <i>et al.</i> , 2013	iza
2.00	20	Agua	Bergs <i>et al.</i> , 2012	da
1.00	10	Acetonitrilo	Jimenez <i>et al.</i> , 2010	la
0.25	10	Agua	Woelwer–Rieck <i>et al.</i> , 2010	extr

acción y dado que en el extracto de stevia además de los glucósidos se encuentran otros compuestos que coeluyen y que por una parte, podrían interferir con la cuantificación de los analitos de interés y que por otra, disminuyen la vida útil de la columna cromatográfica, los extractos se someten a un proceso de limpieza, denominado en inglés *Clean up*, mediante un cartucho de extracción en fase sólida (del inglés SPE, solid phase extraction).

En los métodos anteriormente descritos de limpieza difieren en los disolventes y sus mezclas y en las cantidades empleadas para eluir los glucósidos. Para la limpieza del extracto se utilizó el método propuesto por Bergs *et al.*, (2012) con una ligera modificación ya que se usó 3 mL de metanol en lugar de 2 mL debido a que se obtenía una mayor recuperación de rebaudiosido A.

Una vez realizada la limpieza de los extractos se procede a realizar el análisis de los glucósidos. En el Cuadro 11 se puede observar las condiciones de los métodos propuestos por HPLC para el análisis de los dos principales compuestos de la stevia. En el Cuadro se ilustra la variación en la composición de la fase

móvil, no así en el flujo (1 mL/min) ni en la longitud de onda (210 nm), aunque hay variación en las mezclas de ACN:H₂O: 80:20, 85:15 y 35:65 a pH a 2.75. Como se muestra también en el Cuadro se utilizaron columnas C18 y amino. En este trabajo se utilizó una columna amino y como fase móvil se eligió ACN:H₂O 80:20, ya que utilizar una relación 85:15 implicaba mayor costo. Es de hacer notar que al emplear una fase móvil a la que se debe ajustar el pH implica controlarlo, de lo contrario, el tiempo de retención de los analitos se desplaza. Es importante resaltar que únicamente Bergs *et al.*, (2012) reportan datos para el límite de detección (0.0004 mg L⁻¹) y para el límite de cuantificación (0.0038 mg L⁻¹).

Las curvas de calibración se prepararon tomando como base lo publicado. Así Bergs *et al.*, 2012 reportan de 10 mg L⁻¹ a 4800 mg L⁻¹. Con las pruebas preliminares realizadas en este trabajo se prepararon curvas de 31 µg g⁻¹ a 134 µg g⁻¹ para el esteviósido y de 22 µg g⁻¹ a 81 µg g⁻¹ para el rebaudiosido A. El anexo E muestra las curvas de calibración tanto para el esteviósido como para el rebaudiosido A. Los patrones primarios de glucósidos se prepararon en H₂O y a partir de estos cada punto de la curva de calibración que se disolvió en ACN:H₂O (80:20). El acetonitrilo (ACN) y el metanol utilizados en esta investigación fueron grado HPLC adquiridos a J.T. Baker. Se empleó H₂O Milli-Q® (Simplicity UV). La concentración de los glucósidos se determinó mediante factores de respuesta preparando un estándar de la curva de calibración cuya área era cercana al área de la muestra a cuantificar.

De los nueve glucósidos reportados los más importantes son el esteviósido y rebaudiosido A. En esta investigación estos se cuantificaron en todos los tratamientos (6 x 4 repeticiones) y en las diferentes épocas de corte (5 épocas).

La determinación de los glucósidos consta de: a) preparación de la muestra, b) extracción de los glucósidos, c) limpieza del extracto y d) cuantificación por HPLC. A continuación se indican cada uno de ellos

Cuadro 11. Determinación de glucósidos por HPLC.

Fase móvil	Columna	Curva de calibración	Recuperación	Referencias
			(%)	
H ₂ O a pH 2.75 y ACN (65:35)	Purospher STAR RP-18 (250 x 4.6mm)	0.01- 4.8 mg mL ⁻¹ para (Est ¹ y Reb A ²)	100.99	Bergs <i>et al.</i> , 2012a
ACN:H ₂ O (80:20)	Super Compact G.20212 (300 x 16mm)	0.01-4.8 mg mL ⁻¹	-	Bergs <i>et al.</i> , 2012b
ACN:H ₂ O (85:15)	Luna NH2 100 (250 x 4.6mm)	250 ug mL ⁻¹ (Est.) 10-800 ug mL ⁻¹ (Reb A)	99 (Est.) 100 (Reb A)	Woelwer-Rieck <i>et al.</i> , 2010
ACN:H ₂ O (80:20)	Chemcosorb 5NH2 (150 x 4.6mm)	-	-	Jiménez <i>et al.</i> , 2010

¹ Estevióside. ² Rebaudiosido A.

a) Preparación de la muestra

Una vez realizados las mediciones para determinar el rendimiento de cada tratamiento, las hojas de stevia se separaron de los tallos y se secaron a temperatura ambiente. Posteriormente se molieron con un mortero y se tamizaron. Cabe resaltar que los artículos consultados no indican el tamiz ni el tamaño de partícula que se utilizó. En esta investigación el material se molió y se eliminó la nervadura antes de pasarlo por un tamiz n° 70 (0.21mm), lo anterior con la finalidad de que las partículas tengan una mayor superficie de contacto con el extractante y en consecuencia se obtenga una mayor extracción de glucósidos. Es de hacer notar que sería deseable el realizar la extracción de los glucósidos tamizando la muestra en mallas diferentes, con la finalidad de determinar el efecto del tamaño de partícula en la extracción de los glucósidos, pero por el tiempo no se realizó ese ensayo.

b) Extracción de los glucósidos

Como ya se comentó, existen diferentes métodos para extraer los glucósidos; los procedimientos que utilizan agitación no mencionan la velocidad de agitación. Por lo que un primer ensayo consistió en determinar el tiempo de agitación con un agitador de acción recíproca. Para ello, se pesaron 0.25 g de muestra en tubos de polipropileno de 50 mL con tapa de rosca y se adicionaron 10 mL de H₂O grado HPLC. Se probaron diferentes tiempos de agitación: 30, 60, 90 y 120 minutos, estos ensayos se realizaron a 220 rpm (revoluciones por minuto) en un agitador de acción recíproca Eberbach.

Un segundo ensayo consistió en la extracción de los glucósidos mediante temperatura y agitación; para lo cual se pesó 0.25 g de muestra en un tubo de vidrio al que se le adicionó 10 mL de agua y se calentó en un block digester a 100°C por 30 minutos. Se dejó enfriar y se trasvasó a un tubo de polipropileno y se agitó a 220 rpm por 90 minutos. Debido a que los resultados mostraron que con 90 minutos de agitación a 220 rpm sin elevar la temperatura se obtuvo una mayor área de pico tanto en el esteviósido y como en el rebaudiosido A, se utilizó como

técnica de extracción en esta investigación agitación a 220 rpm a temperatura ambiente por 90 min.

Una vez realizado el proceso de extracción de los glucósidos, los extractos se filtraron en papel filtro (AHLSTROM n° 631), el filtrado se colectó en frascos de plástico y el extracto se conservó a 4°C por un máximo de 24 horas, ya que después de este tiempo el extracto se tornaba turbio, seguramente por efecto por los microorganismos presentes. El siguiente paso fue la limpieza del extracto en un cartucho de extracción en fase sólida.

c) Limpieza del extracto de stevia

Para la extracción en fase sólida se utilizaron cartuchos (Hypersep C18 de 200 mg/3mL). La limpieza del extracto se realizó por la metodología descrita por Bergs *et al.*, (2012) con una pequeña modificación en el volumen del eluyente. Primero se acondicionó el cartucho, para ello se agregó 3 mL de metanol y una vez que este eluyó y sin que se secase el cartucho se adicionaron 3 mL de H₂O. Posteriormente y mediante una pipeta volumétrica se agregó 0.5 mL del extracto de hojas de stevia. Los compuestos coextraídos con los glucósidos se eliminaron mediante la limpieza del cartucho, esta se realizó con 3 mL de agua y con 5 mL de ACN:H₂O (20:80). El cartucho se dejó secar por tres minutos y la elución de los glucósidos se realizó con 3 mL de metanol. El eluato se colectó en un matraz aforado de 10 mL clase A y se aforo con el mismo disolvente. En HPLC todas las muestras a analizar se deben filtrar antes de ser inyectadas, para ello se utilizaron acrodiscos GHP de 13 mm y de 0.45 µm. El filtrado se recibió directamente en el vial de 1.5 mL, este se tapó con tapa pre-slit, posteriormente se colocó en el inyector automático del cromatógrafo.

d) Cuantificación de glucósidos por HPLC

El análisis del esteviósido y del rebaudiosido A se realizó en un cromatógrafo WATERS 2956 con un detector dual UV 2487. Se empleó una columna Pinnacle II Amino (150 x 4.6 mm, 5 µm) y la precolumna correspondiente. Como fase móvil se utilizó ACN:H₂O (80:20) a un flujo de 1ml/min. Los disolventes fueron filtrados

empleando filtros GHP de 47 mm y 0.45 μm y degasificados en sonicador por 15 min. La temperatura del horno se mantuvo a $30 \pm 1^\circ\text{C}$. El volumen de inyección fue de 10 μL . Para obtener datos confiables, tanto estándares como muestras se inyectaron tres o cuatro veces, dependiendo el coeficiente de variación de las áreas. En ninguna muestra el CV fue mayor al 1.8 %.

Preparación de estándares

El esteviósido (98%) y el rebaudiosido A (96%) se adquirieron con Sigma-Aldrich. La preparación de los estándares se realizó por peso. Antes de pesar los estándares se verificó con un marco de pesas que la balanza analítica estuviera calibrada. En el anexo F se muestran los resultados obtenidos. Se preparó una solución de 568 $\mu\text{g g}^{-1}$ de rebaudiosido A y de 307 $\mu\text{g g}^{-1}$ de esteviósido, ambos estándares disueltos en agua grado HPLC. A partir de estas soluciones se prepararon las siguientes concentraciones: para el esteviósido de 31 $\mu\text{g g}^{-1}$ a 134 $\mu\text{g g}^{-1}$ y para el rebaudiosido A de 22 $\mu\text{g g}^{-1}$ a 80 $\mu\text{g g}^{-1}$, cada punto de la curva de calibración fue disuelto en ACN:H₂O (80:20).

La cuantificación diaria de los glucósidos se determinó mediante factores de respuesta. Con base en el área de las muestras analizadas se preparaba un estándar que tuviera un área cercana al área de la muestra, tomando como base los datos previos de las curvas de calibración. Para la concentración además de los factores de respuesta se consideró la cantidad de muestra que se pesó, el volumen de extracción, la alícuota del extracto y el aforo de elución de los analitos.

Evaluación de la recuperación del rebaudiosido A

Como parte del control de calidad en la determinación de los glucósidos se utilizó al rebaudiosido A para determinar la recuperación. Para ello, a partir de una solución de 568 $\mu\text{g g}^{-1}$ se tomaron dos alícuotas de 1 mL, una se pasó por un cartucho de extracción C18 siguiendo el procedimiento descrito en el inciso C. La otra alícuota se colocó en un matraz de 10 mL y se aforo con metanol. Teóricamente en ambos casos se tendría una concentración de 56.8 $\mu\text{g g}^{-1}$ de

rebaudiosido A, ambos fueron inyectados por triplicado y se calculó la recuperación con la siguiente fórmula.

$$\text{Recuperación} = \frac{AE_{SFE}}{A_{STD}} 100$$

Donde:

AE_{SFE} : Área estándar eluido por cartucho C18 (SFE, solid phase extraction).

A_{STD} : Área de estándar.

5.8 Control de Calidad en las mediciones analíticas

Como parte del control de calidad de los análisis realizados se incluyeron paralelamente en los análisis materiales de referencia: dos materiales de control de calidad de los Programas de Intercomparación de México (ISP-23, ISP-24), de Holanda (IPE-2002 e IPE-2003) y un material de referencia certificado de hojas de espinaca SRM1515a procedente de Instituto Nacional de Metrología de Estados Unidos (NIST del inglés, National Institute of Standards and Technology).

5.9 Análisis estadístico

A las variables agronómicas: altura de planta, brotes basales, peso seco y fresco, se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) y clasificación de medias mediante la comparación de Tukey ($P \geq 0.05$) utilizando el programa Statistical Analysis System software, versión 9.2 (SAS Institute Inc., 2007).

Para el análisis de glucósidos se utilizó el modelo lineal y cuadrática para saber la tendencia general de los resultados y conocer el efecto de los tratamientos de nitrógeno de los abonos orgánicos en las variables evaluadas.

VI. Resultados y Discusión

6.1 Variables Agronómicas

En el Cuadro 12 se muestra el efecto de los tratamientos sobre altura de planta, brotes basales y biomasa (peso fresco y peso seco), se encontró diferencias significativas ($P \geq 0.05$) en las dos últimas variables. Las plantas alcanzaron un promedio de 39–45 cm de altura. La cosecha se realizó al comienzo de la emisión de flores, a los 73 días después del trasplante (DDT), con base en las recomendaciones agronómicas de Álvarez y Casaccia, 2008 y Carneiro, 2007.

Cuadro 12. Efecto de la gallinaza y lombricompost en la altura de planta, brotes basales, peso fresco y peso seco.

Tratamientos	g/N ¹	Variables			
		Altura	Brotes basales	Peso fresco	Peso seco
		cm		g/planta	
Gallinaza	1	39a	4.0c	175c	58c
Gallinaza	2	44a	7.0bc	203ba	68b
Gallinaza	4	37a	3.2c	148c	48c
Lombricompost	1	45a	5.5bc	200ba	67b
Lombricompost	2	41a	8.5ab	208a	70ba
Lombricompost	4	42a	9.2a	212a	74a

Valores entre columnas seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo a la separación de medias Tukey ($P \geq 0.05$). ¹ g maceta⁻¹ de nitrógeno.

Es importante señalar que la var. Eirete está constituida por el genotipo de la criolla y presenta un porte bajo llegando a alcanzar una altura máxima de 60 cm en primavera–verano y en otoño–invierno no sobrepasa los 30 cm debido a la disminución del fotoperiodo (Casacia y Álvarez, 2008).

Otras investigaciones indican que la planta puede llegar a medir 120 cm en un año de cultivo, pero esto solamente se observa en los trabajos para el mejoramiento genético o producción de semillas. Sin embargo, cuando el interés es la producción de hojas se realizan tres a cuatro cortes por año para obtener la

mayor cantidad de biomasa (Carneiro *et al.*, 1997; Mordechai *et al.*, 2013; Tavarini y Angelini, 2014).

El mayor número de brotes basales se registró en la dosis alta de lombricompost (T6) correspondiente a la aplicación de 4 g nitrógeno/planta, en este tratamiento se emitieron en promedio 9 brotes basales. Cabe resaltar que, esta etapa es la más importante para este cultivo, debido a que cualquier estrés (biótico o abiótico) conduce a un menor número de brotes. En contraste, el tratamiento con dosis alta de gallinaza (4 g nitrógeno/planta) se obtuvo un efecto negativo por presentar una menor cantidad de brotes, en promedio 3 brotes, aspecto explicado por la alta liberación de los nutrientes debido a una mineralización del 90% (Martínez, 1977; Labrador, 2001). Como se sabe, en dosis altas la gallinaza puede ser perjudicial a muchos cultivos, y la stevia no es la excepción, más aún en etapas tempranas del crecimiento vegetal, en cambio la lombricompost con un 45% de mineralización tiende a una liberación más lenta de los nutrientes.

Vázquez *et al.*, (2014) observaron aumento en el número de brotes basales cuando la reproducción de la stevia se realizó *in vitro*, pero al trasplantar al medio de crecimiento final y después de la poda de uniformización los resultados son similares a los obtenidos en esta investigación de entre 4 a 13 brotes por planta. Por lo que para aumentar los brotes basales el manejo agronómico como: limpieza, poda, fertilización y cosecha son fundamentales. Lo anterior influirá en la productividad de esta planta durante los diferentes cortes anuales; como se sabe la productividad de la stevia es de tres años. Por lo anterior, se recomienda realizar la cosecha a 5 cm del suelo o del sustrato de esta manera se disminuye la mortandad de las plantas. Por otra parte, a la entrada del otoño con la disminución de la temperatura y el fotoperiodo se debería dejar un brote para no perjudicar a la stevia durante el invierno.

Ferrera *et al.*, 1997 y Atiyet *et al.*, 1999 han reportado el efecto de la lombricompost en el rendimiento de los cultivos, observaron el aumento en la adsorción nutrimental y el peso seco, sin embargo consideran que no puede ser

utilizado como sustituto de un fertilizante químico, principalmente por su alto costo y la combinación de ambos (químicos y orgánicos) podría ser una de las mejores alternativas para su utilización.

El efecto de diferentes abonos orgánicos también ha sido estudiado en tomate (*Solanum lycopersicum*) y los resultados indican que con la lombricompost se obtuvo mejor rendimiento en calidad y cantidad de frutos en comparación con estiércol de aves, bovino y compost, aunque no indican el tipo de compost (Corrales *et al.*, 2000; Estrada *et al.*, 2005).

Al ajustar los datos del rendimiento en peso seco de las hojas de stevia a una regresión (Figura 5) se puede observar la tendencia de la fertilización de la cantidad de nitrógeno como gallinaza y lombricompost, en donde los resultados corroboran las afirmaciones realizadas por Carneiro *et al.*, (1989) y por Salgado *et al.*, (2013). En ellas el peso seco es un reflejo del número de brotes basales en la planta de stevia, por lo tanto, el T6 que corresponde a la dosis alta de lombricompost (9 brotes basales por planta) es superior a los demás tratamientos con un rendimiento de hojas secas de 19 g planta⁻¹.

En la Figura 7 se puede observar que el abono que mejores condiciones ofrece para el caso de la stevia es la lombricompost. En cuanto a las investigaciones realizadas con gallinaza, Cuervo *et al.*, (2010) evaluaron este abono en diferentes dosis y observaron que ocasiona un desbalance nutricional principalmente en nitrógeno al observar un menor rendimiento en los frutos de chile güero (*Capsicum annuum* L.).

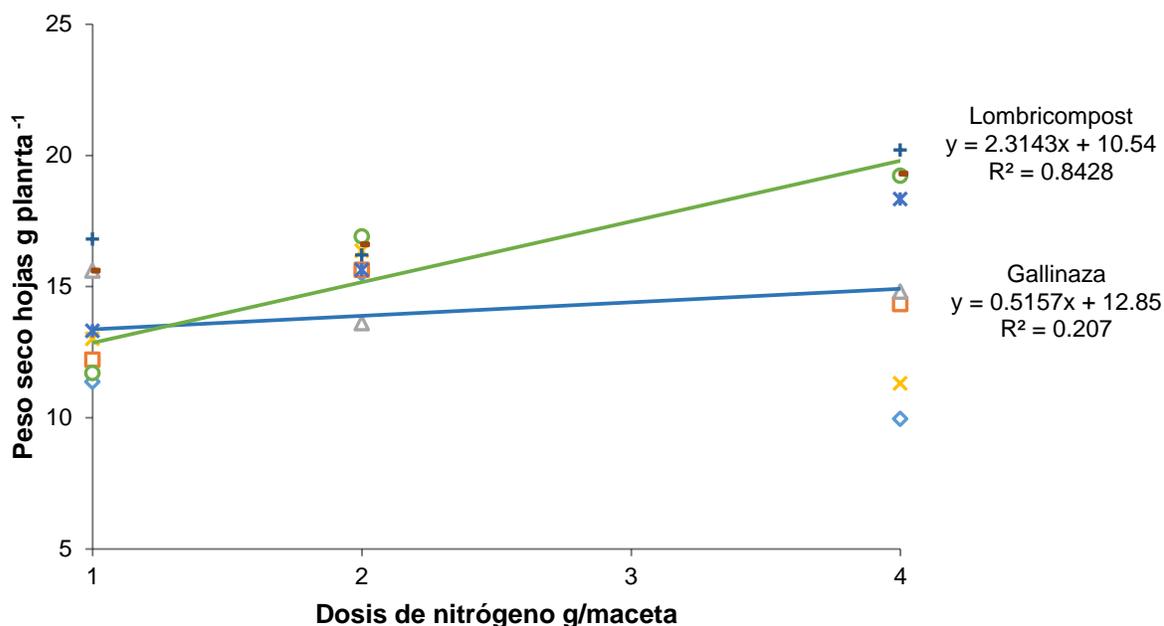


Figura 7. Peso seco de hojas en dosis crecientes de nitrógeno como gallinaza y lombricompost.

6.2 Concentración nutrimental al final del ciclo de cultivo de la stevia

En la Figura 8 se observa el efecto de los tratamientos y las concentraciones en macronutrientes en las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni var Eirete. El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($P \geq 0.05$) en estos. Se puede observar que en gallinaza la concentración de nitrógeno en las hojas (2.81%) en el T3 (4 g planta⁻¹) fue superior estadísticamente, en comparación a las demás concentraciones (2.15% a 2.30%).

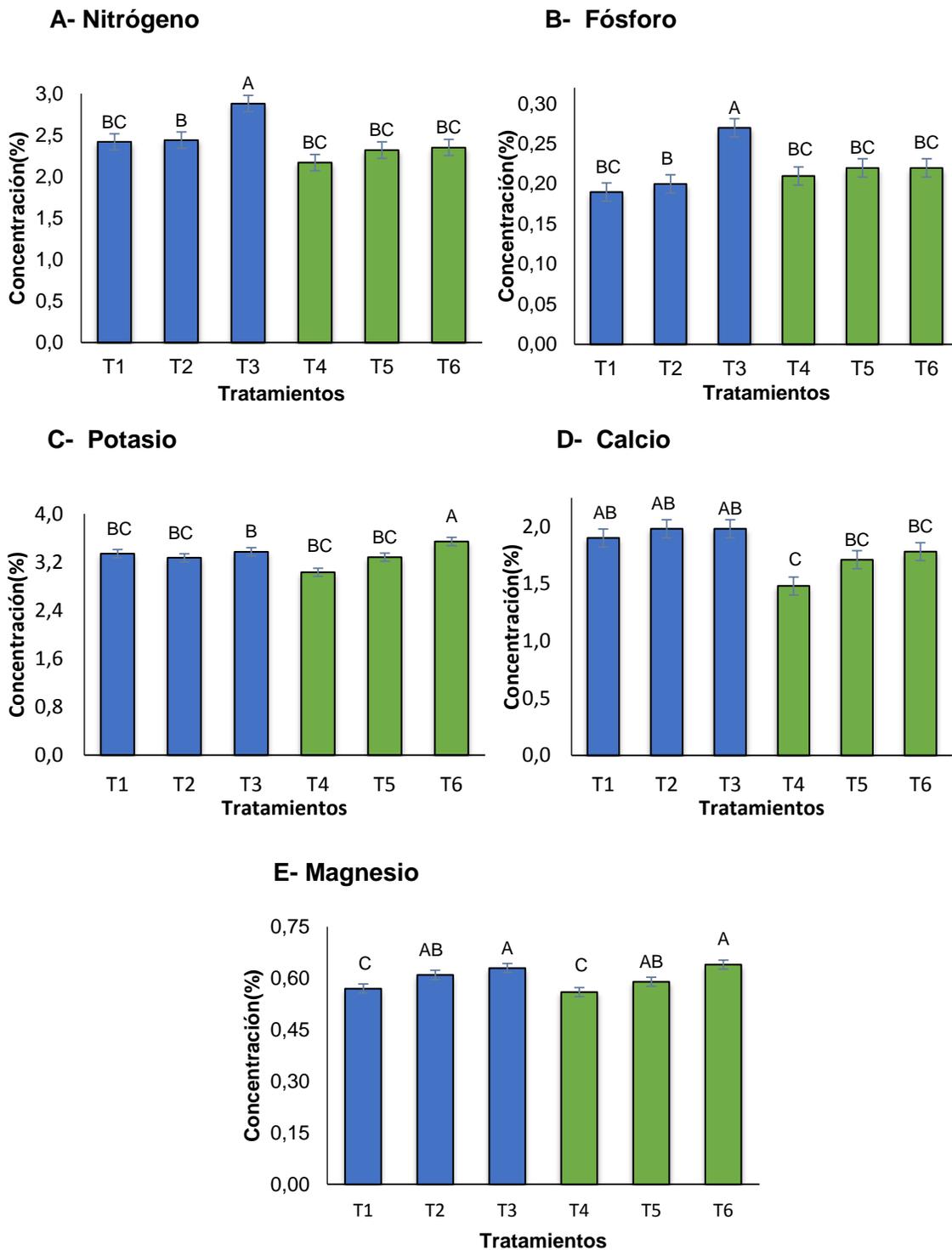


Figura 8. Concentración de macronutrientes en hojas de stevia T1, T2, T3: 1, 2, 4 g N⁻¹ (gallinaza); T4, T5, T6: 1, 2, 4 g N⁻¹ (lombricompost).

Los intervalos adecuados para la stevia en nitrógeno sugeridas por Salgado *et al.*, (2013) y Tavarini y Angelini (2014) es de 2.11% a 2.30% este valor fue determinado en hojas y es considerado el óptimo para esta planta. Los valores de la mayoría de los tratamientos de este trabajo se encuentran dentro de lo requerido a excepción del T3 (2.81%) que es una concentración alta e inadecuada para la stevia afectando sus desarrollos metabólicos y llevando a un menor rendimiento.

De Lima y Malavolta (1997) indican que deficiencias de nitrógeno en la stevia disminuye el tamaño de las células, aumentan el grosor de las paredes reduciendo la división celular y en consecuencia el tamaño de todas las partes morfológicas de la planta, Utumi *et al.*, (1999) encontraron que las deficiencias influyen en una inhibición en el crecimiento de las yemas axilares de la stevia.

En cuanto a fósforo, el tratamiento T3 gallinaza (4 g/planta) es superior a los demás tratamientos, normalmente en fósforo no se han observado síntomas visuales de concentraciones tóxicas en la mayoría de las plantas superiores. En la stevia el fósforo es parte esencial de muchos glucofosfatos como la uridin difosfato glucosa, molécula donadora de glucosa en la síntesis de los diterpenos glucósidos (Shibata *et al.*, 1995) y entre otros, participa en la fotosíntesis, respiración y otros procesos metabólicos como la transferencia de la información genética. Das *et al.*, (1992) realizaron investigaciones con bacterias solubilizadoras de fósforo y observaron un efecto positivo en el incremento de la biomasa en plantas de stevia.

Respecto al potasio el tratamiento T6 lombricompost 4 g/planta fue superior a los demás tratamientos con una concentración de 3.54%. El K⁺ es un activador de muchas enzimas esenciales para la fotosíntesis, respiración etc. Así como uno de los contribuyentes del potencial osmótico de las células y por lo tanto puede afectar la presión y la turgencia de la hoja. La deficiencia de K⁺ ocasiona desbalances metabólicos, como la acumulación de compuestos nitrogenados.

De Lima y Malavolta (1997) encontraron que deficiencias de K^+ en la *Stevia rebaudiana* Bertoni ocasionan una menor cantidad de brotes basales y axilares por una menor proporción de los fotoasimilados y es probable que esté además relacionado con procesos de producción de ATP (fosforilación).

El calcio es esencial para las funciones estructurales en la membrana citoplasmática de las células y le da estabilidad a la pared celular. Deficiencias de Ca^{2+} provocan un menor desarrollo radical, además la mayor parte del calcio se almacena en las vacuolas y suele precipitarse en forma de cristales insolubles de oxalato. Una parte del calcio en el citosol se une a la proteína calmodulina, esta función modifica su estructura pasando a ser activador de varias enzimas. También tiene una función de segundo mensajero y en respuestas de señales ambientales y hormonales (White y Broadlet, 2003). En stevia deficiencias de Ca^{2+} pueden ocasionar necrosis apical en brotes basales y muerte descendiente y menor contenido de esteviósido (Utumi *et al.*, 1999).

En magnesio en la investigación presentó diferencias significativas entre los tratamientos, se puede ver que a medida que aumentaron las dosis de los abonos (gallinaza y lombricompost), se incrementaron las concentraciones de Mg^{2+} en las hojas. La presencia del Mg^{2+} en la molécula de clorofila es esencial ya que se combina con la molécula de ATP lo que permite que participe en varias reacciones como la fosforilación para la formación de IPP, primer compuesto isoprenoide en la síntesis de los glucósidos de la stevia. Además el Mg^{2+} activa enzimas necesarias en el proceso de la fotosíntesis, la respiración y la formación de DNA y RNA (Taiz y Zriger, 2006).

En lo que corresponde a los micronutrientes no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, sin embargo llama la atención la alta concentración de manganeso en las hojas de stevia. Para corroborar se repitieron los análisis obteniéndose valores cercanos, en promedio entre ellos, 336 mg kg^{-1} . Según Salisbury y Ross, (2000) la concentración en la mayoría de las

plantas superiores del Mn^{2+} es de 50 mg kg^{-1} , y el resultado obtenido en la investigación podría estar asociado a que el Mn^{2+} actúa como cofactor de la enzima prenil transferasas, geranil pirofosfato sintasa, responsable del alargamiento de la cadena terpénica dentro de la ruta de síntesis de los glucósidos de la stevia (Marschener, 2002; Epstein y Bloom, 2005).

El Cuadro 13 ilustra la concentración nutrimental de macronutrientes y micronutrientes de hojas de stevia obtenidos en esta investigación y la comparación con otros autores. Los resultados reportados corresponden al análisis de las hojas del mejor tratamiento en cuanto a la producción de biomasa (T6 lombricompost alta). Se puede observar que la concentración nutrimental de las hojas se encuentran dentro del intervalo reportado por otros autores, solamente el manganeso se encuentra 8 veces más respecto a la revisión de literatura (Tavarini y Angelini, 2014; Atteh *et al.*, 2011; Lena *et al.*, 2010; Utumi *et al.*, 1998).

Cuadro 13. Concentración nutrimental de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni y su comparación con otros autores.

Elemento		Referencias				
		Datos (2015)	Tavarini y Angelini (2014)	Atteh <i>et al.</i> , (2011)	Lena (2010)	Utumi <i>et al.</i> , (1998)
Nitrógeno	%	2.14	2.18	-	2.15	2.56
Fósforo		0.22	0.20	0.26	0.34	0.74
Potasio		3.39	2.25	1.73	3.45	4.36
Calcio		1.76	-	0.82	0.61	0.52
Magnesio		0.64	-	0.24	0.50	0.26
Hierro	$\mu\text{g g}^{-1}$	177	-	366	702	-
Cobre		51	-	6	17	-
Zinc		38	-	20	-	-
Manganeso		336	-	30	68	-

Datos (2015) corresponden a los resultados de esta investigación.

En cuanto al análisis nutrimental del tallo la concentración de nitrógeno, fósforo y potasio se hallan dentro del intervalo reportado por Tavarini y Angelini (2014). Sin embargo, los resultados obtenidos por Atteh *et al.*, (2011) se encuentran por debajo principalmente en potasio. La alta concentración de potasio en los tallos tendría que ser objeto de estudio en investigaciones futuras como sustrato o fuente de fertilización.

Cuadro 14. Concentración nutrimental de los tallos de *Stevia rebaudiana* Bertoni y su comparación con otros autores.

Elemento		Referencias		
		Datos (2015)	Tavarini y Angelini (2014)	Atteh <i>et al.</i> , (2011)
Nitrógeno	%	1.44	0.88	-
Fósforo		0.15	0.17	0.12
Potasio		3.23	3.19	1.85

Datos (2015) corresponden a los resultados de esta investigación

6.3 Concentración nutrimental durante el ciclo de cultivo

En la Figura 9 se ilustra la concentración nutrimental durante el ciclo de desarrollo de la *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Eirete. En el tratamiento T6, dosis alta de lombricompost, se obtuvieron los mejores rendimientos en la producción de biomasa. La concentración máxima de nitrógeno fue de 3.60% a los 33 DDT y al transcurrir el ciclo de cultivo se estabilizó a los 63 días en 2.14%. En esta etapa cercana a la floración se detiene el crecimiento vegetativo y la planta comienza a redirigir los fotoasimilados para la siguiente etapa fenológica. Comportamientos similares se observan con fósforo y potasio. En estos nutrientes la mayor concentración se observa en las primeras etapas de crecimiento vegetal.

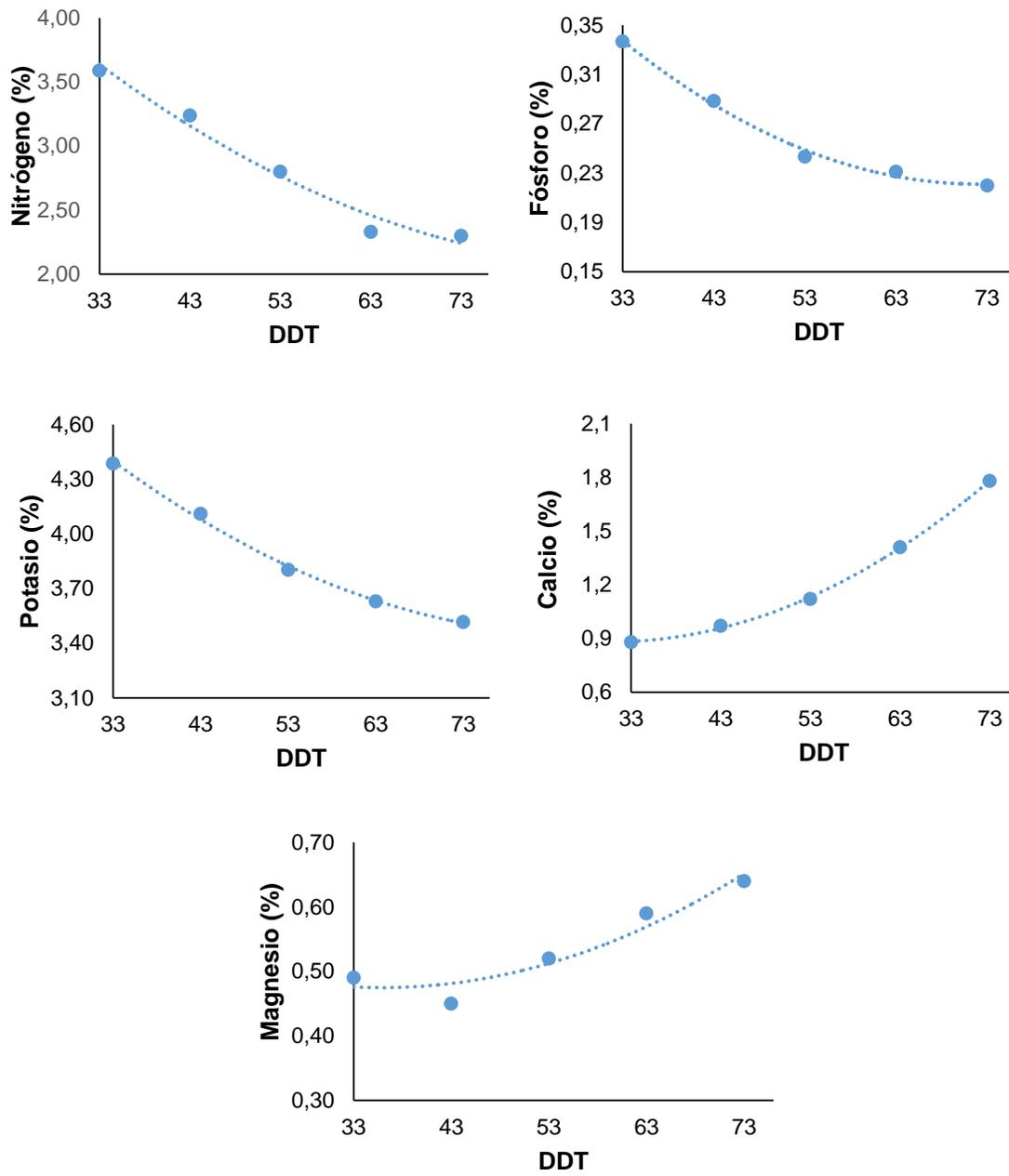


Figura 9. Concentración nutrimental en diferentes cortes de la *Stevia rebaudiana* Bertoni.

La mayor acumulación de calcio se observó al momento de la cosecha, este nutrimento se acumula en las paredes celulares de la planta y su concentración al inicio del crecimiento es bajo y aumenta conforme avanza el ciclo del cultivo. El Ca^{2+} ha atraído interés por su función como segundo mensajero en la conducción de señales, entre el ambiente y la respuesta de la planta en términos de crecimiento y desarrollo, en esta función el Ca^{++} se une a la calmodulina proteína localizada en el citosol de las células vegetales (Hanson, 1984).

6.4 Absorción nutrimental en stevia

La nutrición de los cultivos requiere el conocimiento de la absorción y extracción de nutrimentos en el órgano cosechable para llevar a cabo un buen manejo del cultivo y obtener un rendimiento deseado. Es importante mencionar la diferencia entre absorción y extracción, en términos agronómicos, por la primera se entiende por la cantidad de nutrimentos que requiere la planta durante su ciclo de desarrollo hasta el momento de la cosecha, otros autores lo describen como requerimiento interno (Etchevers, 1999), pero la segunda es la cantidad de nutrimento que se acumula en el producto de interés económico u órgano cosechable como por ejemplo; granos, frutos y hojas. La diferencia entre estos términos es con la finalidad de realizar una adecuada fertilización, sin exceder la dosis para aplicar lo que requiere el cultivo. En este trabajo se tomó en cuenta la eficiencia del uso del fertilizante para determinar la adecuada fertilización.

La absorción de los nutrimentos es la relación entre la concentración nutrimental y el peso seco por órgano vegetal en los estados fenológicos, y esta depende de la variedad, las condiciones físicas y químicas del suelo, sustrato o medio de crecimiento. Con los datos del rendimiento de la planta de stevia, de los tallos y las hojas se calculó la absorción de N, P y K mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Absorción} = \frac{\text{Órgano vegetal (g)} * \text{Concentración nutrimental (\%)}}{100}$$

Por las razones descritas anteriormente se ha separado la absorción y la extracción de nutrimentos. Debido que en esta planta el producto de interés económico son las hojas, los tallos no son utilizados debido a la baja concentración de glucósidos, pero podrían ser utilizados como cobertura y así devolver al suelo los nutrimentos presentes en sus tejidos, contribuyendo también a mejorar las propiedades físicas y biológicas de los suelos.

Los resultados de la absorción nutrimental se ilustran en el Cuadro 15, estos se calcularon con los datos del mejor tratamiento (T6) lombricompost 4 g de nitrógeno planta⁻¹. El cálculo se realizó por órgano vegetal considerando la producción de biomasa y la concentración nutrimental a los 73 días después del trasplante en forma separada a manera de obtener datos más objetivos:

Cuadro 15. Absorción nutrimental de la *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Eirete a los 73 DDT.

Órgano vegetal	Nitrógeno	Fósforo	Potasio
	g planta ⁻¹		
Hojas	0.47	0.04	0.78
Tallos	0.63	0.08	1.78
Planta entera	1.22	0.14	2.91

En el Cuadro 16 se muestra la extracción de N, P y K de la *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Eirete en hojas para producir una tonelada de biomasa seca total y su comparación con otras investigaciones. Se observa que la mayor variación se da en potasio comparados principalmente con los resultados obtenidos con Jarma *et al.*, (2010). El cálculo de la extracción nutrimental se realizó con base a un rendimiento de una tonelada para poder comparar con los demás autores.

Dado que en la stevia el producto de interés económico son las hojas por la concentración de glucósidos, en el tallo la cantidad presente es relativamente baja por lo que no es considerado en la cosecha.

Cuadro 16. Extracción de N, P y K por tonelada de biomasa total de hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Eirete.

Autores-país	Nitrógeno	kg t ⁻¹	
		Fósforo	Potasio
De Lima <i>et al.</i> , 1997 (Brasil)	19	2.7	17
Jarma <i>et al.</i> , 2010 (Colombia)	21	2.8	10
Tavarini y Angelini, 2014 (Italia)	16	1.9	28
Investigación 2015 (México)	21	2.2	40

6.5 Fenología de la stevia

Los modelos de simulación en la agricultura son ampliamente utilizados como herramientas para la toma de decisiones en manejo de los cultivos. La duración del período térmico del cultivo de la stevia calculado en función de la temperatura máxima y la mínima, es decir sus grados días desarrollo, se realizó mediante las temperaturas diarias monitoreadas cada hora para conocer la interacción del ambiente con el rendimiento (Brisson *et al.*, 2003).

En la Figura 10 se observa la variación de la temperatura media para el cálculo de los grados días desarrollo. La temperatura base para la stevia es de 15°C (Álvarez y Casaccia, 2008), momento en el cual acelera sus procesos de absorción, transporte y asimilación de los nutrientes para llegar a su óptimo desarrollo y alcanzar altos rendimientos.

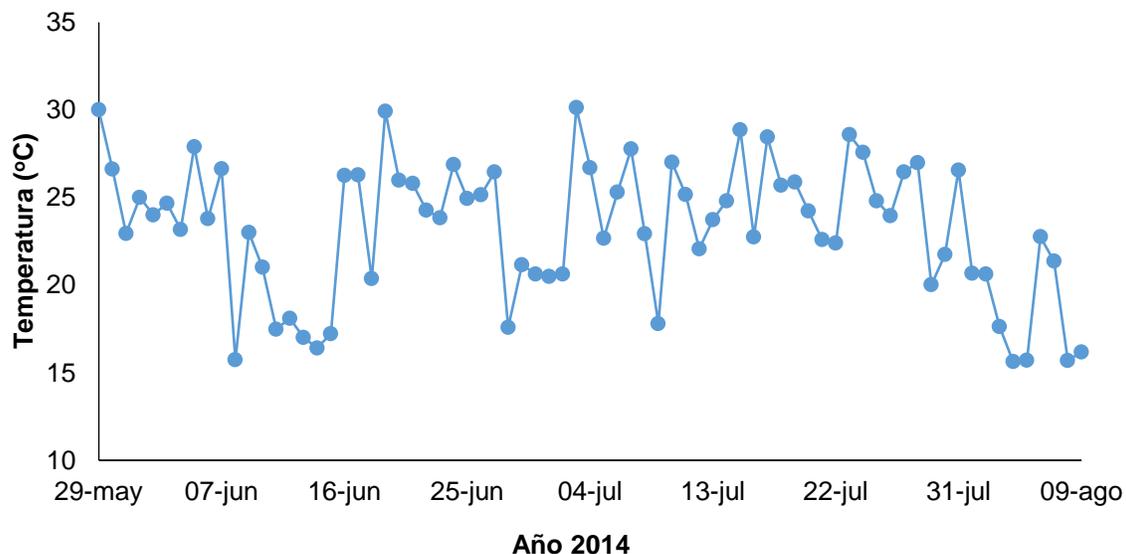


Figura 10. Temperatura media durante el ciclo fenológico de la stevia.

En el Cuadro 17 se ilustran las etapas del desarrollo de la planta, la duración en días y la energía requerida para completar la etapa fenológica (GDD). Los resultados obtenidos en días coinciden con lo publicado por Carneiro *et al.*, (1989) en Maringa, Brasil y con Bonilla *et al.*, (2007) en Valle del Cauca, Colombia. La importancia en la determinación de los grados días desarrollo es que permite tomar decisiones en diferentes condiciones ambientales, ya que al conocer la cantidad de energía requerida por la stevia, para completar su desarrollo fenológico, se pueden realizar prácticas agronómicas y planes de manejo en los cultivos independientemente del lugar donde se cultive la planta, con la finalidad de alcanzar mejores rendimientos Hajek *et al.*, (1976).

Cuadro 17. Estados fenológicos de la *Stevia rebaudiana Bertoni* var. Eirete.

Estado de desarrollo	Lamina de riego	Duración	GDD ¹
	cm	Días	°C
Emergencia	1.5	7	0
Emergencia - brotación	2.1	10	71
Brotación – Dv ²	6.2	56	128
Dv - cosecha	13.8	73	604

¹Grados días desarrollo. ²Desarrollo vegetativo

En la Figura 11 se puede observar el desarrollo fenológico del cultivo de la *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Eirete en sus diferentes etapas desde la emergencia hasta llegar a la cosecha utilizando la función inversa. Se muestra que el período con mayor desarrollo es el vegetativo, además la cosecha se realiza al comienzo de la aparición de los botones florales para evitar la disminución de los glucósidos en las hojas.

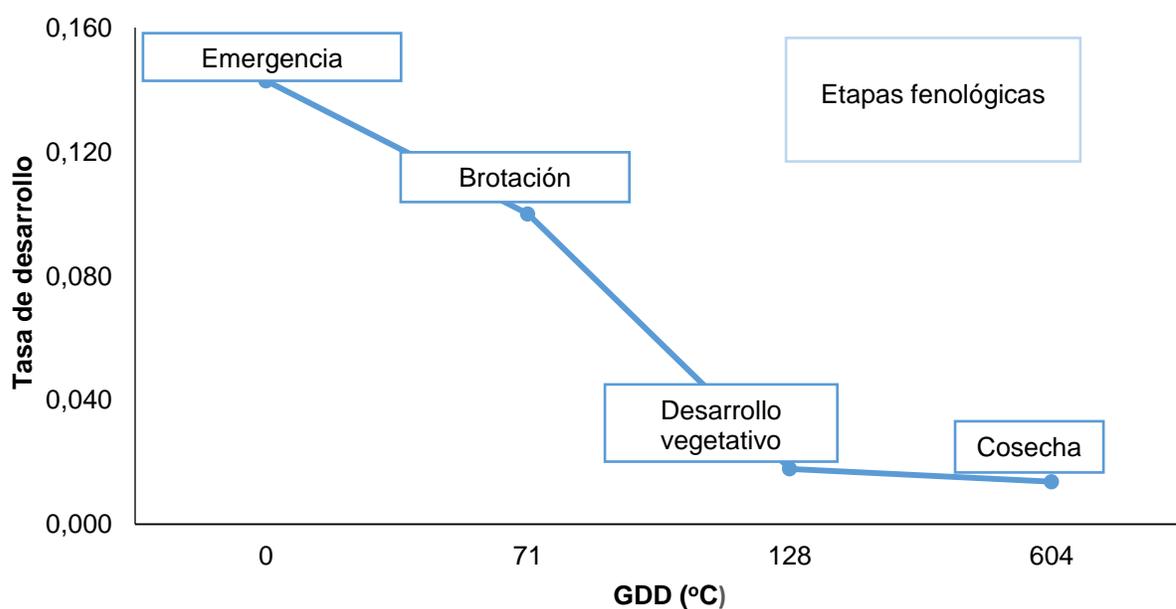


Figura 11. Fenología de la *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Eirete.

6.6 Uso del agua en stevia

La eficiencia del agua en la agricultura tiende a ser uno de los más grandes desafíos en la mayoría de los países del mundo (Rijsberman *et al.*, 2006). Este recurso es vital para el desarrollo de todos procesos físicos, químicos y biológicos en el suelo y en la planta.

Hoy en día la producción de alimentos tiene como objetivo integrar todos los componentes del agroecosistema, en especial hacer un uso eficiente del agua, aumentar los rendimientos de los cultivos sin contaminar los suelos y los mantos

freáticos con el uso excesivo de fertilizantes y agroquímicos. Una de las estrategias es la de cuantificar el uso del agua a través del estudio de las funciones de la producción de biomasa (Molden *et al.*, 2003).

De acuerdo al riego acumulado durante el experimento y el rendimiento máximo alcanzado por el tratamiento 6 lombricompost con 4 g nitrógeno planta⁻¹ se estableció el uso del agua (Cuadro 18), esta es el cociente entre la producción y el volumen de agua de riego aplicado expresada en términos productivos (kg m⁻³), y es un indicador agronómico importante en áreas con recursos hídricos limitados.

Cuadro 18. Uso del agua para el cultivo de *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Eirete.

Cultivo	Rendimiento	Volumen agua	Productividad del agua
	kg planta ⁻¹	m ³	kg m ³
Stevia	0.0198575	0.0000138	1439

Conforme al resultado obtenido (Cuadro 17) se necesita un m³ de agua para producir dos kg de hojas de stevia. Comparando la eficiencia del uso del agua con otros cultivos como tomate, pimiento, cultivadas en invernaderos el rendimiento tiende a ser alto, sin embargo con un manejo eficiente de este recurso como se realizó en esta investigación se puede llegar a los objetivos propuestos.

La eficiencia en el uso de agua de los cultivos hortícolas en invernadero es considerablemente más elevado que los cultivados al aire libre debido al clima, ya que dentro del invernadero aumenta la demanda de agua por una mayor evapotranspiración de las plantas. Por ejemplo, la productividad del agua en tomate al aire libre es considerablemente inferior (50%) en comparación a la cultivada en invernadero debido al efecto ya comentado del clima.

6.7 Propiedades físicas de los sustratos

Los resultados de la caracterización física de los sustratos utilizados al iniciar la investigación se observan en el Cuadro 19, en donde no hay diferencias significativas entre las propiedades estudiadas. En los tratamientos se puede observar que la densidad aparente disminuye con el aumento de las dosis de los abonos orgánicos, aspecto también observado por Abad y Noguera (1998). Como se sabe la densidad tiene influencia en la penetración de las raíces de las plantas, al respecto varias investigaciones reportan que conforme aumenta la densidad aparente del suelo, la penetración de las raíces disminuye y es más notorio por arriba de 1.3 g cm^{-3} para la mayoría de los cultivos (Flocker *et al.*, 1960; Tackett y Pearson, 1964). Si la finalidad es la producción en macetas se recomiendan valores de densidad aparente por arriba de 0.5 g cm^{-3} (Abad, 1995) para evitar el acame por el viento o por el mismo peso de la planta. Resultados similares fueron encontrados por Chen *et al.*, (1980); Vargas, (2007) y Campos *et al.*, (2012).

Cuadro 19. Propiedades físicas de los sustratos al iniciar la investigación.

Sustrato	Variables							
	g/N ¹	Pt	Pa	Crh	Da	Afd	Ar	And
		%			g cm ⁻³	cm		
Gallinaza	1	52	17	43	1.19	8.6	3.2	12.7
Gallinaza	2	48	16	48	1.08	10.2	3.7	11.1
Gallinaza	4	52	21	50	1.02	11.6	1.9	23.1
Lombricompost	1	48	17	46	1.13	12.1	5.1	9.3
Lombricompost	2	46	15	46	1.18	14.6	5.5	6.3
Lombricompost	4	51	17	49	1.02	14.7	4.1	9.0

Pt: porosidad total, Pa: porosidad de aireación, Crh: Capacidad de retención de humedad, Da: Densidad aparente, Afd: Agua fácilmente disponible, Ar: Agua retenida, And: agua no disponible.
¹g maceta⁻¹ de nitrógeno

La porosidad total en un sustrato, es el volumen total no ocupado por la fase sólida, es decir la parte que no está ocupada por partículas orgánicas ni minerales (Martínez, 1992). Los valores al iniciar el experimento oscilaron entre 46% y 52%.

Teniendo en cuenta el intervalo óptimo, 60% – 80% para los sustratos de acuerdo a Raviv *et al.*, (2002) todos los tratamientos se encuentran ligeramente por debajo. Es importante mencionar que la porosidad total en una alta proporción no implica una buena estructura sino que es necesario conocer la relación entre la porosidad que se encarga de alojar el agua de riego y la drenada, así también del aire que proporciona a las raíces de las plantas (Abad y Noguera, 2000). Sin embargo la porosidad de aireación (Pa) óptima es de 10% a 30% en volumen según Abad *et al.*, (1993). En los sustratos la Pa se encuentran dentro de los intervalos mencionados como los mejores para el desarrollo de los cultivos. Como se sabe, en un suelo bien aireado el sistema radical crece en forma vigorosa y desarrolla mayor cantidad de raicillas, estas son las mayores responsables de la absorción de agua y nutrimentos, si la aireación del sustrato disminuye los pelos radicales son incapaces de desarrollarse y se forman raíces poco ramificadas, gruesas y cortas.

En lo que se refiere a la capacidad de retención de humedad (Crh), prácticamente no hubo variación entre los tratamientos al inicio de la investigación, valores similares son reportados por Prasad y Ni Chualáin (2004) quienes mencionan que la (Crh) aumenta a medida que disminuye el tamaño de las partículas, por lo cual está muy asociada con la densidad aparente del medio de crecimiento. Así cuando el porcentaje de esta variable es menor, las plantas deben de realizar un mayor esfuerzo para adquirir los nutrimentos.

El agua fácilmente disponible presentó valores similares entre los dos abonos orgánicos pero se encuentran por debajo de los considerados óptimos por Abad *et al.*, (1993) con un intervalo de 20% a 30% en volumen, sin embargo valores similares son reportados por Chen *et al.*, 1980 y Wallach *et al.*, 1992. Para el agua retenida o de reserva solo los tratamientos con lombricompost se encuentran dentro de los rangos óptimos, resultados similares son reportados por Cruz *et al.*, (2010).

Los resultados al finalizar la investigación pueden ser observados en el Cuadro 20, y prácticamente no tuvieron variaciones con excepción de la capacidad

de retención de humedad (Crh) y el agua fácilmente disponible (Afd) que están estrechamente relacionados con la concentración de materia orgánica que tiende a disminuir a través del tiempo.

Cuadro 20. Propiedades físicas de los sustratos al finalizar la investigación.

Sustrato	Variables							
	g/N ¹	Pt	Pa	Crh	Da	Afd	Ar	And
		%			g cm ⁻³	cm		
Gallinaza	1	52	17	43	1.19	9.5	0.9	9.7
Gallinaza	2	48	16	48	1.08	11.6	5.1	9.1
Gallinaza	4	52	21	50	1.02	14.7	4.8	17.0
Lombricompost	1	48	17	46	1.13	10.2	4.4	6.3
Lombricompost	2	46	15	46	1.18	13.2	2.3	4.3
Lombricompost	4	51	17	49	1.02	14.4	3.8	7.0

Pt: porosidad total, Pa: porosidad de aireación, Crh: Capacidad de retención de humedad, Da: Densidad aparente, Afd: Agua fácilmente disponible, Ar: Agua retenida, And: agua no disponible.
¹g/maceta de nitrógeno

En la Figura 12 se muestra el contraste de la porosidad total, porosidad de aireación y retención de humedad de los sustratos al iniciar y finalizar el experimento, se puede observar que en la porosidad de aireación y la porosidad total, la variación no fue significativa. Como ya se mencionó, en investigaciones similares Bragg y Chambers, (1998) encontraron que las propiedades físicas que menos cambios presentan a través del tiempo son las dos citadas anteriormente. La retención de humedad fue el único parámetro que disminuyó al término de la investigación; esta propiedad se relaciona muy estrechamente con el porcentaje de materia orgánica que tiende a disminuir con el tiempo por la mineralización o por la lixiviación de los abonos. Al respecto Ndegwa *et al.*, (2000) y Hashemimajd *et al.*, (2004), señalan que los abonos orgánicos incrementan la retención del agua pero su efecto se mantiene por corto tiempo. En el experimento desarrollado la disminución puede atribuirse a la mineralización de los abonos, ya que el agua se suministró apropiadamente, por lo tanto, se disminuyó la lixiviación de nutrimentos.

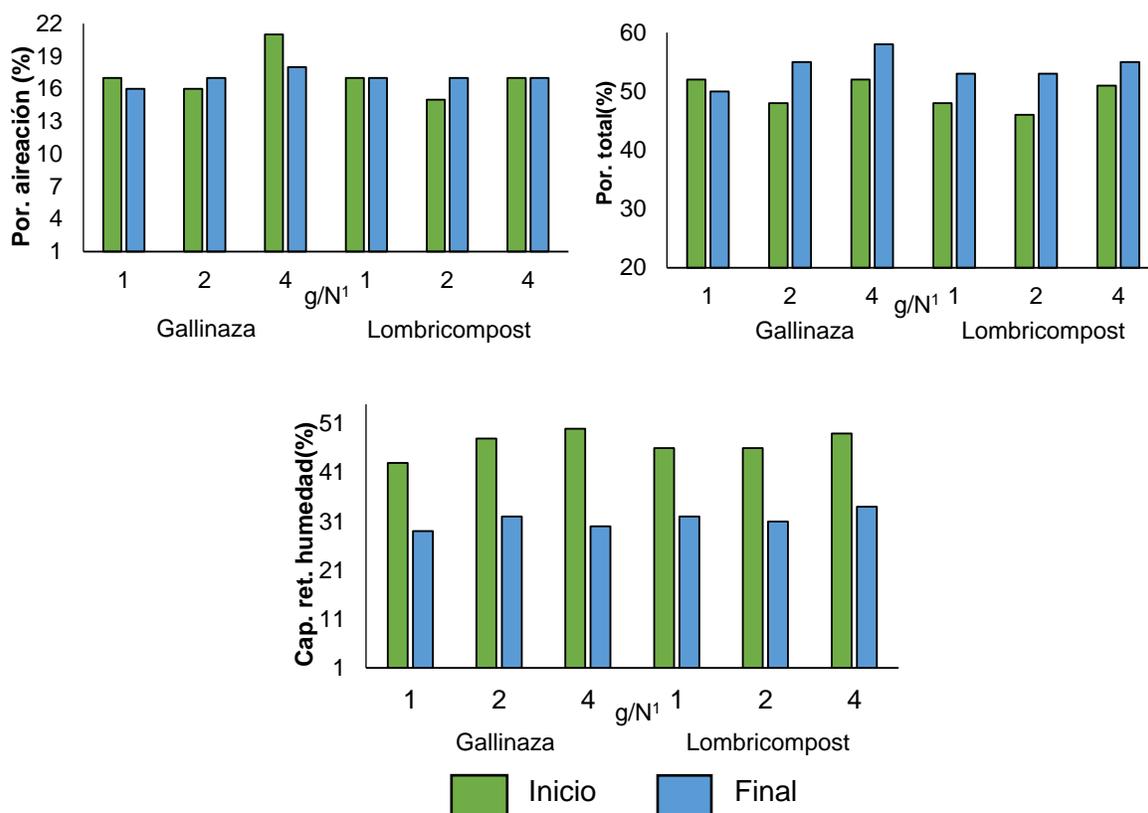


Figura 12. Variación de las características físicas: porosidad total, porosidad de aireación y capacidad de retención de humedad de los sustratos.

En la Figura 13 se muestran los resultados de la densidad y el agua fácilmente disponible. En cuanto a la densidad no hubo variaciones significativas durante el experimento. En las tres dosis de gallinaza (1, 2, 3 g N⁻¹ planta) hubo una disminución al término de la investigación, no así en los tratamientos con lombricompost (1, 2, 3 g N⁻¹ planta) que incrementaron la disponibilidad del agua durante el desarrollo del estudio. Bollo, (1999); Ansorena, (1994) y Abad *et al.*, (2004) destacan a la lombricompost como uno de los mejores materiales para su utilización como sustratos por las condiciones físicas y químicas que ofrece como se observó en este experimento.

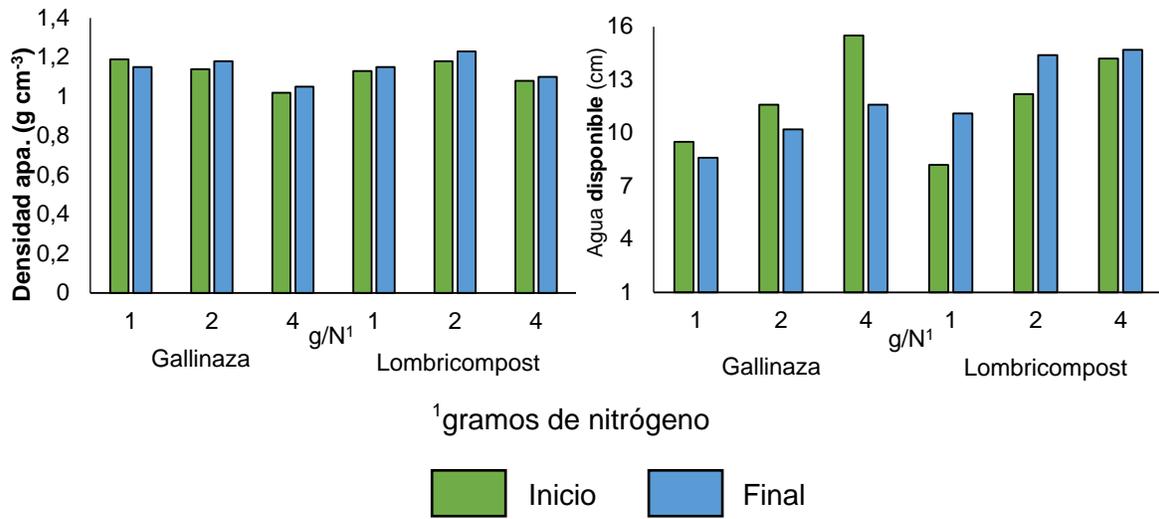


Figura 13. Variación de las características físicas: densidad aparente, y agua fácilmente disponible de los sustratos.

6.8 Determinación de glucósidos

6.8.1 Pruebas preliminares

Los primeros ensayos fue la realización de curvas de calibración. A partir de ello se procedió a realizar las pruebas cuyos resultados se describen a continuación. En la Figura 14 se ilustran los resultados del rebaudiosido A al agitar 0.25 g de polvo de stevia en un agitador de acción recíproca a temperatura ambiente y a 220 rpm. Se observa la mayor concentración del analíto a los 90 minutos. Por esta razón este fue el tiempo que se utilizó en la extracción de los glucósidos.

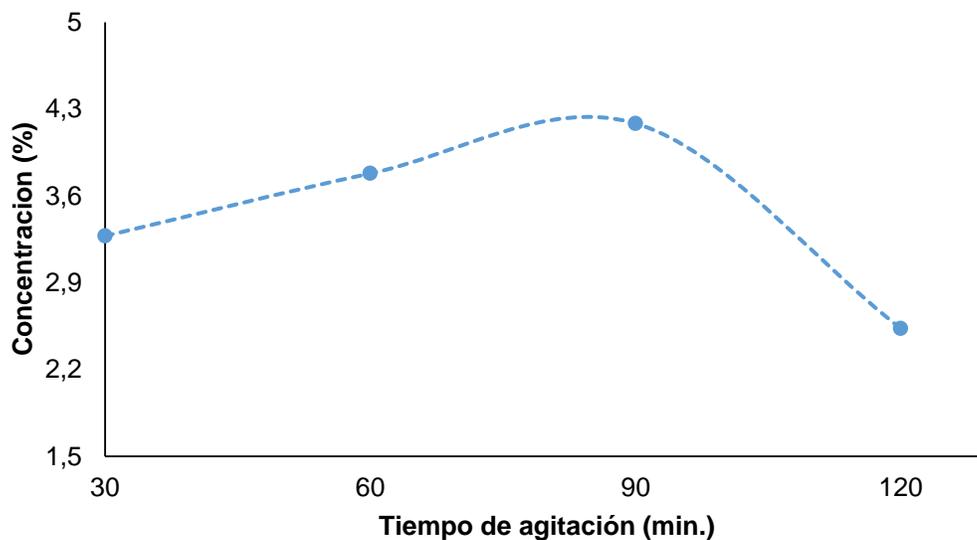


Figura 14. Concentración del rebaudiosido A a diferentes tiempos de agitación.

a) Evaluación de la recuperación del procedimiento de elusión

Como ya se dijo la determinación de los glucósidos consta de dos pasos importantes; la extracción de los glucósidos y la eliminación de las sustancias interferentes, mediante un cartucho de extracción en fase sólida (C18). El segundo paso debe realizarse cuidadosamente, lo que implica demostrar que los analitos de interés se están eluyendo totalmente, por lo que se debe evaluar la recuperación. Para ello, esta se evaluó con un estándar de rebaudiosido A de $56.8 \mu\text{g g}^{-1}$. En la Figura 15 se muestran los resultados obtenidos en diferentes oportunidades. El aumento de recuperación demuestra el manejo de la técnica. Considerando las últimas tres mediciones el promedio de la recuperación del rebaudiosido A fue de 98.9% con un CV de 0.84%. Por lo que una vez realizado este procedimiento se procedió a realizar las extracciones y la cuantificación de los glucósidos para todos los tratamientos, y con base en los resultados de los mejores tratamientos se seleccionaron dos épocas de corte a los cuales se les realizó también los análisis por HPLC.

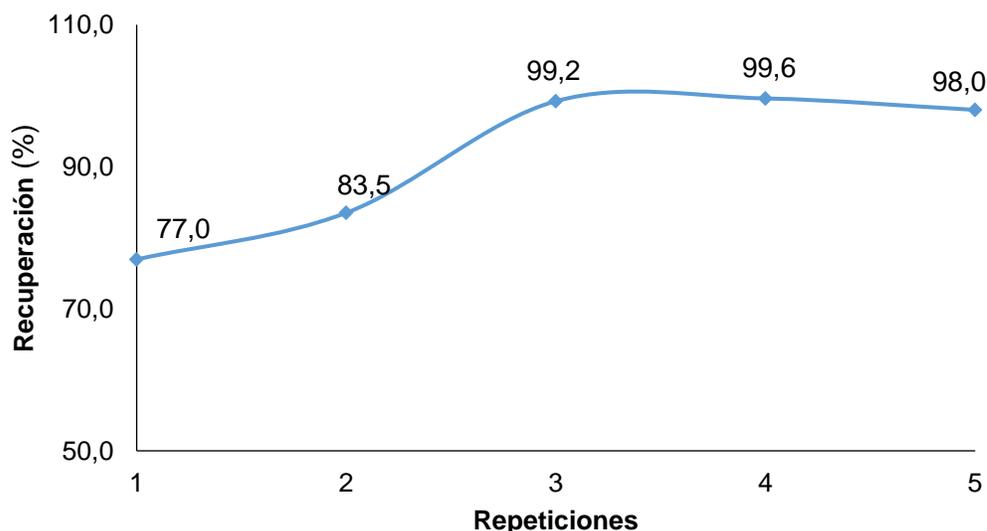


Figura 15. Recuperación del procedimiento de elución para el rebaudiosido A.

b) Determinación analítica

Inicialmente se inyectaron por separado los estándares del estevósido y del rebaudiosido A para conocer el tiempo de retención de los compuestos. Una vez realizada el análisis cromatográfico de una muestra real se decidió el tiempo de análisis para todas las muestras de los diferentes tratamientos. Posteriormente, se inyectó la mezcla de los dos estándares, en la Figura 16 se muestra el cromatograma correspondiente, el primer pico corresponde al estevósido y el segundo al rebaudiosido A. Definida la temperatura de análisis (30°C) se procedió a realizar estos. Cada día se analizaba un tratamiento; se hacía diariamente la extracción y se cuantificaba con un estándar, este se preparaba diariamente a partir de una solución estándar de 306.7 $\mu\text{g g}^{-1}$ para el estevósido y 568 $\mu\text{g g}^{-1}$ para el rebaudiosido A. Para determinar la concentración de los glucósidos de los tratamientos estudiados, se utilizaron los factores de respuesta. En la Figura 17, a manera de ejemplo, se muestra un cromatograma obtenido de un extracto de una repetición del tratamiento 5 (dosis media de lombricompost). Los resultados de los glucósidos de todos los tratamientos se muestran en el Anexo G.

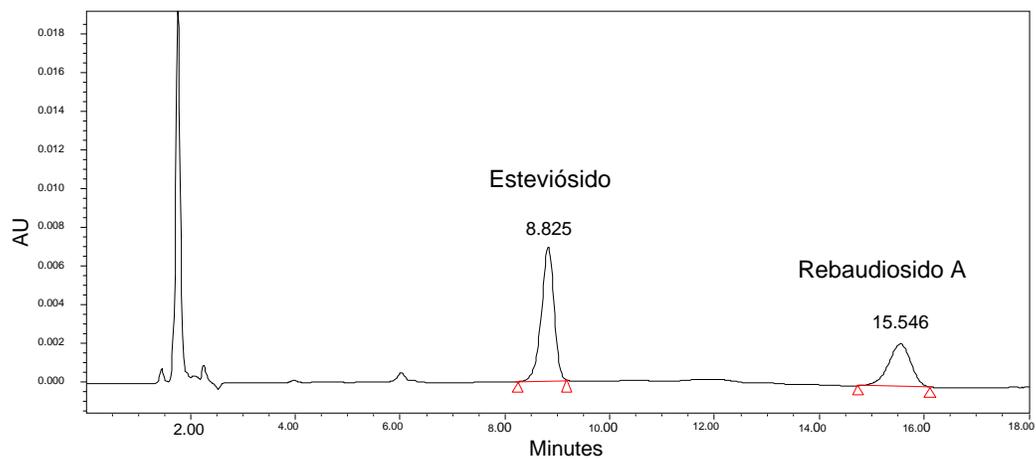


Figura 16. Cromatograma de un estándar del estevióside $80 \mu\text{g g}^{-1}$ y rebaudiosido A $58 \mu\text{g g}^{-1}$.

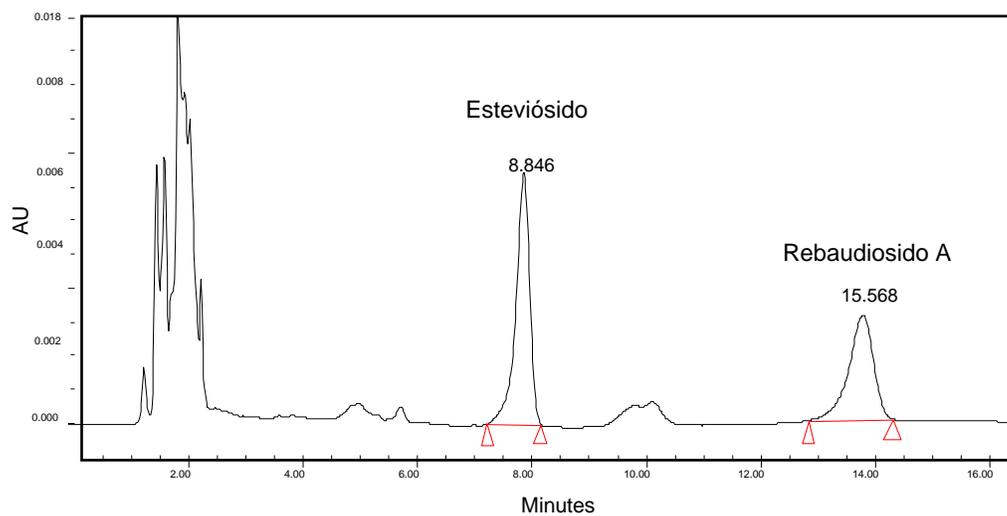


Figura 17. Cromatograma de un extracto de *Stevia rebaudiana* Bertonii, tratamiento 5 (dosis media lombricompost). Condiciones de Análisis por HPLC en 5.7.7 c.

6.8.2 Concentración de glucósidos al final del ciclo del cultivo

El cultivo se cosechó a los 73 DDT (días después del trasplante) al comienzo de la aparición de los botones florales. En el Cuadro 21 pueden observar los resultados en la concentración de esteviósido y rebaudiosido A de los diferentes tratamientos. Con base en el análisis estadístico y la comparación de medias (Tukey) se observan diferencias significativas ($P \geq 0.05$) para el esteviósido, sin embargo, para el rebaudiosido A no presentan significancia. En cuanto a las fuentes orgánicas la aplicación de lombricompost provocó una mayor cantidad de esteviósido y rebaudiosido A siendo los dos mejores tratamientos la dosis baja y media (1 y 2 g nitrógeno planta⁻¹) respectivamente.

Cuadro 21. Efecto de gallinaza y lombricompost en la concentración de esteviósido y rebaudiosido A al final ciclo de cultivo.

Fuente orgánica		Esteviósido	Rebaudiosido A	Σ Glucósidos
	g/N ¹		%	
Gallinaza	1	4.0c	4.8a	8.8
Gallinaza	2	4.3c	4.5a	8.8
Gallinaza	4	5.9ab	3.9a	9.8
Lombricompost	1	6.9a	4.2a	11.1
Lombricompost	2	7.6a	4.5a	12.1
Lombricompost	4	6.5ab	4.2a	10.7

¹ g nitrógeno/maceta. Valores entre columnas seguidas por letras son diferencias estadísticas de acuerdo a la separación de medias Tukey ($P \geq 0.05$).

La concentración de metabolitos secundarios, glucósidos en el caso de stevia, aumentan cuando las condiciones de crecimiento del cultivo son las óptimas es decir, cuando: no hay deficiencias nutrimentales, el riego se aplica de forma adecuada y el manejo agronómico (limpieza, poda, fertilización) se realiza teniendo en cuenta los factores anteriores para no afectar el crecimiento de la planta. Dado que en esta investigación el cultivo se mantuvo en óptimas condiciones, no se observan diferencias marcadas entre los tratamientos para esta

variable. La fertilización con lombricompost proporcionó las mejores condiciones químicas (mineralización de los nutrimentos) y físicas (porosidad de aireación, agua fácilmente disponible) en comparación con la gallinaza, por esta razón el esteviósido y rebaudiosido A se encuentran en mayor concentración con esta fuente orgánica.

Jiménez *et al.*, 2010 evaluaron la concentración del esteviósido y rebaudiosido A en stevia, observaron que la mayor variación se presentaba cuando las plantas eran reproducidas por semillas debido a la variabilidad genética, sin embargo cuando la propagación era asexual las diferencias no fueron significativas. Brandle *et al.*, 1992; Bondarev *et al.*, 2003 y Mordechai *et al.*, 2013 observaron también que las concentraciones de glucósidos están influenciadas por la altitud, estación del año y el clima donde se cultiva esta planta.

Xiangyang Liu *et al.*, 2011 demostraron que la fertilización orgánica en el cultivo de stevia eleva la concentración de esteviósido y rebaudiosido A, sin embargo la cantidad de estos dos compuestos se ven afectados por el tipo de abono orgánico. Por los resultados obtenidos en esta investigación queda demostrada que la lombricompost proporciona mejores condiciones para el crecimiento de esta planta.

Según De Lima *et al.*, (1997) deficiencias de Ca^{++} en hojas de stevia (menores al 1%) ocasionan una menor concentración de esteviósido. En cuanto al Mg^{++} , este es fundamental para obtener altas concentraciones de glucósidos por su papel central en la molécula de clorofila, así también se combina con el ATP y permite la fosforilación del ácido mecalónico (AMV), para formar iporenil pirofosfato (IPP) primer compuesto isoprenoide en la síntesis de los glucósidos y que en la misma ruta de síntesis actúa como cofactor de la enzima citoplasmática que cataliza la formación del farnesil pirofosfato (Srivastava, 2002).

6.8.3 Concentración de glucósidos durante del ciclo del cultivo

Se realizaron cinco cortes de junio a agosto del 2014, los que corresponden a los 33, 43, 53, 63 y 73 días después de la poda de uniformización. Para esta evaluación se seleccionaron los tratamientos 4 y 5 (dosis baja y media de lombricompost) debido a su mayor concentración de esteviósido y rebaudiosido A en comparación a los demás tratamientos. En el Cuadro 22 se presentan los resultados, en los que se ilustra la tendencia en la concentración de los glucósidos durante el ciclo de cultivo de la stevia. Se puede observar que la mayor cantidad de los compuestos estudiados se presentó el 30 de julio del 2014, a los 63 días después de la poda de uniformización. De lima *et al.*, (1997) en cultivos de stevia, en Brasil, mencionan que los glucósidos disminuyen con la aparición de los botones florales y por esta razón la cosecha debe de realizarse al momento de su aparición, pero como se puede apreciar al llegar esa etapa la concentración disminuye.

Cuadro 22. Concentración de esteviósido y rebaudiosido A durante el ciclo del cultivo de la stevia.

Fechas de corte	Esteviósido	Rebaudiosido A
	%	
30 de Junio	5.9	1.8
10 de Julio	6.7	3.3
20 de Julio	10.9	4.9
30 de Julio	11.5	5.1
9 de Agosto	6.8	4.0

En la Figura 18 se ilustra la concentración del esteviósido y del rebaudiosido A durante el ciclo del cultivo. La concentración de ambos aumenta conforme se desarrolla la planta de stevia, llegando a un punto en donde disminuye la concentración de los glucósidos. Como ya se mencionó las recomendaciones agronómicas para realizar la cosecha de esta planta es cuando aparecen los primeros botones florales (Malavolta *et al.*, 1989; Carneiro, 1992; Casaccia y Álvarez, 2008; Lemus-Moncada *et al.*, 2010) con la finalidad de obtener la mayor

cantidad de biomasa, sin embargo, los resultados obtenidos demuestran que existe una disminución considerable de los glucósidos en especial del esteviósido en un corto período de crecimiento.

Es importante recalcar que si la finalidad es utilizar las hojas de esta planta con fines medicinales y edulcorantes conviene realizar la cosecha antes de la aparición de las flores de la stevia. Para uso medicinal en esta etapa la planta tendrá la mayor cantidad de esteviósido, compuesto al que se le atribuyen propiedades terapéuticas. Si la finalidad es cosechar la stevia con fines edulcorantes se debería cultivar variedades de stevia con mayor cantidad de rebaudiosido A, otra alternativa sería esperar más días antes de cosecharla para que disminuyera el esteviósido y en consecuencial el sabor amargo.

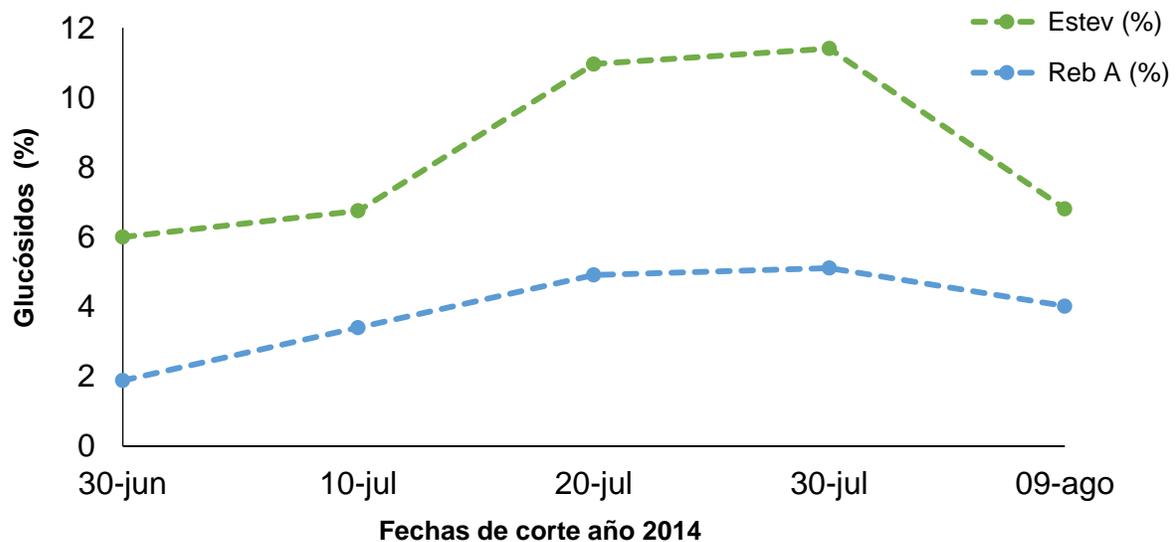


Figura 18. Concentración del esteviósido y del rebaudiosido A durante el ciclo de cultivo.

En la Figura 19 se puede observar los datos en grados días desarrollo (GDD) es decir en sus horas térmicas, para cada momento del corte de esta manera se podrá obtener datos más cercanos y conocer la cantidad de energía requerida por la planta para la concentración de esteviósido y rebaudiosido A y poder reproducir los datos en diferentes agroecosistemas. Para la máxima concentración de los

glucósidos de la stevia se requieren 562 GDD, a este tiempo térmico fisiológicamente la planta llegó a su máxima concentración de estos metabolitos secundarios, es decir alcanzó a su máximo desarrollo vegetativo y comienza otra etapa fenológica, la reproducción, a la que la planta destina la mayor parte de esta energía, y ello explica porque a los 604 GDD se observa una menor concentración de los dos compuestos.

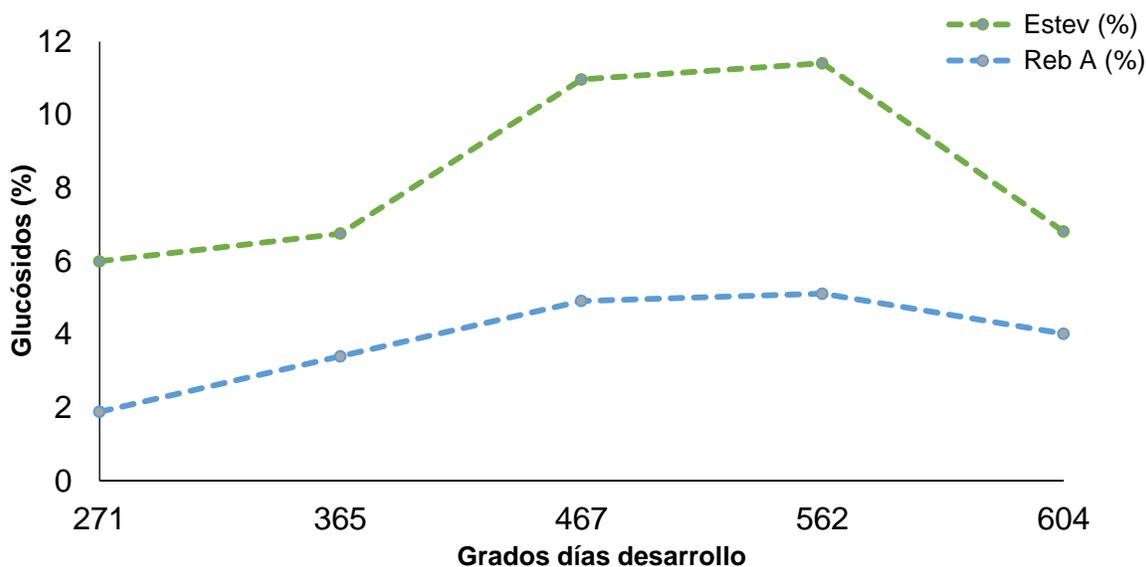


Figura 19. Concentración del esteviósido y del rebaudiosido A durante el ciclo cultivo en grados días desarrollo.

El cálculo de los grados días desarrollo en los cultivos permite hacer inferencias y tomar decisiones de acuerdo a la finalidad que se pretenda. Como el caso de la stevia se puede obtener mayor cantidad de glucósidos y adelantar el otro ciclo ganando de 10 a 15 días, consecuentemente se obtendrá mayor cantidad de biomasa y de glucósidos en primavera-verano, estaciones en donde el cultivo de *Stevia rebaudiana* Bertoni expresa su máximo potencial.

VII. Conclusiones

Los resultados indican que la lombricompost fue el abono que creó las mejores condiciones para el crecimiento de la stevia para la producción de biomasa.

La concentración nutrimental de las hojas y tallos permite conocer el intervalo en el que las plantas de stevia hacen eficiente la utilización de nutrimentos.

La absorción nutrimental de la stevia permitirá tomar decisiones correctas en cuanto a la demanda de nutrimentos en especial de N, P y K.

En cuanto a las propiedades físicas de los sustratos la capacidad de retención de humedad disminuyó al finalizar la investigación en los tratamientos con gallinaza no así con lombricompost.

El desarrollo del modelo fenológico muestra que el periodo en donde la stevia requiere mayor cantidad de energía lumínica es el desarrollo vegetativo, además permite tomar decisiones de manejo en las etapas del desarrollo vegetal y decidir el momento ideal para la cosecha con base a la concentración de los glucósidos.

VIII. Recomendaciones

Para investigaciones futuras en la stevia sería importante realizar dos cosechas, con sus análisis correspondientes para aprovechar el ciclo corto que presenta, de esta forma se podrá ofrecer una recomendación más objetiva a los productores que desean cultivar la planta.

Se debería aprovechar los meses de mayor luminosidad para esta zona del país. La stevia debería ser trasplantada a fines de marzo o inicios de abril cuando ya no haya riesgo de heladas que podrían afectar el cultivo, así se tendrán dos cosechas para acumular la mayor cantidad de biomasa posible.

Uno de los temas a tratar en trabajos futuros es la mortandad de plantas posterior al corte. A nivel de campo se tiene una pérdida de aproximadamente el 25% y afecta de gran manera a los productores que se dedican a este rubro agrícola.

IX. Bibliografía

Adler, P., M. 1992. Porous media: geometry and transports. Butterworth-Heinemann. Stoneham, M.A. USA. 235 p.

Abou-Arab, A., Abou-Arab, A., Abu-Salem, M. F. 2010. Physico chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. African Journal of Food Science, 4: 269–281.

Álvarez, L. A., Casaccia, R., Amarilla, E. 1996. Propagación de especies oléricas, frutícolas e industriales seleccionadas. Ministerio de Agricultura y Ganadería. 226 pp Asunción, Paraguay.

Álvarez, L. A., Casaccia, R. 2008. Ministerio de Agricultura y Ganadería del Paraguay. 2008. Producción de Ka´a He´e. 3a. ed., Asunción. Paraguay.

Alvajana, M.C.R., J.A. Hoppin y F. Kamel 2004. Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. Annual Review of Public Health 25: 155-197.

Atiyeh, R.M., Subler, C. A., Edwards, G., Bachman, J.D., Metzger y W. Shuster 2000. Effects of vermicomposts and composts on plant growth in horticultural container media and soil. Geobiología 44: 579-590.

Atteh, J., Onagbesan, O., Tona, K., Buyse, J.A., Decuypere, E.B and Geuns, J. 2011. Potential use of *Stevia Rebaudiana* in animal feeds. Archivos de zootecnia vol. 60, núm. 229, p. 135.

Ansorena, M. J. 1994. Sustratos, propiedades y caracterización. Mundi Prensa, Madrid. ISBN.

Abad, B. M., Noguera M. y C. Carrión B. 2004. Los sustratos en el cultivo sin suelo. pp. 113-158. In: M. Urrestarazu G. Tratado de cultivo sin suelo. Mundi Prensa. Madrid, España.

Abad, B. M. y P. Noguera. 2000. Los sustratos en los cultivos sin suelo. pp. 137-185. In: M. Urrestarazu G. (ed.). Manual de cultivo sin suelo. Universidad de Almería. Mundi Prensa. España.

Abad, B. M., P., Noguera M. y B., Carrión. 2005. Sustratos en los cultivos sin suelo y fertirrigación Cadahía L. (ed.). Fertirrigación: cultivos hortícolas y ornamentales. Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 299-352.

Barriocanal, L., Palacios, M., Benitez, G., Benitez, S., Jimenez, J., Jimenez, N., et al. 2008. Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans, a pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in type 1 and type 2 diabetics. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 51: 37–41.

Bastida, T. A. 2002. Sustratos hidropónicos. Departamento de Preparatoria Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.

Baker, J.T. y Reddy, V.R. 2001. Temperature effects on phenological development and yield of muskmelon. *Annals of Botany*. 87: 605-613.

Bergs, D., Burghoff, B., Joehnck, M., Schembecker, G. 2012a. Fast and isocratic HPLC-method for steviol glycosides analysis from *Stevia rebaudiana* leaves. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*. 7:147-154.

Bergs, D., Merz, J., Delp, A., Joehnck, M., Martin, G., Schembecker, G. 2012b. Preparative of rebaudiosido A from aqueous extracts using chromatography: a process idea. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*. 7:295-303.

Bett-Garber, K.L. Lamikanra, G.E. Lester, D.A. Ingram, and M.A. Watson. 2005. Influence of soil type and storage conditions on sensory qualities of fresh-cut cantaloupe (*Cucumis melo*). *Journal Science Food Agriculture*. 85: 825–830.

Bonhomme, R. 2000. Bases and limits to using degree. day units. *European Journal of Agronomy*, 13:1-10.

Bollo T., E. 1999. Lombricultura: una alternativa de reciclaje. Quito, Ecuador.

Boehm, M.J., Madden, L.V. y Hoitink, H.A.J. 1993. Effect of organic matter decomposition level on bacterial species diversity and composition in relationship

to Pythium damping-off severity. Applied and Environmental Microbiology, 59: 4171-4179.

Buchanan, B., W. Gruissem y R. Jones. 2000. Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physi American Society of Plant Physiologists, Waldorf, MD.

Braz de Oliveira, A. J., Correia Gonçalves, R. A., Cantuaria Chierrito, T. P., Müller dos Santos, M., Mera de Souza, L., Gorin, P. A. J. 2011. Structure and degree of polymerisation of fructooligosaccharides present in roots and leaves of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Food Chemistry, 129, 305–311.

Bragg, N. C. y B. J. Chambers. 1988. Interpretation and advisory applications of compost air filled porosity Acta Horticultura. 221: 35-44.

Brandle, J., Telmer, P. 2007. Steviol glycoside biosynthesis. Phytochemistry, 68: 1855–1863.

Brandle, J. E., Starratt, M., Gijzen. 1998. *Stevia rebaudiana*: qualities farm biologiques. Canadian Journal Plant Science 78: 527-536.

Bremmer, J. M. 1965. In C. A. Black medtofos of soil analyses Agronomy 9: 1149 – 1178. American American Society Agronomy. Madison, Wisconsin. USA.

Blumenthal, M. 1996. Perspectives of FDA'S new *Stevia* Policy, After four years, the agency lifts its ban-but only partially. Whole Foods Magazine.

Bunt, A.C. 1988. Media and mixes for container-grown plants. Unwin Hyman LTd., Great Britain.

Castellanos, J. Z., J. A. Acosta Gallegos y J. J. Pena Cabriales. 1993. Nodulación y extracción de N en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) bajo diferentes condiciones de humedad. Terra. 11: 174-177.

Carneiro, JWP. Bertonha, A. Martins, E.N. 1989. The influence of crop age after uniform cutting on some agronomic characteristics of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Pesquisas Agropecuaria Brasileiras*: 24: 211-215.

Carneiro, J. W. P. 2007. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Stages of plant development. *Canadian Journal Plant Science*. 87: 861–865.

Carneiro, J., Muniz, A., Guedes, T. 1997. Greenhouse bedding plant production of *Stevia rebaudiana* (Bert) bertoni. *Canadian Journal of Plant Science*, 77: 473–474.

Campos, G., H.; Trejo, C.; Peña, V., C.; Ramírez, A., C. and Sánchez, G., P. 2009. Effect of partial rootzone drying on growth, gas exchange, and yield of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Scientia Horticulturae* 120:493-499.

Cacciola, F., Delmontea, P., Jaworska, K., Dugo, P., Mondello, L., & Rader, J. (2011). Employing ultrahigh pressure liquid chromatography as the second dimension in a comprehensive two-dimensional system for analysis of *Stevia rebaudiana* extracts. *Journal of Chromatography A*, 1218: 2012–2018.

Castillo M; López, L; Morales Payán, JP; Alcántara, S. 2000. Alternativas biológicas de manejo de *Heliothis virescens* y *Spodoptera* spp. en tomate industrial, República Dominicana *Manejo Integrado de Plagas* 56:82-83.

Cámara Paraguaya de la Stevia (CAPASTE). VII Simposio Internacional de la *Stevia rebaudiana* Bertoni año 2013.

Carmen R. Bonilla. C, Manuel S. Sánchez O., Diego F. Perlaza. 2007. Evaluation of propagation methods, nitrogen fertilization and phenology in stevia in the Cauca Valley, Colombia Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, AA. 237. Palmira, Valle, Colombia.

Ceunen, S., Geuns, J.M., 2013. Influence of photoperiodism on the spatio-temporal accumulation of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Plant Science*. 198:72–82.

Corrales, G.I., López, L.P., Guerra, G.A. 2000. Uso de la gallinaza y fertilizante mineral en el guayabo (*Psidium guajaba* L.). *Centro Agrícola*. 27: 47-57.

Confalone, A.E. y Navarro D., M. 1999. Comparación de modelos de tiempo térmico para maíz. *Revista Brasileira de Agrometeorologia*, 7:207-211.

Corrales, G.I., González, M., López, L.P. 2003. Respuesta del mango (*Mangifera indica* L.) a las aplicaciones de humus de lombriz con fertilizante mineral. *Centro Agrícola*. 30:45-50.

Crammer, B., Ikan, R., 1987. Progress in the chemistry and properties of rebaudio-sides. In: Grenby, T.H. (Ed.), *Developments in Sweeteners 3*. Elsevier, New York, pp. 45–64.

Chapman, S. R. and L. P. Carter. 1976. *Crop production. Principles and practiques*. Freeman San Francisco, USA.

Cruz, M. S. 1982. *Abonos orgánicos*, Universidad Autónoma Chapingo, Imprenta Universitaria, Chapingo, México. 129 pp.

Cruz, Z. V. 1995. Efecto inmediato y residual de abonos orgánicos. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillos, México.

Chen, Y., Banin, A. y Ataman, Y. 1980. Characterization of particles and pores, hydraulic properties and water–air ratios of artificial growth media and soils. *ISOSC Proc.* pp. 63-81.

Das, S., Das, AK, Murphy RA. 1992. Evaluation of the cariogenic potential of the intense natural sweeteners stevioside and rebaudioside A. *Caries Res* 26: 363–366.

De Boodt, M. Verdonck, O. and Cappaert, I. 1974. Method for measuring the water release curve of organic substrates. *Acta Horticulturae* 37:2054- 2062.

De Lima, O., E. Malavolta, J. De Sena y J. Carneiro. 1997. Absorção e acumulação de nutrientes em estévia *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertonii: II. Micronutrientes. *Science Agricola*. 54(1-2):14-22.

De Lima, O., E. Malavolta y H. Yabico. 1997. Influencia de estresses nutricionais no teor e produção de esteviosídeo durante o desenvolvimento da *Stevia*. *Pesquisa. Agropecuaria. Brasileira*. 32(5): 489-494.

De la Cruz, E., R., Osorio-Osorio, E., Martínez-Moreno, A.J., Lozano del Río, A. Gómez-Vázquez y R. Sánchez-Hernández 2010. Uso de compostas y vermicompostas para la producción de tomate orgánico en invernadero. 35: 363-368.

Espinosa F., J. 1988. Evaluación del abonado con compost bajo dos modos de aplicación en cuatro fechas de incorporación antes de la siembra con cuatro dosis en el cultivo del sorgo bajo riego en la región de Marín, N.L. Tesis de Licenciatura. Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Etchevers, J, D. 1999. Técnicas de diagnóstico útiles en la medición de la fertilidad de suelo y estado nutrimental de los cultivos. *Terra Latinoamericana* pp 209-219.

Epstein, E. y A. Bloom. 2005. *Mineral nutrition of plants: principles and perspectives*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Eghball, B. 2000. Nitrogen mineralization from field-applied beef cattle feedlot manure or compost. *Soil Science American Journal*. 64:2024-2030.

Estrada, P.M. M. 2005. Manejo y procesamiento de la gallinaza. *Revista Lasallista de Investigación*. 2: 43-48.

Federación Mexicana de Diabetes (FMD). 1992. Elevated Incidence of Type 2 Diabetes in San Antonio, Texas, Compared With That of Mexico City, Mexico. (www.fmdiabetes.org/fmd/pag/diabetes_numeros.php).

Félix-Herran, J. A., Sañudo-Torres, G. E., Rojo-Martínez, R., Martínez-Ruiz, y R. V. Olalde-Portugal. 2008. Importancia de los abonos orgánicos. *Ra Ximhai* 4:57-67.

Ferrera C., R. y S. Santamaría, R. 1997. Bioproducción: Una aportación a la agricultura orgánica. CONACYT 4255P-B9607. II Foro Nacional sobre Agricultura Orgánica. N°4.pp: 16-38.

Fink, A. 1988. Fertilizantes y fertilización, Editorial Reverté, S. A. Madrid, España, 159 pp.

Funcfos. Fundación Colombiana para el Desarrollo y el Fomento Social. 2000. Manual de la Stevia. Stevia rebaudiana Bertoni. Ka´a he´e. 23 p.

Flocker, W., J.; Tamm, H. y Vomocil, J., A. 1960. Effect of soil compaction on tomato and potato yields. *Agronomy Journal* 52:345-348.

Garret, L. 2004. Mango sostenible fruta fresca. Perfil de mercado. Centro de Inteligencia sobre Mercados Sostenibles (CIMS). Alajuela, Costa Rica.

Gardana, C., Scaglianti, M., & Simonetti, P. 2010. Evaluation of steviol and its glycosides in Stevia rebaudiana leaves and commercial sweetener by ultra-highperformance liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217, 1463–1470.

Geuns, J. 2003. Stevioside. *Phytochemistry*, 64: 913–921.

Gómez M. Á., L., Gómez-Tovar y R Scwentesi-Rindermann. 2003. México como abastecedor de productos orgánicos. CIESTAAM. *Revista Chapingo Comercio Exterior*. 53:128-138.

González. I., Moguel-Ordoñez. Y., Betancur-Ancona. D. 2014. Rapid HPLC Method for Determination of Rebaudioside D in Leaves of Stevia rebaudiana Bertoni Grown in the Southeast of México. *American Journal of Analytical Chemistry*, 2014, 5, 813-819.

Goyal, S., Samsher & Goyal, R. 2010. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: A review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61:1–10.

Gregersen, S., P. Jeppesen, J. Holst y K. Hermansen. 2004. Ant hyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism*. 53(1):73-76.

Hanson, J.R., De Oliveira, B.H., 1993. Stevioside and related sweet diterpenoid glycosides. *Nat. Prod. Rep.* 10:301–309.

Hajek, R.E. Rodríguez, E. Damn, A. 1976. Aplicación del método de sumas térmicas para la determinación de períodos vegetativos en Chile. *Ciencia Investigación Agrícola* 3:175-180.

Hashemimajd, K., M. Kalbasi, A. Golchin, and H. Shariatmandari. 2004. Comparison of vermicomposting and compost as potting media for growth of tomatoes. *Journal Plant Nutrition*. 27: 1107-1123.

Hernández-Valencia, I., López, A. Y. y López-Hernández, D. 1999. Cambios en los contenidos nutricionales en suelos arenosos de sabanas del Amazonas bajo fertilización orgánica prolongada. *Ecotropicos* 12 (1): 9-14.

Hoitink, H.A.J.; Inbar, Y. Boehm, M.J. 1991. Status of compost-amended potting mixes naturally suppressive to soilborne diseases of floricultural crops. *Plant Disease*, 75: 869-873.

INEGI (Instituto de Estadística, Geografía e Informática). 1998. Anuario estadístico del estado de Oaxaca. Tomo I.

INIFAP (Instituto Nacional de Investigación, Forestal, Agrícolas y Pecuarias). 2011. Paquete Tecnológico Estevia (*Stevia rebaudiana*) Establecimiento y mantenimiento.

Jackson M., L. 1976. Análisis químico de suelos. Traducido al español J. B. Martínez. Edit. Omega. Barcelona, España.

Jenni, S., Cloutier, D.C., Bourgeois, G., y Stewart, K.A. 1996. A heat unit model to predict growth and development of muskmelon to anthesis of perfect flowers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121: 274-280.

Jarma, O., Combatt, E., Cleves, J. (2010). Aspectos nutricionales y metabolismo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Agronomía Colombiana* 28: 199-208, 2010.

Jarma, A. 2008. Estudios de adaptación y manejo integrado de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.): nueva alternativa agroindustrial del Caribe colombiano. Una revisión. *Rev. Colombia Ciencia Horticultura* 2: 109-120.

Katayama, O., Sumida, T., Hayashi, H., Mitsuhashi, H. 1976. The practical application of *Stevia* and research and development data (pp. 747). Japan: I.S.U. Company.

Kapica, Cathy. 2014. El extracto de dulce de la hoja de stevia promueve la salud dental. Global Stevia Institute. (Consulta Marzo 19, 2015) (<http://globalstevia institute.com/nutricion-y-salud/salud-diaria/>).

Kim, J., Choi, Y.H., Choi, Y.H., 2002. Use of stevioside and cultivation of *Stevia rebaudiana* in Korea. In: Kinghorn, A.D. (Ed.), *Stevia: the Genus Stevia, Medical and Aromatic Plants -Industrial Profiles*, vol. 19. Taylor and Francis, London and New York, pp. 196–202.

Kinghorn, A., y Soejarto, D. 1985. Current status of stevioside as a sweetening agent for human use. In H. Wagner, H. Hikino, & N. Farnsworth (Eds.), *Economics and medicinal plant research*. vol. 1, pp. 1–52.

Kennelly, E. 2002. Sweet and non-sweet constituents of *Stevia Rebaudiana* (Bertoni) Bertoni. In A. Kinghorn (Ed.). *Stevia, the Genus Stevia. Medicinal and aromatic plants industrial profiles* vol. 19, pp. 68–85.

Koyama, E., N. Sakai, Y. Ohori, K. Kitazawa, O. Izawa; K. Kakegawa; A. Fujino y M. Ui. 2003. Absorption and metabolism of glycosidic sweeteners of *stevia*

mixture and their aglycone, steviol, in rats and humans. *Food Chemistry. Toxicology*. 41: 875-883.

Kolb, N., J.L Herrera, D.J. Ferreyra, and R.F. Uliana. 2001. Analysis of sweet diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*: improved HPLC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:4538–4541.

Latham, M. 2002. Macronutrientes: Carbohidratos, proteínas y grasas. In *Nutrición humana en el mundo en desarrollo*. vol. 29 (pp. 99–107). Roma: FAO.

Labrador, M. J. 2001. La materia orgánica en los agroecosistemas. 2º edición, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ediciones Mundi Prensa. Madrid, España. 90-107.

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: 131-135.

López, C. L. 1993. Exposición a plaguicidas organofosforados. *Perspectivas en Salud Pública* N°. 18. México: Instituto Nacional de Salud Pública.

Lindsay, W. L.; Norvell, W. A. 1978. Development of DTPA soil for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Science Society American Journal*. 42: 421-428.

Martínez, C.C. 1996. Potencial de la Lombricultura. Primera edición en español. *Lombricultura técnica mexicana*. México. 129 p.

Madan, S., Ahmad, S., Singh, G.N., Kohli, K., Kumar, Y., Singh, R., Garg, M., 2010. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni a review. *Ind. J. Nat. Prod.*1: 267–286.

Martínez F., J. L., Tijerina C., L., Arteaga R., R., Vásquez P., M. A., Becerril-Román A. E. 2007. Determinación de zonas agroclimáticas para la producción de mango (*Mangifera indica* L. “Manila”) en Veracruz, México. *Investigaciones geográficas*. Boletín 63: 17-35.

Maheshwar, H. M. 2005. Effect of different levels of nitrogen and dates of planting on growth and yield of stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.). University of Agricultural Sciences, Department of Horticulture. Dharwad, India.

Mishra, P., Singh, R., Kumar, U., y Prakash, V. 2010. *Stevia rebaudiana* – A magical sweetener. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 5: 62–74.

Mordechai S., Mwafaq I., Ravit F., David C., Yehoshua S., Nativ D. 2013. Dynamics of yield components and stevioside production in *Stevia rebaudiana* grown under different planting times, plant stand and harvest regime. *Industrial Crops and Products* 50: 731– 736.

Mohammad, M., Mohammad, U., Sher, M., Habib, A., & Iqbal, A. 2007. In vitro clonal propagation and biochemical analysis of field established *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Pakistan Journal of Botany*, 39: 2467–2474.

Molden D.; Murray-Rust H.; Sakthivadivel R.; Makin I. 2003. A water productivity framework for understanding and action. In: *Water Productivity in Agriculture: Limits and Opportunities for Improvement*. Wallingford, Colombo: 1-18.

Muratalla L., A. 2010. Entrevista personal con experto en cultivo de *Stevia rebaudiana*. Abril 12. Colegio de Postgraduados, México.

Norman, Q. A. Edwards, C.A. Bierman, P. Metzger, J. D. Lee, S. and Welch C. 2003. Effects of vermicomposts on growth and marketable fruits of field-grown tomatoes, peppers and strawberries. *Pedobiologia* 47:731-735.

Ndegwa, P. M, S. A. Thompson, and K. C. Dass. 2000. Effects of stocking density and feeding rate on vermicomposting of biosolids. *Bioresour. Technol.* 71: 5-12.

OMS. Diabetes mellitus. Informe de un grupo de estudio de la OMS. Ginebra: Serie de informes técnicos 2010. (www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/bol_diabetes/dm2_cierre_2010.pdf).

Oliveira, A. P., Silva, V. R., C. S. Santos, J. S. Araujo e J. T. Nascimento. 2002. Produção de coentro cultivado com esterco bovino e adubação mineral. Horticultura. Brasileira. 20(3):477-479.

Osorio-Tomas, S. Barois, I. Aranda-Delgado, E. Brown, G. y Perez-Garcia, J. A. 1999. Efecto de la lombricompost como sustrato en la producción de plántulas de chile criollo mirador (*Capsicum annum* L). Lombricultura y Abonos orgánicos. Simposium Internacional y Primera Reunión Nacional. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Unidad de Identificación de Mercados. Chapingo, Mexico.139-140. pp.

Olsen, S. R. y L. A. Dean. 1965. Phosphorus. In: C. A. Black (ed.). Methods of soil analysis. Part 2. Agronomy 9: 1035 – 1049. American Society Agronomy. Madison, Wisconsin. USA.

Orozco, M., Thienhaus, S. 1997. Efecto de la gallinaza en plantaciones de cacao (*Theobroma cacao* L) en desarrollo. Agronomía Mesoamericana. 8: 81-92.

Prakash, I., G.E. DuBois, J.F. Clos, K.L. Wilkens y L.E. Fosdick. 2008. Development of rebiana, a natural, no caloric sweetener. Food Chem. Toxicol. 46: 75-82.

Prasad, M. and Ni Chualáin, D. (2004). Relationship between particle size and airspace of growing media. Acta Horticultura. 648: 161-176.

Pérez, V. A. y Landeros, C. 2009. Agricultura y deterioro ambiental. Elementos Ciencia Arte y Cultura. 16:19-25.

Peralta Antonio, A. Rebolledo-Martínez, A. E. Becerril-Román, D. Jaén-Contreras, A. L. del Angel-Pérez. 2014 Response to organic fertilization in mango cultivars: Manila, Tommy Atkins and Ataulfo. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 2014, 14 (3), 688-700.

Pól, J., Hohnová, B., & Hyötyläinen, T. 2007. Characterization of *Stevia rebaudiana* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1150, 85–92.

Raviv, M. 1998. Horticultural uses of composted material. *Acta Horticultura*. 469: 225-234.

Ramesh, K., Virendra, S., Megeji, N.W., 2006. Cultivation of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: a comprehensive review. *Adv. Agronomic* 89: 137–177.

Ren, G., X. Liu and Y. Shi, 2011. Effects of drought stress on physiological indices and dry leaf yield of *stevia rebaudiana bertoni*. *J. Agric.*, pp: 1-6.

Richman, A., M. Gijzen, A. Starratt, Z. Yang y J. Brandle. 1999. Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway. *Plant J.* 19(4), 411-421.

Rodríguez, A.M., Muñiz, U.O., Calero, M.O., Montero, A.A., Martínez, R.F., Limeres, J.T., Orphee, M. M., Aguilar, A.A.M. 2012. Contenido de metales pesados en abonos orgánicos, sustratos y plantas cultivadas en organopónicos. *Cultivos Tropicales*. 33: 5-12.

Rosen, J., C. and Bierman, M., P. 2005. Using manure and compost as nutrient sources for vegetable crops. University of Minnesota, Extension Service. 12 p.

Romero, J.L. 1997. Viveros forestales. Curso sobre mejoramiento genético forestal y plantaciones comerciales. CAMCORE. 5 p.

Rodríguez M., N., G. Alcántar G., A. Aguilar S., J. D. Etchevers B. and J. A. Santizo R. 1998. Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate mediante un medidor portátil de clorofila. *Terra* 16: 135-141.

SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2005. Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y

Pesquera (SIAP). Sistema de información agropecuaria de consulta (SIACON). Versión 1.1. México, D. F.

Salazar, A. H. C. 1999. La importancia de la creación de un programa nacional de agricultura orgánica. Memorias del IV Foro Nacional sobre Agricultura Orgánica. Colegio de Postgraduados, 8 al 10 de noviembre de 1999. Colegio de Postgraduados, Universidad Autónoma Chapingo y Consejo Nacional Regulador de Agricultura Orgánica.

Saeker, B.C., Rahim, M.A. 2012. Effects of doses and splits of fertilizer application on harvesting time, yield and quality of mango cv. Amrapali. Bangladesh Journal of Agricultural Research. 37: 279-293.

Salisbury F. B. y C. W. Ross. 1994. Fisiología vegetal. Grupo Editorial Iberoamericano S. A: de C. V. México.

Santos, B.M. 2007. Effects of adding compost to fertilization programs on 'Keiit' mango. Journal of Agronomy. 6: 382-234.

Salisbury, F.B. y C.W. Ross (eds.). 2000. Fisiología de las plantas 1. Células: agua, soluciones y superficies. Editorial Paraninfo Thomson Learning, Madrid.

SAS Institute Inc. 2007. SAS OnlineDoc® 9.2. Cary, NC: SAS Institute Inc.

Salgado, L., Alcantar, G., Sandoval, M., Muratalla, A., 2013. Requerimiento de nitrógeno en la producción de Stevia rebaudiana Bertoni en hidroponía e invernaderos. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillos, México.

Seema, T. 2010. Stevia rebaudiana: A medicinal and nutraceutical plant and sweet gold for diabetic patients. International Journal of Pharmacy Life Sciences, 1: 451–457.

Sivaram, L., y Mukundam, U. 2003. In vitro culture studies on Stevia rebaudiana. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant, 39: 520–523.

Suga, T. y T. Endo. 1991. Geranyl diphosphate synthase in leaves of *Pelargonium roseus*. *Phytochem.* 30(6), 1757-1761.

Shi, Q., Kumar, A., & Kutowi, O. 2000. Membrane-base separation scheme for processing sweeteners from *Stevia* leaves. *Food Research International*, 33: 617–620.

Singh, S., y Rao, G. 2005. *Stevia*: The herbal sugar of 21st Century. *Sugar Tech*, 71: 17–24.

Shibata H, Sawa Y, Oka T. 1995. Steviol and steviol-glycoside: Glucosyltransferase activities in *Stevia rebaudiana* Bertoni—Purification and partial characterization. *Arch Biochem Biophys* 321(2):390–396.

Soejarto, D. D., Compadre, C. M., Medon, P. J., Kamath, S. K. and Kinghorn, A. D. 1983. Potential sweetening agents of plant origin. II. Field search for sweet-tasting *Stevia* species. *Econ. Bot.* 37:71 79.

Soejarto, D. 2002. Botany of *Stevia* and *Stevia rebaudiana*. In A. Kinghorn (Ed.), *Stevia: The genus Stevia* London, New York: Taylor and Francis. pp. 18–39.

Soto, G. y Muñoz, C. 2002. Consideraciones teóricas y prácticas sobre el compost y su empleo en la agricultura orgánica. *Manejo Integrado de Plagas*. Costa Rica. 65:123-129.

Shock, C. 1982. Experimental cultivation of Rebaudi's stevia in California. University of California – Davis, Agronomy Progress Report, April pp. 122.

Tackett, J., L. y Pearson, R. 1964. Oxygen requirements of cotton seedling roots for penetration of compacted soil ceres. *Soil Science. Society American Proceedings*, 28:600-605.

Tavarini, S., Angelini, L.G., 2013. *Stevia rebaudiana* Bertoni as a source of bioactive compounds: the effect of harvest time, experimental site and crop steviol

glycoside content and antioxidant properties. *Journal Science Food Agricola*. 93:2121–2129.

Tavarini, S., Angelini, L.G., 2014. Crop productivity, steviol glycoside yield, nutrient concentration and uptake of *Stevia rebaudiana* Bert. Under mediterranean field conditions. *Soil Science and Plant Analysis*, 45:2577–2592.

Terés, V.; Arrieta, V. and Rozas, M. 1995. A method for evaluation of fair volume in substrates. *Acta Horticulturae*, 401:41-48.

Trinidad Santos 1987, El uso de abonos orgánicos en la producción agrícola. Serie de cuadernos, Centro Edafología, Colegio de Postgraduados, Chapingo México.

Trinidad, S. A. 1999. El papel de los abonos orgánicos en la productividad de los suelo. *Lombricultura y Abonos orgánicos*. Simposium Internacional y Primera Reunión Nacional. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Unidad de Identificación de Mercados. Chapingo, México. 3-16.

Tourat, A. P. 2000. Time for compost tea in the northwest. *Bio Cycle* 41: 74-77

Vázquez B., L. 2012. Cultivo In vitro de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados, Texcoco, México. 76 p.

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. *Pesquicia Agropecuária Brasileira*. 34(6):1039-1043.

Vani, T., Rajani, M., Sarkar, S., y Shishoo, C. 1997. Antioxidant properties of the ayurvedic formulation triphala and its constituents. *International Journal of Pharmacognosy*, 35: 313–317.

Wallach, R.; da Silva, F., F. and Chen, Y. 1992. Hydraulic Characteristics of tuff (scoria) used as a container medium. *Journal of America Society Horticultural Science*.

Westerman, L. Baird, V. Chistensen, W. Fixen, E. Whitney, A. 1990. Soil testing and Plant Analysis. The Soil Science of America. Inc. Madison, Wiaconsin, USA.

White, P. y M. Broadley. 2003. Calcium in plants. *Ann. Bot.* 92: 487-511.

WHO 2007. Report of a Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation on Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition 2002: Geneva, Switzerland. Technical Report Series; No. 935.

Wolwer-Rieck, U., Lankes, C., Wawrzun, A., Wust, M. 2010. Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. *Food technology* 231:581-588.

Wolwer-Rieck, U., 2012. The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituent sand the analyses thereof: a review. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 60: 886–895.

Xiangyang L., Guangxi R., Yan S., 2011. The effect of organic manure and chemical fertilizer on growth and development of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Energy Procedia* 5: 1200–1204.

Yadav, A.K., Singh, S., Dhyani, D., Ahuja, P.S., 2011. A review on the improvement of *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Canadian Journal Plant Science*. 91: 1–27.

Yang J., Xiangyang L., Yan S. 2013. Effect of Different Mixed Fertilizer on Yield, Quality and Economic Benefits in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Food Science and Technology* 5: 588-591.

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, 2014).

IX. Anexos

Anexo A. Cálculos para el diseño de los 6 tratamientos.

1- Características de los abonos

Abono orgánico	Humedad	Tasa de Mineralización ¹	Concentración de nitrógeno
		%	
Gallinaza	73	36	2.14
Lombricompost	90	20	1.00

¹En base 4.8 meses

2- Dosis generadas

Dosis de nitrógeno	Gallinaza	Lombricompost
	g/maceta	
1	176	549
2	353	1099
4	706	2198

Anexo B. Resultados de análisis químicos de hojas.

Tratamientos	Nitrógeno	Fósforo	Potasio	Calcio	Magnesio	Hierro	Cobre	Manganeso	Zinc
	%				mg kg ⁻¹				
T1	2.42	0.20	3.34	1.90	0.57	167	58	434	48
T2	2.44	0.19	3.27	1.98	0.61	187	60	520	49
T3	2.88	0.27	3.57	1.95	0.63	159	39	857	50
T4	2.17	0.21	3.07	1.89	0.56	173	50	286	39
T5	2.32	0.22	3.28	1.71	0.59	183	34	398	38
T6	2.35	0.22	3.21	1.78	0.64	191	66	462	40

N = 4

Anexo C. Cálculo del modelo fenológico

DDT	Fechas	GDD												
1	29-may	15.0	16	13-jun	2.0	31	28-jun	2.6	46	13-jul	8.7	61	28-jul	12.0
2	30-may	11.6	17	14-jun	1.4	32	29-jun	6.2	47	14-jul	9.8	62	29-jul	5.0
3	31-may	7.9	18	15-jun	2.2	33	30-jun	5.6	48	15-jul	13.9	63	30-jul	6.7
4	01-jun	10.0	19	16-jun	11.3	34	01-jul	5.5	49	16-jul	7.7	64	31-jul	11.6
5	02-jun	9.0	20	17-jun	11.3	35	02-jul	5.6	50	17-jul	13.4	65	01-ago	5.7
6	03-jun	9.7	21	18-jun	5.4	36	03-jul	17.9	51	18-jul	10.7	66	02-ago	5.6
7	04-jun	8.2	22	19-jun	14.9	37	04-jul	11.7	52	19-jul	10.9	67	03-ago	2.6
8	05-jun	12.9	23	20-jun	11.0	38	05-jul	7.7	53	20-jul	9.2	68	04-ago	0.6
9	06-jun	8.8	24	21-jun	10.8	39	06-jul	10.3	54	21-jul	7.6	69	05-ago	0.0
10	07-jun	11.6	25	22-jun	9.3	40	07-jul	12.8	55	22-jul	7.4	70	06-ago	7.8
11	08-jun	0.7	26	23-jun	8.8	41	08-jul	7.9	56	23-jul	13.6	71	07-ago	6.4
12	09-jun	8.0	27	24-jun	11.9	42	09-jul	2.8	57	24-jul	12.6	72	08-ago	0.7
13	10-jun	6.0	28	25-jun	9.9	43	10-jul	12.0	58	25-jul	9.8	73	09-ago	1.2
14	11-jun	2.5	29	26-jun	10.1	44	11-jul	10.2	59	26-jul	8.9			
15	12-jun	3.1	30	27-jun	11.4	45	12-jul	7.1	60	27-jul	11.5			

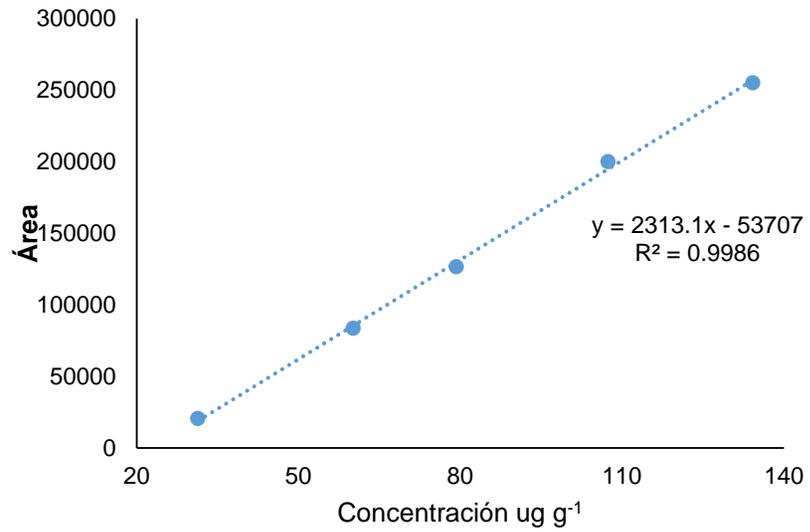
DDT (Días después del trasplante)

Anexo D. Cálculo de riego

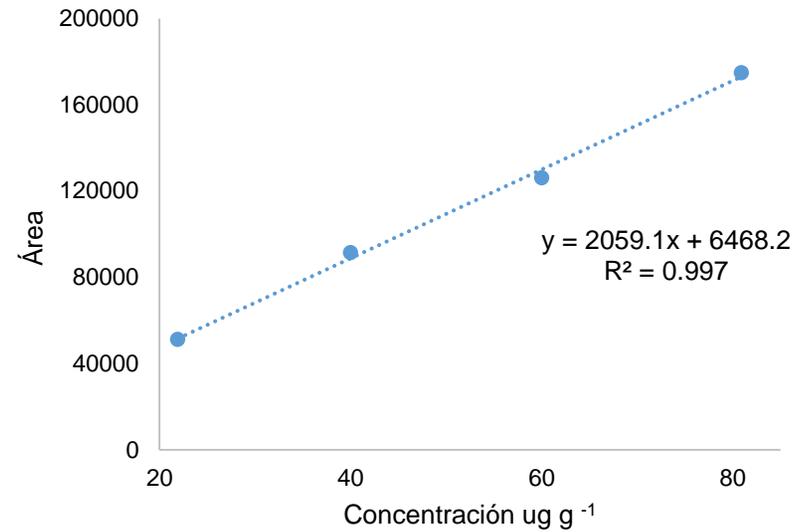
DDT	Fecha	Agua evaporada												
1	29-may	0.2	16	13-jun	0.2	31	28-jun	0.2	46	13-jul	0.1	61	28-jul	0.3
2	30-may	0.3	17	14-jun	0.2	32	29-jun	0.2	47	14-jul	0.1	62	29-jul	0.3
3	31-may	0.2	18	15-jun	0.2	33	30-jun	0.3	48	15-jul	0.2	63	30-jul	0.2
4	01-jun	0.4	19	16-jun	0.1	34	01-jul	0.3	49	16-jul	0.2	64	31-jul	0.2
5	02-jun	0.1	20	17-jun	0.2	35	02-jul	0.1	50	17-jul	0.3	65	01-ago	0.1
6	03-jun	0	21	18-jun	0.1	36	03-jul	0.1	51	18-jul	0.3	66	02-ago	0.1
7	04-jun	0.2	22	19-jun	0.2	37	04-jul	0.2	52	19-jul	0.2	67	03-ago	0.1
8	05-jun	0.3	23	20-jun	0.2	38	05-jul	0.2	53	20-jul	0.2	68	04-ago	0.1
9	06-jun	0.3	24	21-jun	0.3	39	06-jul	0.2	54	21-jul	0.1	69	05-ago	0.2
10	07-jun	0.2	25	22-jun	0.3	40	07-jul	0.3	55	22-jul	0.1	70	06-ago	0.3
11	08-jun	0.2	26	23-jun	0.1	41	08-jul	0.3	56	23-jul	0.1	71	07-ago	0.3
12	09-jun	0.1	27	24-jun	0.1	42	09-jul	0.2	57	24-jul	0.1	72	08-ago	0.2
13	10-jun	0.1	28	25-jun	0.2	43	10-jul	0.2	58	25-jul	0.2	73	09-ago	0.2
14	11-jun	0.1	29	26-jun	0.2	44	11-jul	0.1	59	26-jul	0.2		Total	13.8
15	12-jun	0.1	30	27-jun	0.2	45	12-jul	0.1	60	27-jul	0.2			

DDT (Días después del trasplante)

Anexo E. Curvas de calibración de glucósidos



Curva esteviósido.



Curva de rebaudiosido A.

Anexo F. Verificación de la balanza analítica Sartorius TE214S.

Marco de pesas	
Pesas (mg)	Peso registrado g
10	0.0101
20	0.0208
30	0.0300
50	0.0499
100	0.1001
200	0.1999
300	0.2999
500	0.5000
1000	0.9999
2000	1.9999

Precisión de ± 0.1 mg

Anexo G. Resultados de los tratamientos del esteviósido y rebaudiosido A

Tratamientos y repeticiones	Abonos orgánicos								
	<u>Gallinaza</u>				<u>Lombricompost</u>				
	Esteviósido	CV(%) ¹	Reb. A	CV(%)		Esteviósido	CV(%)	Reb. A	CV(%)
T1R1	4.4	0.49	5.0	0.51	T4R1	6.4	0.79	3.5	0.39
T1R2	4.4	0.47	5.1	1.35	T4R2	8.7	0.79	4.3	0.15
T1R3	4.2	0.60	5.0	1.12	T4R3	6.9	1.17	4.2	0.34
T1R4	3.9	0.83	5.0	1.17	T4R4	7.1	0.27	4.0	0.05
T1 (promedio)	4.2	0.60	5.0	0.78	T4 (Promedio)	7.3	0.75	4.0	0.23
T2R1	4.1	0.29	3.9	0.55	T5R1	6.5	0.55	3.5	0.15
T2R2	3.3	0.10	3.3	1.78	T5R2	6.9	0.36	5.3	0.66
T2R3	3.7	0.88	3.6	1.12	T5R3	6.9	0.46	5.5	0.83
T2R4	4.1	0.16	4.0	0.97	T5R4	6.9	0.51	5.4	0.58
T2 (Promedio)	3.8	0.35	3.7	1.10	T5 (Promedio)	6.8	0.47	4.9	0.55
T3R1	5.8	0.34	2.8	0.56	T6R1	5.5	1.29	3.8	0.12
T3R2	6.0	0.99	2.8	1.16	T6R2	5.0	0.30	3.2	1.19
T3R3	5.0	0.61	2.5	0.23	T6R3	6.5	0.14	4.1	0.63
T3R4	5.6	0.61	2.8	0.74	T6R4	6.4	0.88	4.0	0.66
T3 (Promedio)	5.6	0.64	2.8	0.67	T6 (Promedio)	5.9	0.65	3.8	0.65

¹promedio de 3 inyecciones