



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN EDÁFICA, CRECIMIENTO
Y PRODUCCIÓN DE METABOLITOS
SECUNDARIOS EN *Stevia pilosa* y *S.
tomentosa***

JOSÉ CRUZ ROMERO FIGUEROA

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

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe José Cruz Romero Figueroa, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor ^{Dra. María de las Nieves Rodríguez Mendoza} Caracterización edáfica, crecimiento y producción de metabolitos secundarios en Stevia pilosa y S. tomentosa

y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 24 de Noviembre de 2017


Firma del
Alumno (a)


Dra. María de las Nieves Rodríguez Mendoza
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

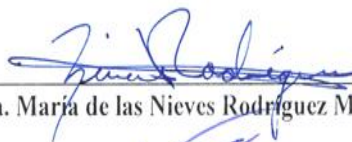
La presente tesis titulada: **CARACTERIZACIÓN EDÁFICA, CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN *Stevia pilosa* y *S. tomentosa***, realizada por el alumno: **José Cruz Romero Figueroa** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

Consejera



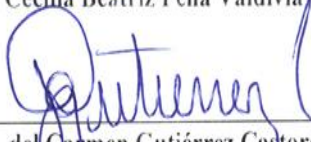
Dra. María de las Nieves Rodríguez Mendoza

Asesor



Dra. Cecilia Beatriz Peña Valdivia

Asesor



Dra. Ma. del Carmen Gutiérrez Castorena

Asesor



Dr. José Antonio Cueto Wong

Asesor



Dr. José Alberto Salvador Escalante Estrada

Montecillo, Texcoco, Estado de México, diciembre 2017

CARACTERIZACIÓN EDÁFICA, CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS *Stevia pilosa* Y *S. tomentosa*

José Cruz Romero Figueroa
Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

Stevia pilosa y *S. tomentosa* se han estudiado por sus metabolitos secundarios (MS) y distribución, pero sobre crecimiento y desarrollo *in situ* y *ex situ* se sabe poco. El objetivo fue determinar las condiciones edafoclimáticas y sistema de producción en el crecimiento y contenido de MS de *S. pilosa* y *S. tomentosa in situ* y en invernadero. Contrastando la hipótesis que en condiciones de clima semifrío, en suelo Luvisol y con producción orgánica favorecen el crecimiento y contenido de MS en *S. pilosa* y *S. tomentosa* en comparación con un Cambisol y producción mineral en invernadero. Las especies se localizaron e identificaron, el crecimiento y la concentración fitoquímica y nutrimental de plantas desarrolladas en Huasca de Ocampo (HO), Mineral del Chico (MCh) y Mineral del Monte (MM), estado de Hidalgo se determinaron. En invernadero, se propagaron las plantas, con sistemas de producción orgánica y órgano-mineral. Como fuente de nutrición se utilizó efluente, té de vermicompost y solución universal Steiner y fibra de coco y vermicompost como sustratos. Los resultados muestran que las especies que crecen en climas templados húmedos (MCh) presentan los valores más altos en crecimiento, específicamente en el área foliar; mientras que en climas secos hubo una acumulación de materia seca significativa en el último muestreo (HO). No se encontró efecto significativo del efluente y té de vermicompost sobre el crecimiento en las especies; pero, el efecto sí fue significativo en la concentración de terpenos totales con el estrés nutrimental que provocó el efluente de vermicompost en *S. pilosa*. Las diferencias en crecimiento, concentración fitoquímica y nutrimental se deben a las condiciones edafoclimáticas en las plantas de ambas especies. Las soluciones orgánicas no afectaron positivamente el crecimiento o la concentración nutrimental, pero sí incrementaron los terpenos. El efecto benéfico sobre el crecimiento, concentración química y nutrimental en ambas especies es mayor con más vermicompost.

Palabras clave: *S. pilosa*, *S. tomentosa*, *área foliar*, *terpenos*, *concentración nutrimental*, *materia seca*.

**SOIL CHARACTERIZATION, GROWTH AND PRODUCTION OF SECONDARY
METABOLITES *Stevia pilosa* and *S. tomentosa***

José Cruz Romero Figueroa
Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

Stevia pilosa and *S. tomentosa* have been studied because of secondary metabolites (MS) and its distribution, but on growth and development *in situ* and *ex situ* little is known. The objective of this study was to determine the soil and climatic conditions and the production system in the growth and MS content of *S. pilosa* and *S. tomentosa in situ* and greenhouse. Contrasting the hypothesis that semi-cold in conditions weather, soil Luvisol and with organic production it increase growth and content of MS in *S. pilosa* and *S. tomentosa* in comparison with a Cambisol and mineral production in the greenhouse. The species were located and identified; the growth and the phytochemical and nutritional concentration for plants grown in Huasca de Ocampo (HO), Mineral del Chico (MCh) and Mineral del Monte (MM), state of Hidalgo, were also determined. In the greenhouse, plants were propagated using organic production and organo-mineral systems. As a source of nutrition was used effluent, vermicompost and the universal nutrient solution Steiner and coconut fiber and vermicompost as substrates. The results show that the species that grow in temperate-humid climate (MCh) presented the highest values in growth, specifically in the leaf area; while in dry climates, there was a significant accumulation of dry matter in the last sampling (HO). A significant effect was not found for the effluent and vermicompost on the growth of the species; but, there was a significant effect in the concentration of totals terpenes because of the nutritional stress caused by the effluent of vermicompost in *S. pilosa*. The differences in growth, concentration phytochemical and nutritional status are due to the edaphoclimatic conditions in the plants of both species. Organic solutions did not affect positively the growth or nutrient concentration, but increased the terpenes. The beneficial effect on growth, nutritional and chemical concentration in both species is greater with major levels of vermicompost.

Keywords: *S. pilosa*, *S. tomentosa*, leaf area, terpenes, nutrient concentration, dry matter.

DEDICATORIA

JOSÉ ROMERO SALES (†)

CARLOS GONZÁLEZ FLORES (†)

CARLOS MANUEL GONZÁLEZ SOLANO (†)

A mis hijas Itzel e Itzury

Fuentes de amor, inspiración, motivación y lucha

A mi esposa Karla Daniela con mucho amor

Por formar parte de mi vida

A mis dos madres: Estela Romero Figueroa y Juventina Figueroa Arce

Por brindarme su amor y ser ejemplo de superación cada día

A mis hermanos melosos: Kary y Toorito

Gracias por su cariño

A la Familia González Solano

Por todo su apoyo brindado al integrarme a su familia y ser ejemplo de tenacidad

A mis primos y primas: Lupita, Juan José, Pablo, Paco, Uriel. **A mis tíos y tías:**

Juan, Mariano, Rafaela, Lucía, en especial a mi tía Naty, Luz maría y Laureano
gracias por creer en mí

A mis sobrinos y sobrinas: Alejandra (Erizo), Manuel, Gustavo, Brisia y

Dianita

A mis cuñadas: Magui, July y Diana

A mi cuñado: Lorenzo

A mi concuño: Román Gervasio

La primera vez que me vi paralizado por el miedo:

Fue en el examen de la licenciatura, un examen para el que me había preparado lo suficiente. Todavía recuerdo el momento en que entré en el aula con una intensa sensación de ansiedad, depresión y estrés. Había estado en aquella sala muchas veces pero aquella mañana no vi nada más allá de las ventanas y tampoco puedo decir que prestara la menor atención al aula. Mientras caminaba hacia una silla situada junto a la puerta, mi vista permanecía clavada en el suelo, y de pronto el jurado examinador, la ansiedad atenazaba el fondo de mi estómago y escuché con toda nitidez el sonido de los latidos de mi corazón.

Bastó con echar un rápido vistazo a las personas que me acompañaban para darme cuenta de que no tenía la menor alternativa. Durante 30 minutos permanecí con la vista clavada en aquellas diapositivas, mientras mi mente no dejaba de dar vueltas a lo que seguía después. Los mismos pensamientos se repetían una y otra vez, como si se tratara de un interminable tiovivo de miedo y temblor. Yo estaba completamente inmóvil, como un animal por el curare. Lo que más me sorprendió de aquel angustioso lapso fue lo encogida que se hallaba mi mente. Durante aquellas dos horas no hice el menor intento de pergeñar algo que se asemejara a una respuesta, ni siquiera ensoñaba, simplemente me hallaba atenazado por el miedo, esperando que mi tormento llegara a su fin.

El protagonista de este relato de terror soy yo mismo...

Tomado de Daniel Goleman

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo brindado para realizar mis estudios de Doctorado; así como también a todos (as) los (as) profesores (as) investigadores (as) del Colegio de Postgraduados, en especial al Postgrado en Edafología por compartir sus experiencias, conocimientos y contribuir en mi formación profesional.

A mi consejo particular: Dra. Rodríguez Mendoza María de las Nieves, Dra. Peña Valdivia Cecilia Beatriz, Dra. Gutiérrez Castorena Ma. del Carmen., Dr. Cueto Wong José Antonio, y Dr. Escalante Estrada José Alberto Salvador, quienes incondicionalmente compartieron sus conocimientos y me guiaron con profesionalismo sin escatimar tiempo, esfuerzo y principalmente paciencia. Por eso, este logro también es en buena parte de ustedes. Muchas gracias.

A los Doctores Ortiz Solorio Carlos A. y Gutiérrez Castorena Ma. del Carmen por compartir sus valiosas experiencias y conocimientos del sistema Suelo.

Agradezco el apoyo brindado en los laboratorios de: Nutrición Vegetal, Fitoquímica, Génesis, Micromorfología y Clasificación de Suelos y Ecofisiología vegetal.

A los Doctores Trejo Téllez L., Soto Hernández M. y en especial al Maestro Patricio Sánchez Guzmán, gracias por todo el apoyo y la ayuda en superar los inconvenientes principalmente los reactivos.

A los laboratoristas Juan Manuel, Roberto, Don Pedro, Juan, Sr. Domingo, al M.C. Rubén. Al encargado del área de agroecología Fernando López Santillán, que sin ningún pretexto me brindaron su apoyo.

A las secretarías del área de: nutrición vegetal Laura Santamaría, área de génesis Carmelita y de la Coordinación de Edafología Sra. Remedios y Sra. Gela.

Al personal del Departamento de Documentación y Biblioteca.

A los grandes amigos Omar, Rigo, Irving, Erick, en especial al amigo Edgar.

A todos aquellos que de alguna manera contribuyeron en esta etapa y que por mi mala memoria pueda omitir.

CONTENIDO

	pag
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE CUADROS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general.....	3
2.2 Objetivos particulares.....	3
III. HIPÓTESIS	4
3.1 Hipótesis general.....	4
3.2 Hipótesis particulares.....	4
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	5
4.1 Generalidades.....	5
4.1.1 Familia Asteraceae.....	5
4.1.2 Características morfológicas de la familia Asteracea.....	5
4.1.3 Usos de la familia Asteracea.....	6
4.1.4 Química de la familia Asteracea.....	6
4.1.5 Género <i>Stevia</i>	6
4.1.6 Componentes químicos y actividad biológica del género <i>Stevia</i>	7
4.1.6.1 <i>Stevia pilosa</i>	8
4.1.6.2 <i>Stevia tomentosa</i>	9
4.1.6.3 Otros compuestos fitoquímicos de los Géneros de <i>Stevia</i>	9
4.2 Distribución geográfica de <i>S. pilosa</i> y <i>S. tomentosa</i>	10
4.3 Análisis de crecimiento.....	11
4.4 Estado nutrimental.....	13
4.5 Sistemas de producción orgánica.....	14
V. MATERIALES Y METODOS	17

5.1 Identificación de <i>S. pilosa</i> y <i>S. tomentosa</i> en tres ecosistemas del estado de Hidalgo.....	17
5.1.1 Localización de los sitios de muestreo.....	17
5.1.2 Identificación taxonómica.....	18
5.1.3 Monitoreo de las especies.....	20
5.1.4 Variables evaluadas.....	20
5.1.4.1 Campo.....	20
5.1.4.2 Variables de crecimiento vegetal.....	21
5.1.5 Diseño experimental.....	22
5.1.6 Análisis estadístico.....	23
5.2 Soluciones nutritivas y desarrollo de <i>S. pilosa</i> y <i>S. tomentosa</i> en invernadero.....	23
5.2.1 Propagación y producción de almácigos.....	23
5.2.2 Trasplante.....	23
5.2.3 Sustrato y contenedor.....	23
5.2.4 Diseño de tratamientos y experimental.....	23
5.2.5 Variables evaluadas.....	24
5.2.6 Análisis estadístico.....	24
5.3 Análisis de crecimiento de <i>S. pilosa</i> y <i>S. tomentosa</i> en sustratos orgánicos.....	24
5.3.1 Propagación.....	24
5.3.2 Trasplante.....	24
5.3.3 Materiales orgánicos y condiciones del invernadero.....	25
5.3.4 Diseño experimental.....	25
5.3.5 Variables evaluadas.....	26
5.3.6 Análisis estadístico.....	26
5.4 Determinación de perfil químico de <i>S. pilosa</i> y <i>S. tomentosa</i> desarrolladas <i>in situ</i> e invernadero.....	27
5.4.1 Material vegetal.....	27
5.4.2 Análisis preliminar de compuestos principales.....	27
5.4.3 Cuantificación de metabolitos secundarios.....	29

5.4.4 Análisis estadístico y diseño experimental.....	29
5.5 Evaluación nutrimental de <i>S. pilosa</i> y <i>S. tomentosa</i> desarrolladas <i>in situ</i> e invernadero.....	30
5.5.1 Material vegetal.....	30
5.5.2 Análisis de laboratorio.....	30
5.5.3 Análisis estadístico y diseño experimental.....	30
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
6.1 Identificación de <i>S. pilosa</i> y <i>S. tomentosa</i> en diferentes ambientes del estado de Hidalgo.....	31
6.1.1 Descripción del material vegetal.....	31
6.1.2 Descripción climatológica y características del suelo.....	32
6.1.3 Semejanzas y diferencias morfológicas de <i>S. pilosa</i> y <i>S. tomentosa</i> en función del ambiente.....	44
6.1.4 <i>S. pilosa</i> , crecimiento e índices de eficiencia fisiológica.....	46
6.1.5 <i>S. tomentosa</i> , crecimiento e índices de eficiencia fisiológica.....	56
6.2 Efecto de las soluciones nutritivas en el desarrollo de <i>S. pilosa</i> y <i>S. tomentosa</i> en invernadero.....	67
6.3 Efecto de sustratos orgánicos en el crecimiento de <i>S. pilosa</i> y <i>S. tomentosa</i>	71
6.3.1 Análisis de componentes principales.....	71
6.3.2 Componente del crecimiento.....	75
6.3.3 Eficiencia fotosintética.....	80
6.3.4 Masa foliar.....	86
6.4 Concentración química.....	88
6.4.1 Análisis preliminar fitoquímico.....	88
6.4.2 Concentración química de especies de <i>Stevia</i> bajo condiciones <i>in situ</i>	95
6.4.3 Metabolitos secundarios de especies de <i>Stevia</i> cultivadas con soluciones nutritivas en invernadero.....	98
6.4.4 Metabolitos secundarios de especies de <i>Stevia</i> cultivadas en dependencia de la cantidad de vermicompost como sustrato en invernadero.....	100
6.5 Composición nutrimental.....	102

6.5.1 Composición nutrimental en especies de <i>Stevia</i> bajo diferentes condiciones edafoambientales.....	102
6.5.2 Contenido nutrimental en especies de <i>Stevia</i> cultivadas bajo diferentes soluciones nutritivas en invernadero.	107
6.5.3 Contenido nutrimental de <i>Stevia</i> bajo diferentes porcentajes de vermicompost como sustrato en invernadero.....	112
VII. CONCLUSIONES.	119
VIII. LITERATURA CITADA	120

LISTA DE CUADROS

	pag.
Cuadro 1. Especies estudiadas en México.....	9
Cuadro 2. Metodología utilizada en la determinación de componentes fitoquímicos principales.....	28
Cuadro 3. Prueba, fase móvil y revelador en cromatografía en capa fina.....	28
Cuadro 4. Descripción morfológica de <i>S. pilosa</i> y <i>S. tomentosa</i> en la reserva natural el Hiloche.	32
Cuadro 5. Condiciones climatológicas de los sitios de recolecta en <i>S. pilosa</i> y <i>S. tomentosa</i> en Hidalgo.	34
Cuadro 6. Caracterización morfológica de un perfil de suelo en la Reserva Natural el Hiloche, Mineral del Monte, Hidalgo.....	36
Cuadro 7. Caracterización morfológica del perfil de suelo en el Zembo, Huasca de Ocampo, Hidalgo.	37
Cuadro 8. Caracterización morfológica de un perfil de suelo en San Sebastian, Mineral del Chico, Hidalgo.	39
Cuadro 9. Propiedades físicas de los tres sitios de recolecta en el Estado de Hidalgo...	41
Cuadro 10. Propiedades químicas de los tres sitios de recolecta en Hidalgo.	43
Cuadro 11. Significancia estadística de las especies de <i>Stevia</i> , soluciones nutritivas y la interacción de éstas en las variables de crecimiento.	67
Cuadro 12. Efecto de la solución nutritiva sobre altura, longitud radical y diámetro del tallo en especies de <i>Stevia</i>	68
Cuadro 13. Efecto de la solución nutritiva sobre la concentración de nitratos, potasio y calcio en extracto de tallos y área foliar en especies de <i>Stevia</i>	69
Cuadro 14. Efecto de la solución nutritiva sobre altura, longitud radical y diámetro del tallo en especies de <i>Stevia</i>	70
Cuadro 15. Vectores propios para las variables respuesta de dos especies de <i>Stevia</i> en función de la proporción de vermicompost.	72

Cuadro 16. Significancia estadística para las variables con mayor peso en tres componentes principales en la producción de <i>Stevia</i> en función de la proporción de vermicompost.	73
Cuadro 17. Medias de las variables con mayor peso de los primeros tres componentes principales en función de los tratamientos.	74
Cuadro 18. Análisis preliminar fitoquímico con el extracto acuoso obtenido de plantas de <i>S. pilosa</i> y <i>S. tomentosa</i>	89
Cuadro 19. Análisis preliminar fitoquímico con el extracto hexánico obtenido de plantas de <i>S. pilosa</i> y <i>S. tomentosa</i>	89
Cuadro 20. Análisis preliminar fitoquímico con el extracto diclorometano obtenido de plantas de <i>S. pilosa</i> y <i>S. tomentosa</i>	90
Cuadro 21. Análisis preliminar fitoquímico con el extracto metanólico obtenido de plantas de <i>S. pilosa</i> y <i>S. tomentosa</i>	90
Cuadro 22. Significancia estadística del análisis de varianza en las concentraciones químicas de las especies de <i>Stevia</i> en función del sitio de muestreo.....	95
Cuadro 23. Significancia estadística del análisis de varianza en las concentraciones químicas de las especies de <i>Stevia</i> en función del sitio de muestreo.....	98
Cuadro 24. Significancia estadística del análisis de varianza de la concentración de metabolitos secundarios en plantas de <i>Stevia</i>	100
Cuadro 25. Significancia estadística del análisis de varianza de la concentración nutrimental en plantas de <i>Stevia</i> en función del sitio.....	103
Cuadro 26. Significancia estadística del análisis de varianza de la concentración nutrimental en plantas de <i>Stevia</i> en función de la solución nutritiva.....	108
Cuadro 27. Significancia estadística del análisis de varianza de la concentración nutrimental en plantas de <i>Stevia</i> en función del % de vermicompost.....	112

LISTA DE FIGURAS

	pag
Figura 1. Localización de los sitios de muestreo.....	18
Figura 2. Dinámica de la altura (A) y diámetro del tallo (B) en <i>S. pilosa</i> en función del tiempo. HO; Huasca de Ocampo, MCh; Mineral del Chico, MM; Mineral del Monte.....	47
Figura 3. Dinámica en el número de hojas (A) y área foliar (B) en <i>S. pilosa</i> en función del tiempo. HO; Huasca de Ocampo, MCh; Mineral del Chico, MM; Mineral del Monte.....	48
Figura 4. Dinámica de peso seco de hojas (A) y tallos (B) en <i>S. pilosa</i> en función del tiempo. HO; Huasca de Ocampo, MCh; Mineral del Chico, MM; Mineral del Monte.....	50
Figura 5. Tasa relativa (A) y absoluta (B) de crecimiento en plantas de <i>S. pilosa</i> durante el crecimiento en tres sitios del estado de Hidalgo. HO; Huasca de Ocampo, MCh; Mineral del Chico, MM; Mineral del Monte.....	52
Figura 6. Tasa de asimilación neta (A) y área foliar específica (B) de crecimiento en plantas de <i>S. pilosa</i> durante el crecimiento en tres sitios del estado de Hidalgo. HO; Huasca de Ocampo, MCh; Mineral del Chico, MM; Mineral del Monte...	54
Figura 7. Razón de área foliar (A) y relación de peso foliar (B) en plantas de <i>S. pilosa</i> durante el crecimiento en tres sitios del estado de Hidalgo. HO; Huasca de Ocampo, MCh; Mineral del Chico, MM; Mineral del Monte.....	55
Figura 8. Altura (A) y diámetro (B) en tallos de <i>S. tomentosa</i> durante el crecimiento en tres sitios del estado de Hidalgo. HO; Huasca de Ocampo, MCh; Mineral del Chico, MM; Mineral del Monte.	58
Figura 9. Número de hojas (A) y área foliar (B) en <i>S. tomentosa</i> durante el crecimiento en tres sitios del estado de Hidalgo. HO; Huasca de Ocampo, MCh; Mineral del Chico, MM; Mineral del Monte.....	59
Figura 10. Materia seca de hojas (A) y tallo (B) durante el crecimiento de <i>S. tomentosa</i> en tres sitios del estado de Hidalgo. HO; Huasca de Ocampo, MCh; Mineral del Chico, MM; Mineral del Monte.....	61

Figura 11. Tasa relativa (A) y absoluta (B) de crecimiento de plantas de <i>S. tomentosa</i> durante el crecimiento en tres sitios del estado de Hidalgo. HO; Huasca de Ocampo, MCh; Mineral del Chico, MM; Mineral del Monte.....	63
Figura 12. Tasa de asimilación neta (A) y área foliar específica (B) en <i>S. tomentosa</i> durante el crecimiento en tres sitios del estado de Hidalgo. HO; Huasca de Ocampo, MCh; Mineral del Chico, MM; Mineral del Monte.....	65
Figura 13. Razón de área foliar (A) y relación de peso foliar (B) en <i>S. tomentosa</i> durante el crecimiento en tres sitios del estado de Hidalgo. HO; Huasca de Ocampo, MCh; Mineral del Chico, MM; Mineral del Monte.....	66
Figura 14. Dinámica del número de hojas en plantas de <i>S. pilosa</i> (A) y <i>S. tomentosa</i> (B) en función de la proporción fibra de coco:vermicompost y el tiempo de muestreo.	76
Figura 15. Dinámica del área foliar en plantas de <i>S. pilosa</i> (A) y <i>S. tomentosa</i> (B) en función de la proporción fibra de coco:vermicompost y el tiempo de muestreo.....	77
Figura 16. Dinámica del peso seco de hojas en plantas de <i>S. pilosa</i> (A) y <i>S. tomentosa</i> (B) en función de la proporción fibra de coco:vermicompost y el tiempo de muestreo.	78
Figura 17. Dinámica del peso seco de tallos en plantas de <i>S. pilosa</i> (A) y <i>S. tomentosa</i> (B) en función de la proporción fibra de coco:vermicompost y el tiempo de muestreo.	79
Figura 18. Dinámica de pesos secos de raíz en plantas de <i>S. pilosa</i> (A) y <i>S. tomentosa</i> (B), en función de la proporción fibra de coco:vermicompost y el tiempo de muestreo.	81
Figura 19. Dinámica de la tasa relativa de crecimiento en plantas de <i>S. pilosa</i> (A) y <i>S. tomentosa</i> (B), en función de la proporción fibra de coco:vermicompost y el tiempo de muestreo.	82
Figura 20. Dinámica del área foliar específica en plantas de <i>S. pilosa</i> (A) y <i>S. tomentosa</i> (B), en función de la proporción fibra de coco:vermicompost y el tiempo de muestreo.....	84

Figura 21. Dinámica de la razón de área foliar en plantas de <i>S. pilosa</i> (A) y <i>S. tomentosa</i> (B), en función de la proporción fibra de coco:vermicompost y el tiempo de muestreo.....	85
Figura 22. Dinámica de la relación de peso foliar en plantas de <i>S. pilosa</i> (A) y <i>S. tomentosa</i> (B), en función de la proporción fibra de coco:vermicompost y el tiempo de muestreo.	89
Figura 23. Prueba para alcaloides en cromatografía en capa fina con diclorometano (derecha) y metanol (Izquierda).	91
Figura 24. Prueba para fenoles en cromatografía en capa fina con diclorometano (Izquierda) y metanol (Derecha) Círculos muestran el desplazamiento del estándar.	92
Figura 25. Prueba para terpenoides en cromatografía en capa fina con diclorometano (Izquierda) y metanol (Derecha).	92
Figura 26. Prueba para flavonoides en cromatografía en capa fina con diclorometano (Derecha) y metanol (Izquierda).	93
Figura 27. Curva estándar de ácido gálico para análisis de compuestos fenólicos.....	93
Figura 28. Curva estándar de quercetina para análisis de flavonoides.....	94
Figura 29. Curva estándar de ácido masticadienoico para análisis de triterpenos.....	94
Figura 30. Concentración química en plantas de <i>S. pilosa</i> (A) y <i>S. tomentosa</i> (B), en función del porcentaje de saturación de bases <i>in situ</i>	97
Figura 31. Concentración química en plantas de <i>S. pilosa</i> (A) y <i>S. tomentosa</i> (B), en función de la solución nutritiva en invernadero.....	99
Figura 32. Concentración química en plantas de <i>S. pilosa</i> (A) y <i>S. tomentosa</i> (B), en función del porcentaje de vermicompost como sustrato en invernadero.....	101
Figura 33. Extracción de macro-nutrientes (N-P-K-Ca-S) en plantas de <i>S. pilosa</i> (A) y <i>S. tomentosa</i> (B), en función del porcentaje de saturación de bases <i>in situ</i>	104
Figura 34. Extracción de micro-nutrientes (Fe-Zn-Mn-Mo) en plantas de <i>S. pilosa</i> (A) y <i>S. tomentosa</i> (B), en función del porcentaje de saturación de bases <i>in situ</i>	105
Figura 35. Extracción de micro-nutrientes (B-Na-Cu-Ni) en plantas de <i>S. pilosa</i> (A) y <i>S. tomentosa</i> (B), en función del porcentaje de saturación de bases <i>in situ</i>	106

Figura 36. Extracción de macro-nutrientes (N-P-K-Ca-S) en plantas de <i>S. pilosa</i> (A) y <i>S. tomentosa</i> (B) cultivadas bajo diferentes soluciones nutritivas en invernadero.	109
Figura 37. Extracción de micro-nutrientes (Fe-Zn-Mn-Mo) en plantas de <i>S. pilosa</i> (A) y <i>S. tomentosa</i> (B) cultivadas bajo diferentes soluciones nutritivas en invernadero.....	110
Figura 38. Extracción de micro-nutrientes (B-Na-Cu-Ni) en plantas de <i>S. pilosa</i> (A) y <i>S. tomentosa</i> (B) cultivadas bajo diferentes soluciones nutritivas en invernadero.	111
Figura 39. Extracción de macro-nutrientes (N-P-K-Ca-Mg-S) en plantas de <i>S. pilosa</i> (A) y <i>S. tomentosa</i> (B) cultivadas bajo diferentes porcentajes de vermicompost como sustrato en invernadero.....	114
Figura 40. Extracción de micro-nutrientes (Fe-Zn-Mn-Mo) en plantas de <i>S. pilosa</i> (A) y <i>S. tomentosa</i> (B) cultivadas bajo diferentes porcentajes de vermicompost como sustrato en invernadero.....	116
Figura 41. Extracción de micro-nutrientes (B-Cu-Na-Ni) en plantas de <i>S. pilosa</i> (A) y <i>S. tomentosa</i> (B) cultivadas bajo diferentes porcentajes de vermicompost como sustrato en invernadero.	118

I. INTRODUCCIÓN

El uso de plantas con propiedades medicinales data de épocas muy antiguas, en donde el conocimiento que dominaba era el empírico o ensayo y error; sin embargo, se desconocía el principio activo. Muchos investigadores, se han centrado en determinar los metabolitos de las plantas se estima que de unas 20,000 especies se han extraídos diversos metabolitos secundarios, los cuales son utilizados como principios activos en muchos medicamentos en el mundo. En tiempos ancestrales las plantas de *Stevia* eran utilizadas en las festividades tradicionales de muertos; además, en el tratamiento de dolores estomacales y emplasto para dolores articulares por su potencial farmacéutico. Sin embargo, la adopción de nuevas especies herbolarias está provocando el abandono y la desaparición de especies de *Stevia* locales (Álvarez, 2005).

Las propiedades antitumorales y cancerosas en especies de *Stevia* se han descubierto. Los principales metabolitos que actúan son: terpenos, longipinanos y lactonas sesquiterpénicas. Los sesquiterpenos son los componentes típicos más abundantes de las plantas, están en el vástago y las raíces. *S. pilosa* Lag. contiene un compuesto en el vástago, conocido como leukodina. De las raíces de *S. tomentosa* H. B. K. se aislaron friedelanol, sitosterol y estigmasterol (Álvarez, 2005; Pérez, 2006; Valdez–Calderón, 2011). Los diterpenos derivados del ent-kaureno son glucósidos dulces característicos de *S. rebaudiana* Bertoni; esta es la única especie con principios edulcorantes en las hojas (Muanda *et al.*, 2011). Los productos químicos de las especies de *Stevia* se han documentado, pero lo referente a su desarrollo se conoce poco.

Los terpenos son un grupo de fitoquímicos importante en el género *Stevia*, que han mostrado beneficios para la salud con propiedades antioxidantes, analgésicas, antipiréticas, antiinflamatorias, antirreumáticas, antiinfecciosas, entre otras (Cariño–Cortés *et al.*, 2002; Álvarez, 2005). A pesar

de la amplia capacidad de adaptación de las especies de *Stevia*, no se ha reportado sí la cantidad de metabolitos secundarios dependen en gran medida de las condiciones ambientales, nutrición, disponibilidad de humedad, plagas y enfermedades. Las condiciones climáticas, la falta de nutrientes y déficit de agua, pueden restringir el crecimiento de las plantas y reducir la velocidad fotosintética, en caso contrario, puede ocurrir un aumento en la síntesis de sustancias de defensas como los compuestos fenólicos y flavonoides, lo cual puede inhibir la producción de metabolitos secundarios de interés, caso particular terpenos, debido a los factores abióticos y bióticos (Iloki – Assanga *et al.*, 2013; Chacón *et al.*, 2013; Chávez-Mendoza y Sánchez, 2017)

Por otro parte, el uso de vermicompost, la aplicación de tés o extractos y efluentes de vermicompost, favorecen el crecimiento y desarrollo de hortalizas, frutales, cereales y leguminosas, debido a su contenido de microorganismos benéficos y para mejorar el estado nutrimental de la planta. Investigaciones (Nikbakht *et al.*, 2008; Ochoa-Martínez *et al.*, 2009; Patil, 2010; Borda, 2011) han demostraron la importancia de las prácticas agronómicas orgánicas para incrementar rendimientos en *S. rebaudiana*, pero en lo correspondiente a las demás especies existe poca o nula información sobre su propagación, crecimiento y desarrollo *in situ* y *ex situ* en función del ambiente.

Las condiciones climáticas y fisiográficas diversas en la Sierra de Pachuca (Hidalgo, México) propicia la presencia de especies de *Stevia*, como *S. eupatoria*, *S. hirsuta* DC. Var *hirsuta*, *S. iltisiana*, *S. jorullensis*, *S. latifolia*, *S. lucida*, *S. micrantha*, *S. aff. monardifolia*, *S. monardifolia*, *S. nepetifolia*, *S. ovata*, *S. ovata* var. *ovata*, *S. pilosa*, *S. porphyrea*, *S. purpusii*, *S. rhombifolia* var. *typica*, *S. saücifolia*, *S. salicifolia* var. *salicifolia*, *S. serrata*, *S. tephra* y *S. tomentosa* (Manitto, 1981). La composición química parcial de diez de estas especies se ha descrito (Hernández *et al.*, 1998; Álvarez-García *et al.*, 2005).

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Identificar las condiciones edafoclimáticas y sistema de producción en el crecimiento y contenido de metabolitos secundarios de *S. pilosa* y *S. tomentosa in situ* y en invernadero.

2.2 Objetivos particulares

- Analizar y comparar el crecimiento y desarrollo de plantas de dos especies de *Stevia* silvestre en tres sitios del estado de Hidalgo.
- Determinar la capacidad de adaptación y crecimiento de dos especies de *Stevia* silvestres en producción orgánica y órgano-mineral en invernadero.
- Comparar la concentración de metabolitos secundarios de dos especies de *Stevia* silvestre desarrolladas *in situ* e invernadero.

III. HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis general

- Suelo Luvisol, clima semifrío y producción orgánica favorecen el crecimiento y contenido de metabolitos secundarios en *S. pilosa* y *S. tomentosa* en comparación con Cambisol y producción mineral en invernadero.

3.2 Hipótesis particulares

- El crecimiento y desarrollo de las plantas de dos especies silvestres de *Stevia* se relacionan directamente con la calidad del suelo y tipo de clima.
- El crecimiento y desarrollo de las plantas de *Stevia* se favorece con sustratos orgánicos y extracto acuoso de vermicompost.
- Suelos con niveles altos en materia orgánica y soluciones orgánicas incrementan la producción de metabolitos secundarios en dos especies silvestres de *Stevia*.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Generalidades

4.1.1 Familia Asteraceae

La familia Asteraceae es numerosa en la flora de México, por los géneros y especies que contribuye substancialmente a la enorme riqueza florística de nuestro país. Actualmente, en el territorio mexicano se han registrado alrededor de 3,000 especies nativas de Asteraceae, distribuidas en 392 géneros. La familia Asteraceae recibe el nombre alternativo Compositae o Compuestas (Balleza y Villaseñor, 2002; Del Vitto y Petenatti, 2009).

4.1.2. Características morfológicas de la familia Asteracea

Las plantas de la familia Asteraceae son herbáceas, anuales o perennes, más raramente arbustos o árboles, se caracterizan por presentar las flores agrupadas en capítulos (inflorescencia racimosa en capitulo) que funcionalmente se comporta como una flor. Las inflorescencias racimosas en capítulos consisten en una estructura ensanchada (receptáculo) donde se sitúan desde una a cientos de flores, rodeadas por las brácteas del involucre. El receptáculo puede ser plano, cóncavo o convexo y tener escamas o pelos entre las flores (Del Vitto y Petenatti, 2009).

Estas flores pueden ser hermafroditas, unisexuales o estériles. Sin cáliz o con éste reemplazado por vilano de pelos o escamas; los pelos pueden ser lisos, escábridos o plumosos. En un mismo capítulo todas las flores pueden ser todas flosculosas (*Cirsium*) o liguladas (*Taraxacum*) o una combinación de flosculosas y liguladas (*Anthemis*). Esta familia es de distribución

subcosmopolita, y es la familia más numerosa de las plantas con flores, con unos 1,700 géneros y de 24,000 a 30,000 especies distribuidas por el mundo (Sun *et al.*, 2013).

4.1.3 Usos de la familia Asteracea

Algunas plantas de la familia Asteraceae son utilizadas como: oleaginosas (girasol: *Helianthus annuus*; cártamo: *Carthamus tinctorius*), hortícolas (lechuga: *Lactuca sativa*; endivia: *Cichorium intybus*), insecticidas (pelitre: *Chrysanthemum cinerariifolium*), ornamentales (calendula: *Calendula arvensis*; dalias: *Chrysanthemum sp.* pl.), condimentarias (estragón: *Artemisia dracunculus*), aromáticas (abrotano: *Artemisia abrotanum*), para la elaboración de licores (absenta: *A. absinthium*), medicinales (manzanilla: *Chamaemelum nobile*; árnica: *Arnica montana*) y endulzantes naturales (*S. rebaudiana*) (Del Vitto and Petenatti, 2009; Zhigzhitzhapova *et al.*, 2014).

4.1.4. Química de la familia Asteracea

Los terpenos y lactonas sesquiterpénicas son la clase estructural más utilizada de metabolitos secundarios para estudios quimiotaxonómicos en la familia Asteraceae. Estos metabolitos son considerados como marcadores taxonómicos y muestran muchas actividades biológicas y comerciales (Avalos y Pérez, 2009).

4.1.5 Género *Stevia*

El género *Stevia* se extiende desde el suroeste de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina en ecosistemas localizados entre 1,000 y 2,000 metros de altitud. El número de especies

del género se estima en 300. De estas, más de 80 se encuentran en Norte América, de las que 70 son nativas de México (Grashoff, 1972).

Los estudios han mostrado la presencia de aceites esenciales y compuestos volátiles como borneol, cineol, pulegona, geraniol, linalol, chamazuleno, ahumuleno y cariofileno, derivados de la acetofenona, benzofurano y cromeno. Estos compuestos se encuentran en phidroxiacetofenona; un derivado del benzofurano, y el derivado del cromeno (Álvarez-García *et al.*, 2005; Torres *et al.*, 1998).

4.1.6 Componentes químicos y actividad biológica del género *Stevia*

Los metabolitos secundarios principales en el género *Stevia* son: terpenos, longipinanos y lactonas sesquiterpénicas. Los sesquiterpenoides son con mucho los mayores y más típicos componentes de las partes aéreas y raíces de la planta. La gran mayoría pertenecen a los grupos guaiano, longipinano y germacrano (Avalos y Pérez, 2009). Las lactonas sesquiterpénicas constituyen un grupo grande y diverso de plantas, componentes de las Asteraceae, con diversas actividades biológicas, y como era de esperar, algunas de las propiedades medicinales del género *Stevia* podrían ser una consecuencia de la presencia en los altos rendimientos de estos compuestos (Enriz *et al.*, 1998).

Algunos sesquiterpenoides aislados del género *Stevia* muestran actividad biológica y se conoce su estructura. Costunolido es una lactona sesquiterpénica constitutiva de varias plantas medicinales, incluyendo la parte aérea de *S. yaconensis* y *S. chamaedrys*, suprime la expresión génica del antígeno de superficie de la hepatitis B en células de hepatoma humano (Cerdeira y Pereda, 2002). Eupatoriopicrina se aisló de *S. sarensis*, *S. procumbens*, y *S. maimarensis* así como

derivados de leucodina, aislados de *S. yaconensis* var. subeglandulosa, han sido identificados como componentes importantes de las plantas consumidas por los chimpancés para presumir propiedades terapéuticas. La eupatoriopirina tiene propiedades antitumorales en el tumor de Lewis (carcinoma de pulmón) en ratones (Cerde y Pereda, 2002). Ludartina, aislada de *S. yaconensis* var. subeglandulosa, muestra una actividad más fuerte que el efecto citoprotector de la dehidroleucodina. El 11, 13-dehidro derivado de la leucodina muestra una actividad significativa contra la úlcera. Esta sustancia también se ha identificado como el agente citoprotector gástrico de las hojas de *Artemisia douglasiana*, que se utilizan en medicina popular como un agente anti-úlceras (Amaro *et al.*, 1988).

Los extractos crudos del género *Stevia* han mostrado actividades antimicrobianas y antifúngicas probablemente por la presencia de cualquiera de las lactonas sesquiterpénicas y / o a los flavonoides. Casticina, aislada de *S. breviaristata*, fue responsable de la actividad antifúngica que muestran los extractos de *Psiadia trinervia* contra *Cladosporium cucumerinum*, que fue evaluada por ensayos bioautograficos (Barquera y Cuevas, 2009).

4.1.6.1 *Stevia pilosa*

Stevia pilosa es planta ornamental usada en las festividades tradicionales de día de muertos en Hidalgo. Por su llamativa flor morada, en esta especie se encontró un compuesto químico sobre la parte aérea, de donde se aisló una sesquiterpenlactona conocida como leukodina, se encontraron también los compuestos β -sitosterol y estigmasterol así como los derivados del longipineno.

4.1.6.2 *Stevia tomentosa*

En las raíces se han aislado y caracterizado los sesquiterpenos y triterpenos como: el acetato de dammaranilo, 3 γ -friedelanol, γ -sitosterol y estigmasterol (Álvarez *et al.*, 2005). Otros compuestos también se aislaron; como el dammarano acetilado, β - sitosterol, friedelanol, y los derivados del longipineno, la valeranona y los bisabolenos.

4.1.6.3 Otros compuestos fitoquímicos de las especies de *Stevia*

A continuación se describen algunas especies de *Stevia* estudiadas en México y exploradas en su composición química en función del órgano estudiado (Hernández *et al.*, 1998) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Especies de *Stevia* estudiadas en México.

Aérea	Parte estudiada Aérea y Raíz	Raíz
<i>S. aff. tomentosum</i>	<i>S. lemmonia</i>	<i>S. subpubescens</i> var.
<i>S. berlandieri</i>	<i>S. lucida</i>	<i>intermedia</i>
<i>S. chamaedrys</i>	<i>S. origanoides</i>	<i>S. viscida</i>
<i>S. eupatoria</i>	<i>S. ovata</i>	<i>S. pilosa</i>
<i>S. hyssopifolia</i>	<i>S. polycephala</i>	<i>S. tomentosa</i>
<i>S. isomeca</i>	<i>S. salicifolia</i> var.	
<i>S. microchaeta</i>	<i>S. subpubescens</i>	
<i>S. monardaefolia</i>	<i>S. pilosa</i>	
<i>S. nepetifolia</i>		
<i>S. phebohylla</i>		
<i>S. seleriana</i>		
<i>S. serrata</i>		
<i>S. salicifolia</i>		
<i>S. salicifolia</i> var. <i>typica</i>		

Las especies de *Stevia* con uso medicinal son:

- *S. salicifolia* Cav. La han empleado los indios Tarahumaras para curar molestias gastrointestinales y como catártico.
- *S. eupatoria*. Se ha utilizado como diurético y antipalúdico.
- *S. linoides*. Ha tenido uso como astringente.

Las flores y hojas de plantas de este género se han usado para obtener aceites esenciales. por ejemplo; *S. satureiaefolia* colectada en Argentina, se identificó una serie de compuestos como el borneol, cineol, la pulegona, geraniol, nerol y el limoneno. En las plantas también se han encontrado flavonoides por ejemplo, en *Stevia microchaeta* se aislaron los siguientes flavonoides glicosidados: el 3-O-β-Dgalactósido de quercetina, el 7-O-β-D-glucósido de luteolin, el 4'-O-β-Dglucósido de luteolin y el 3-O-β-D glicósido de quercetina (Álvarez, 2005).

4.2 Distribución geográfica de *S. pilosa* y *S. tomentosa*

De acuerdo con Calderon y Rzedowski (2005) las especies *S. pilosa* y *S. tomentosa* crecen en bosques de *Pinus*, *Quercus*, *Juniperus*, con numerosos componentes herbáceos y arbustivos. Los ecosistemas anteriores se localizan en altitudes entre 2,350 y 4,000 m.

Por otro lado, la información documentada por Calderon y Rzedowski (2005) no mencionan las condiciones climatológicas de los diferentes ecosistemas donde se desarrollan las especies de *Stevia*, excepto algunos datos de precipitación (700 – 1,200 mm anuales), suelo y relieve. Los bosques de *Pinus*, *Quercus* y *Juniperus* crecen en suelos profundos y a veces bastantes rocosos; a menudo sobre laderas con pendiente.

Otras investigaciones relacionadas con Calderon y Rzedowski (2005) describen la composición florística (Matuda, 1958; García-Sánchez *et al.*, 2014), distribución (Watanabe *et al.*, 2001) y estructura a partir de grandes extensiones (Grashoff, 1972), otras incluyen la descripción de nuevas especies (Soejima *et al.*, 2001; Turner, 2013; 2015), pero ninguna de las investigaciones mencionan las condiciones edafoclimáticas en donde se encuentran.

4.3 Análisis de crecimiento

El concepto crecimiento implica cambios irreversibles en tamaño, forma y número que se relacionan estrechamente entre sí, y se aplica al estudio cuantitativo del desarrollo de la planta (Hoffmann y Poorter, 2002; Padilla *et al.*, 2007; Paulo *et al.*, 2012; Poorter *et al.*, 2012a; Hunt, 2017). El tamaño comúnmente se mide a través de la biomasa o peso seco, lo cual evita complicaciones generadas por las fluctuaciones del contenido hídrico y es un buen indicador de la cantidad de energía fijada (Turnbull *et al.*, 2012).

El desarrollo es la secuencia de eventos ontogénicos que involucran al crecimiento y la diferenciación, dirigidos hacia cambios de función y morfología (Villar *et al.*, 2005); tales cambios regulan la transformación del ápice del tallo del estado vegetativo al reproductivo (Quero *et al.*, 2008). Este concepto está limitado a algunos cambios cualitativos del crecimiento, que pueden ser considerados como una consecuencia del crecimiento diferencial a lo largo de varios ejes o entre diferentes órganos de la planta (Paulo *et al.*, 2012).

Apoyados en el concepto de desarrollo, la división del ciclo biológico de las plantas ha permitido realizar estudios básicos del crecimiento en las etapas o fases críticas y, desde el punto de vista aplicado, ha marcado la pauta para realizar más conscientemente las prácticas agronómicas para la producción (Poorter *et al.*, 2012b).

El análisis de crecimiento es la primera etapa en el análisis de producción primaria y el más común para estimar la producción fotosintética neta (Matsuda *et al.*, 2014). Es decir, la cantidad de biomasa asimilada menos las pérdidas debidas a la respiración (Steinmaus y Norris, 2002). Estas técnicas se emplean para demostrar el efecto de un ambiente o de una práctica de manejo particular sobre cierto cultivo y para explicar el comportamiento diferencial de las especies o variedades que crecen bajo las mismas condiciones (Fanelli y De Lillis, 2004).

Para analizar el crecimiento de las plantas, se debe disponer de datos exactos de las dimensiones del aparato asimilatorio, como es el área foliar, y la acumulación de biomasa resultante, expresada como el peso seco de la planta completa o de sus órganos, los cuales deben obtenerse a intervalos regulares (Galmés *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2011; Matsuda *et al.*, 2014; Hunt, 2017). La representación gráfica de esta información, normalmente muestra una curva sigmoide con tres fases: 1). logarítmica o inicial, 2) de máximo crecimiento o lineal y 3) de senectud o final (Casierra-Posada *et al.*, 2012; Turnbull *et al.*, 2012). Esta función continua, proporciona una visión conceptual y facilita las comparaciones; así mismo, el procedimiento de ajuste determina que puedan definirse tendencias generales, pasando por alto las fluctuaciones que ocurren en el corto plazo (Turnbull *et al.*, 2012).

El análisis de crecimiento puede realizarse con pocos muestreos durante el ciclo biológico de las plantas y tamaño de la muestra grande (enfoque “clásico”), o con número mayor de datos de una muestra menor (enfoque “funcional”) (Poorter *et al.*, 2012a). Estos enfoques no son mutuamente excluyentes, pues si el espacio y el tiempo no son problema, los muestreos pueden ser frecuentes y grande el tamaño de muestra, pero como esto no es lo común, el esquema a seguir deberá hacer uso más eficiente de los recursos disponibles, lo cual influirá en el diseño y la ejecución del experimento (Hunt, 2017).

En el análisis de crecimiento funcional, el principio consiste en seleccionar una función matemática adecuada, representada por una curva suave, que es ajustada a los valores registrados del área foliar y de la biomasa acumulada, de manera que se aproxime a la curva real de crecimiento (Poorter *et al.*, 2012b); ocasionalmente se han utilizado funciones parabólicas (Atzoria *et al.*, 2017), exponenciales (Jiménez-Leyva *et al.*, 2017), polinomiales de segundo grado y lineales (Hunt, 2017) entre otras.

El crecimiento vegetal también se puede analizar mediante índices de eficiencia fisiológica o funciones de crecimiento, aunque al calcularlos en forma tradicional necesariamente incluyen el efecto de las variables ambientales controladas o incontroladas (Shibuya *et al.*, 2017) entre estos índices está la tasa relativa de crecimiento, la tasa de asimilación neta, el índice de área foliar y la duración de ésta (Ferreira *et al.*, 2011), que se pueden calcular con los datos periódicos de la biomasa total o de algunos de los órganos y del área foliar de la planta (Hunt, 2017).

El análisis mediante funciones del crecimiento se puede realizar en plantas individuales y en comunidades vegetales. En plantas individuales se utiliza la tasa absoluta del crecimiento (TAC), la tasa relativa de crecimiento (TRC), tasa de asimilación neta (TAN), razón de área foliar (RAF), área foliar específica (AFE) y razón de peso foliar (RPF). Para el análisis de comunidades, se utiliza el índice de área foliar (IAF), la tasa de crecimiento del cultivo (TCC) y la duración de área foliar (DAF); sin embargo, no existe razón por la cual no se pueda utilizar en el análisis de comunidades, los índices utilizados en el análisis de plantas individuales (Hunt, 2017).

4.4 Estado nutrimental

Cuando un nutriente se encuentra en cantidades inadecuadas para la planta, o su disponibilidad la alteran drásticamente otras condiciones, se producen cambios en el metabolismo

celular y se desarrollan síntomas visuales específicos de cada nutrimento. Los síntomas pueden confundirse con otras anormalidades, por lo tanto, la interpretación puede ser incorrecta. El análisis químico de tejido vegetal es una excelente herramienta para conocer el estado nutrimental de casi la totalidad de los vegetales; su objetivo fundamental es diagnosticar anomalías nutrimentales en los cultivos (Sánchez *et al.*, 2016). Esta herramienta se basa en los mismos principios que el análisis del suelo, asumiendo que la concentración de nutrientes en la planta está directamente relacionada con la capacidad del suelo o de las soluciones nutritivas para proporcionarlos y a su vez con la productividad de las plantas (Munson y Nelson, 1986; Campbell, 2000; Serra, *et al.*, 2013).

El análisis de la planta se refiere al análisis cuantitativo de los componentes químicos en los tejidos vegetales. Además, existen metodologías denominadas semicuantitativas (Ionometros Horiba®), para el análisis *in situ* y en invernadero, que determinan el contenido de nutrientes solubles en savia o tallos (Blackmer y Mallarino, 1996; Ferrari *et al.*, 2010).

4.5 Sistemas de producción orgánica

El requerimiento nutrimental debe satisfacer las necesidades metabólicas de la planta para alcanzar el rendimiento máximo (White y Brown, 2010). La disponibilidad, absorción y distribución de nutrientes afectan directamente el crecimiento y desarrollo de las plantas (Arancon *et al.*, 2010). El vermicompost o humus de lombriz es un material estable y rico en poblaciones microbianas; es producto de la actividad enzimática tracto-intestinal de la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) y es una fuente de elementos minerales de lenta liberación, que favorece el desarrollo y la productividad de diversos cultivos hortícolas y ornamentales (Rodríguez *et al.*, 2009; Urrestarazu *et al.*, 2001), además contiene sustancias activas que actúan como reguladores de crecimiento (Edwards y Arancon, 2004) que en gran parte son las responsables del desarrollo

de las especies vegetales. De hecho, con la adición de pequeñas dosis de vermicompost en los cultivos se obtienen buenos resultados, todo depende del origen de los materiales con que se elaboró el sustrato orgánico (Atiyeh *et al.*, 2002a; Rekha *et al.*, 2013).

Además del humus sólido, el lixiviado drenado durante el proceso de vermicompostaje es un notable promotor del crecimiento natural para la planta debido a sus características bioquímicas, que incluyen sustancias húmicas. Los lixiviados son un producto que aún no está totalmente estudiado (Gutiérrez-Miceli *et al.*, 2008; Basílio y Galba, 2012). El lixiviado o efluente de vermicompost contiene grandes cantidades de ácidos húmicos y fúlvicos, los cuales mejoran el desarrollo de plantas y estimulan la absorción de nutrientes (Atiyeh *et al.*, 2002b; Arancon *et al.*, 2005; Ortega y Fernández, 2007), su contenido microbiano protege contra enfermedades, por lo que es promotor y protector del crecimiento de las plantas (Adhikary, 2012; Quaik *et al.*, 2012), además contiene grandes cantidades de nutrientes para las plantas y puede ser utilizado como fertilizante líquido aunque normalmente diluido para evitar daños a las plantas (Gutiérrez-Miceli *et al.*, 2008).

El té de vermicompost es un extracto acuoso de alta calidad biológica que se consigue mezclando el vermicompost con agua durante un periodo determinado, ya sea con aireación o sin ella, con o sin aditivos, destinados a aumentar la densidad de la población microbiana durante la producción (Scheuerell y Mahaffee, 2002; NOSB, 2004). Los té de compost y vermicompost son nuevas propuestas de uso de enmiendas orgánicas, aplicadas generalmente para suprimir propágulos de enfermedades presentes en el suelo, aunque recientemente por su eficacia comprobada, están ganando importancia como una alternativa a los fertilizantes químicos y pesticidas (Naidu *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2012). Contienen nutrientes y diversos organismos y se aplican ya sea como una poción o directamente a las plantas a promover el crecimiento de las

plantas y suprimir enfermedades en ellas. No obstante, estos efectos beneficiosos dependerán de la calidad de las fuentes de compost y el método de extracción (Scheuerell y Mahaffee, 2002). Por lo que un té de mala calidad podrían inhibir la germinación de las semillas y el crecimiento de las plantas (Carballo *et al.*, 2009). Las especies de *Stevia* al ser plantas silvestres presentan un requerimiento nutrimental bajo, por lo tanto, el vermicompost y sus derivados (efluente y té) pueden ser una fuente nutrimental que satisface las necesidades de crecimiento y desarrollo.

Con estos antecedentes y dada la gran riqueza de especies en el género *Stevia* y de la diversidad de ambientes donde se distribuyen, se justifica que el crecimiento y producción de metabolitos secundarios de cada especie pueden ser óptimos si las condiciones son similares a las que prevalecen en su lugar de origen. Para entender los procesos que modulan el crecimiento y desarrollo de las plantas de *Stevia* que crecen en diferentes ambientes (cálido, semi-frío, frío, etc.) y sistemas de producción resulta necesario conocer si las modificaciones de la distribución de biomasa son o no propias de su adaptación a las condiciones edafoclimáticas o a los sistemas de producción orgánica y mineral, y también si la concentración de metabolitos secundarios puede ser un indicador de una condición de estrés. Por lo que en el presente trabajo se dividió en secciones para dilucidar el efecto ambiental y nutricional sobre el crecimiento y concentración de metabolitos secundarios y mineral en *S. pilosa* y *S. tomentosa*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Identificación de *S. pilosa* y *S. tomentosa* en tres ecosistemas del Estado de Hidalgo

5.1.1 Localización de los sitios de muestreo

La distribución de las especies de *Stevia* e información de los sitios y ambientes en los que se desarrolla naturalmente se obtuvo de los principales herbarios que se encuentran en línea, como Missouri Botanical Garden's Herbarium, Botanical Research Institute of Texas (2014) y CONABIO (2014), referencias bibliográficas (Matuda, 1958; Grashoff, 1972; Calderón y Rzedowski, 2005) y consultas a los herbarios (Herbario Nacional de México (MEXU) y Herbario-Hortorio (CHAPA) Colegio de Postgraduados).

Los ambientes donde crecen las especies seleccionadas se eligieron con diferencias climatológicas y tipo de vegetación. Los sitios fueron Huasca de Ocampo, Mineral del Chico y Mineral del Monte, en el Edo. de Hidalgo, México (Figura 1). La información de temperatura, precipitación, evaporación total y número de días nublados se obtuvieron de la base de datos histórico mensual del Servicio Meteorológico Nacional de un periodo de 50 años.



Figura 1. Localización en el Edo. de Hidalgo de sitios de muestreo de *S. pilosa* y *S. tomentosa*.

5.1.2 Identificación taxonómica

La taxonomía se basó en la clave para la identificación de los géneros de la familia Compositae (Calderón y Rzedowski, 2005). Se ha documentado que la apomixis es frecuente en la familia Asteraceae (Noyes, 2007; Caponio *et al.*, 2016) y esto dificulta la descripción de su taxonomía, encontrándose a menudo individuos y poblaciones con características similares entre especies de *Stevia*. Para la descripción taxonómica se tomó de referencia lo reportado por Grashoff (1972) y Matuda (1958):

- 1 Flores liguladas dispuestas en la periferia de las cabezuelas, o bien, ausentes; plantas generalmente sin látex.
- 2 Lígulas ausentes.
- 6 Vilano presente.

7 Vilano de escamas, aristas, o bien, en forma de corona, copa o anillo.....Clave H (p. 778)

CLAVE H. FLORES LIGULADAS AUSENTES; VILANO DE ESCAMAS, ARISTAS, O BIEN, EN FORMA DE ANILLO, CORONA O COPA

1 Páleas del receptáculo ausentes.

5 Hojas y brácteas involucrales sin glándulas oleíferas traslúcidas, aunque a menudo con pequeños glóbulos de exudado resinoso.

6 Vilano exclusivamente de escamas, o bien, en forma de corona o anillo.

10 Cabezuelas de 3 o más flores.

11 Hojas enteras, dentadas o lobadas.

13 Cabezuelas de cuatro a seis flores; involucre de cinco a ocho brácteas de tamaño igual o subigual; aquenios con 5 costillas; cabezuelas dispuestas en corimbos o panículas *Stevia*

Género *Stevia*

1 Brácteas involucrales sin pelos glandulosos, aunque a menudo con glándulas sésiles; plantas herbáceas o arbustivas.

8 Hojas todas alternas; plantas herbáceas.

9 Corolas rosadas a moradas o de color guinda, al menos en la parte tubular.

10 Escamas del vilano de 1 a 2 mm de largo; cabezuelas sésiles o casi sésiles, agrupadas en glómérulos densos..... *S. pilosa*

8 Hojas opuestas, al menos las inferiores.

12 Plantas herbáceas perennes, a veces altas y muy ramificadas, pero no francamente leñosas; flores blancas a moradas.

14 Hojas en su mayoría opuestas.

15 Envés de la hoja tomentoso o subtomentoso.

16 Envés de la hoja tomentoso, blanco o blanquecino; limbo por lo general ovado, obtuso o redondeado en el ápice..... *S. tomentosa*

5.1.3 Monitoreo de las especies

Entre los meses agosto y octubre (2014) se realizaron recorridos de campo, entrevistas a productores y con el uso de las claves taxonómicas propuestas por Calderón y Rzedowski (2005) se identificó *S. pilosa* y *S. tomentosa*, las plantas fueron recolectadas entre los meses de abril y julio del 2015 cuando tenían entre 10 y 15 hojas, a partir de ese momento se empezó a contar los días de observación (20, 52, 82 y 110 días). El material fue llevado y envuelto en papel periódico dentro de una hielera para el análisis de crecimiento.

5.1.4 Variables evaluadas

5.1.4.1 Campo

a. Perfil de suelo

La descripción morfológica de los perfiles se realizó en campo, con base en el manual de Cuanalo (1990).

b. Análisis físicos y químicos del suelo

En el laboratorio las muestras de suelo se secaron a la sombra y se tamizaron para obtener la fracción de tierra fina (partículas menores de 2 mm). Los análisis físicos y químicos se realizaron

según el manual de procedimientos reportados por Van Reeuwijk (ISRIC, 1995): contenido de humedad de campo, por diferencia de peso seco y húmedo; análisis de tamaño de partículas (Textura), la fracción arena (0.047 a 2.0 mm) se separó de la arcilla y del limo con un tamiz de 0.047 mm; la fracción del limo (0.002 a <0.047 mm) y la arcilla (<0.002 mm) se determinaron por el método de la pipeta; la arcilla se calculó y el limo se obtuvo por diferencia al restar de 100 a la arena más la arcilla. El color se determinó por comparación del suelo con la carta Munsell. La densidad aparente se utilizó suelo con una retención de humedad de 33 kPa y se determinó por el método de la parafina (Soil Survey Investigations, 1992).

Estos análisis incluyeron a la reacción del suelo (pH) en agua, relación 1:2.5; carbono orgánico; capacidad de intercambio catiónico y bases intercambiables, por el método de acetato de amonio (Ca y Mg por titulación y, Na y K por absorción atómica); saturación de bases a partir de la suma de bases intercambiables entre la CIC y fósforo soluble en ácido cítrico.

5.1.4.2 Variables de crecimiento vegetal

La altura de planta (cm) se midió con cinta métrica, el diámetro del tallo (mm) con un vernier digital electrónico de precisión. La planta se diseccionó en hojas y tallo, se contó el número de hojas por planta y el área foliar (cm²) con la metodología propuesta por Rincón *et al.* (2012) con una cámara fotográfica marca Samsung Semi-Profesional, posteriormente, se secó el material vegetal en una estufa con circulación de aire a 47 °C durante 72 horas, para cuantificar la materia seca se pesó los órganos en una balanza analítica. Los índices de eficiencia (Hunt, 2017) se calcularon con los datos de peso seco y área foliar con las siguientes formulas:

Tasa Relativa de Crecimiento (TRC):

$$TRC = \frac{\ln PS2 - \ln PS1}{t2 - t1}$$

Tasa de absoluta de crecimiento (TAC):

$$TAC = \frac{PSP2 - PSP1}{t2 - t1}$$

Tasa de asimilación neta (TAN):

$$TAN = \frac{\left(\frac{PSP2 - PSP1}{t2 - t1}\right)}{\left(\frac{\ln AF2 - \ln AF1}{AF2 - AF1}\right)}$$

Área foliar específica (AFE):

$$AFE = \frac{AF}{PSH}$$

Razón de área foliar (RAF):

$$RAF = \frac{AF}{PSP}$$

Relación de peso foliar (RPF):

$$RPF = \frac{PSH}{PSP}$$

donde: \ln = Logaritmo natural; t = tiempo (días); Subíndice 1= dato uno; Subíndice 2= dato dos;

PSH= peso seco de hojas; PSP= peso seco de planta (tallo + hojas).

5.1.5 Diseño experimental

El diseño experimental fue de bloques completos al azar. El sitio fue el bloque y cada planta fue una repetición. La recolecta de material se realizó en transectos variables, donde el largo (120 m) y ancho (25 m) fue definido por el número estándar de individuos a muestrear (ocho plantas) esto de acuerdo a lo reportado por Foster *et al.*, (1995) y Mostacedo y Fredericksen (2000).

5.1.6 Análisis estadístico

Los datos de crecimiento e índices para las dos especies y de todos los muestreos se analizaron con ANDEVA y prueba múltiple de Tukey ($\alpha=0.05$) con el programa SAS 9.3.

5.2 Evaluación de soluciones nutritivas en el desarrollo de *S. pilosa* y *S. tomentosa* en invernadero

El experimento se llevó a cabo en el Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México. En un invernadero tipo capilla a dos aguas. Los aquenios de *S. pilosa* y *S. tomentosa* fueron obtenidos de colectas en el estado de Hidalgo en el año 2014.

5.2.1 Propagación y producción de almácigos

Los aquenios se sembraron en charolas negras de 50 cavidades, sobre una mezcla de peat moss y vermiculita en proporción de 70:30 volumen-volumen.

5.2.2 Trasplante

El trasplante se realizó a los 30 días después de la siembra (DDS).

5.2.3 Sustrato y contenedor

El contenedor utilizado fueron vasos de unicel con capacidad de 1L. El sustrato fue perlita.

5.2.4 Diseño de tratamientos y experimental

El diseño experimental fue factorial 2x3 con 10 repeticiones. Los factores de estudio fueron: la especie de Stevia (*S. pilosa* y *S. tomentosa*) y las soluciones nutritivas: Steiner (Steiner, 1984),

efluente y té de vermicompost (Gonzalez *et al.*, 2013) con conductividad eléctrica de 2.0 dS m⁻¹ y pH de 5.5 a 6.0.

5.2.5 Variables evaluadas

A los 30 y 60 días después del trasplante se midió; altura de planta (ALT), longitud radical (LR), diámetro de tallo (DT), se disectaron cada uno de los órganos, se sometieron a secado a una temperatura no mayor a 50 °C durante 72 horas y se determinó materia seca.

5.2.6 Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a análisis de varianza y comparación de medias de Duncan ($\alpha=0.05$).

5.3 Análisis de crecimiento de *S. pilosa* y *S. tomentosa* en sustratos orgánicos

5.3.1 Propagación

Como los aquenios presentaron diferentes problemas de germinación, fueron desinfectados con hipoclorito de sodio al 5 % y Microdyn® por 10 minutos, luego se remojaron en agua por 20 minutos.

5.3.2 Trasplante

Después de la emergencia (16 días después de la siembra), se aplicó riego con solución nutritiva Universal Steiner con 25 % de concentración (Steiner, 1984). Por la heterogeneidad de las poblaciones de *Stevia* se seleccionaron plantas vigorosas para colocarlas en vasos de

poliestireno de 250 mL con el mismo tipo de sustrato (una planta por vaso). Después de 12 días se trasplantaron en vasos de poliestireno de 1 L con los tratamientos establecidos en la investigación.

5.3.3 Materiales orgánicos y condiciones del invernadero

El sustrato utilizado para almácigos fue una mezcla de turba (PRO-MIX® FLEX) y vermiculita (Agrolita®) (70:30, v:v). A los 28 días después de la siembra se trasplantaron a sustratos definitivos de fibra de coco marca AQTEX® y vermicompost con las siguientes características: pH 8.5, materia orgánica 19.56 %, CIC 25.2 Cmol₍₊₎ ·kg⁻¹, CE 6.75 dS m⁻¹, nitrógeno 1.47 % y P, K, Ca, Mg y Na con 23, 5939, 900, 73 y 1283 mg kg⁻¹ respectivamente. El riego fue con agua del grifo (pH 7.6; CE 0.45 dS m⁻¹) previamente acidulada. Las 25 repeticiones de cada tratamiento se ubicaron al azar en bancales en el invernadero. Durante todo el experimento para el control de la temperatura se colocó malla sombra negra (40%). Las condiciones promedio fueron; temperatura máxima de 38.4 °C, una mínima de 9.8 °C, la humedad relativa fue de 78.8 %, una densidad de flujo de fotones fotosintéticos interna de 590 y 2273 μmol s⁻¹ m⁻² en el exterior.

5.3.4 Diseño experimental

El diseño de tratamientos fue factorial (2 x 5), el primer factor correspondió a las especies (*S. pilosa* y *S. tomentosa*) y el segundo a la mezcla de los sustratos, con 10 tratamientos en total, que correspondieron a proporciones (volumen – volumen) de fibra de coco – vermicompost (0:100, 25:75, 50:50, 75:25 y 100:0 %).

5.3.5 Variables evaluadas

Para evaluar el crecimiento se realizaron muestreos destructivos a los 42, 50, 58, 66, 74 y 82 días después de la emergencia (dde), y de manera aleatoria con cinco repeticiones por tratamiento, se midió altura de la planta, longitud radical y diámetro del tallo. La planta se diseccionó en hojas, tallo y raíz, el área foliar (AF) se determinó con la metodología propuesta por Rincón *et al.* (2012). Posteriormente se secó el material vegetal en una estufa con circulación de aire a 47 °C durante 72 horas, para cuantificar la materia seca se pesó los órganos en una balanza analítica. Se contó el número de hojas (NH) por planta y con los valores obtenidos se calcularon los índices de eficiencia (Hunt, 2017), las fórmulas utilizadas son las mismas que en el apartado de campo (5.1.4.2 Variables de crecimiento vegetal).

5.3.6 Análisis estadístico

El análisis de componentes principales (ACP) se hizo a partir del segundo muestreo, utilizando el procedimiento PRINCOMP del programa SAS. El criterio para seleccionar las variables dentro de los componentes principales fue que obtuviera el valor más cercano a 1. Después, se llevó a cabo el análisis de varianza y pruebas de comparación de medias (Duncan $\alpha=0.05$) en el programa SAS.

Con las variables seleccionadas en los componentes principales y con el programa Curve Expert Professional versión 1.2.3. 2010-2011 (Daniel G. Hyams[®]) se hicieron ajustes a funciones polinomiales con base en el mayor coeficiente de determinación (R^2) y el menor error estándar.

5.4 Determinación de perfil químico de *S. pilosa* y *S. tomentosa* desarrolladas *in situ* e invernadero

En el Laboratorio de Fitoquímica, Campus Montecillo, Estado de México se llevó a cabo la determinación de compuestos químicos.

5.4.1 Material vegetal

El análisis de metabolitos secundarios se hizo en material recolectado en el campo y en el invernadero. Este correspondió al último muestreo e incluyó la mezcla de hojas y tallos de cada tratamiento.

5.4.2 Análisis preliminar de los grupos de compuestos

El análisis preliminar de alcaloides, fenoles, flavonoides, saponinas, aceites esenciales, terpenos y taninos se hizo en extractos orgánicos, a partir de 1 g de material vegetal y 9 mL de hexano, diclorometano, metanol y agua. Todos por triplicado con los métodos incluidos en el Cuadro 2.

En placas TLC sílica gel (60, F254; Merck), con dimensiones de 10 × 10 cm se corroboró la presencia y los falso positivos de algunos metabolitos. Las placas fueron introducidas en diferentes sistemas y reveladores (Cuadro 3).

Cuadro 2. Metodología utilizada en la determinación de componentes fitoquímicos principales.

Marcha fitoquímica	Descripción	Ensayo
Alcaloides	0.5 mL del extracto crudo, agregar cinco a seis gotas de HCl (10%), agitar y calentar a 30 °C, en baño de agua por 20 min.	Dragendorff
Fenoles	0.5 mL del extracto, agregar 0.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu (10 %) y 0.5 mL de Na ₂ CO ₃ .	Reactivo Folin-Ciocalteu
Flavonoides	1 mL del extracto, añadir tira de magnesio, agregar unas gotas de HCl concentrado.	Shinoda
Saponinas	1 mL del extracto acuoso, agregar 1mL de agua destilada, agitar y observar la formación de espuma.	Prueba de la espuma
Aceites Esenciales	Percibir olor agradable y película aceitosa.	Aceite flotante
Terpenos	Evaporar a sequedad 1 mL de extracto. Resuspender con unas gotas de CHCl ₃ y añadir gotas de Ac ₂ O y H ₂ SO ₄ concentrado.	Liebermann – Burchard
Taninos	A 0.5 mL del extracto crudo agregar de 3 a 4 gotas de reactivo de FeCl ₃ .	FeCl ₃ 5%

HCl= ácido clorhídrico; Na₂CO₃= carbonato de sodio; CHCl₃= cloroformo; Ac₂O= anhídrido acético; H₂SO₄= ácido sulfúrico; FeCl₃= cloruro de hierro.

Cuadro 3. Prueba, fase móvil y revelador en cromatografía en capa fina.

Prueba Fitoquímica	Fase Móvil	Revelador
Alcaloides	CHCl ₃ : EtOH (9:1)	Dragendorff
Fenoles	TOL : CHCl ₃ : Me ₂ CO (40: 25: 35)	Reactivo Folin-Cioclatau
Flavonoides	CHCl ₃ : MeOH : H ₂ O (65: 45: 12)	Natural Product/Polietilenglicol
Terpenos	AcOEt : MeOH (7:3)	Vainillina – H ₂ SO ₄

EtOH: etanol, TOL: tolueno, Me₂CO: acetona, MeOH: metanol, AcOEt: acetato de etilo.

5.4.3 Cuantificación de metabolitos secundarios

En el análisis preliminar se detectaron fenoles, flavonoides y terpenos. La cuantificación se realizó a partir del extracto de 1 g de tejido deshidratado con 10 mL de MeOH al 80 % en agua (v:v) mantenido con ultrasonido (Bransonic®) a 60 °C por 10 min. Las muestras filtradas se mantuvieron en viales color ámbar. Fenoles, flavonoides y terpenos se identificaron y cuantificaron con los métodos descritos por Waterman y Mole (1994), Chang *et al.*, (2002) y Harborne (1998) y curvas estándar de ácido gálico, quercetina y masticadenoico, respectivamente.

5.4.4 Análisis estadístico y diseño experimental

El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial; los factores de estudio fueron las especies (*S. pilosa* y *S. tomentosa*) y las evaluaciones en campo e invernadero. Los niveles para el sitio de recolecta fueron las localidades Huasca de Ocampo, Mineral del Chico y Mineral del Monte, las soluciones nutritivas en invernadero fueron solución universal Steiner, extracto y efluente de vermicompost, y los sustratos orgánicos fueron las proporciones de las mezclas de fibra de coco y vermicompost (0-100; 25-75; 50-50; 75-25; 100-0). En la evaluación de campo se generaron seis tratamientos, mismo caso sucedió con las soluciones nutritivas, con las mezclas de los sustratos orgánicos se generaron 10 tratamientos. El análisis estadístico se hizo por separado. Los resultados se transformaron a raíz cuadrada, para homogeneizar y normalizar varianzas. Con los datos transformados se analizaron con ANDEVA y prueba múltiple de Duncan ($\alpha=0.05$) con el programa SAS 9.3.

5.5 Evaluación nutrimental de *S. pilosa* y *S. tomentosa* desarrolladas *in situ* e invernadero

En el laboratorio de Nutrición Vegetal, Campus Montecillo, Estado de México se llevó a cabo la determinación de los elementos minerales.

5.5.1 Material vegetal

El tejido vegetal que se analizó fue del último muestreo de campo e invernadero.

5.5.2 Análisis de laboratorio

La concentración de macroelementos (P, K, Ca, Mg y S) y microelementos (Fe, Zn, Mn, Co, Cu, Ni, Na y B) se determinó por digestión húmeda y por espectroscopia de emisión atómica de inducción por plasma acoplado (ICP-OES, Varian[®], modelo 725-ES) (Sánchez *et al.*, 2016). El contenido de N total se determinó por el método semimicro-Kjeldahl (Brearen y Mulvaney, 1982).

5.5.3 Análisis estadístico y diseño experimental

El análisis y el diseño experimental fueron los mismos que en el experimento IV (apartado 5.4.4)

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Identificación de *S. pilosa* y *S. tomentosa* en diferentes ambientes del estado de Hidalgo

6.1.1 Descripción del material vegetal

La estructura de las plantas fue variada y parece que está relacionada directamente con el medio que habitan. Las especies de *Stevia* se identificaron con la información de entrevistas a productores y recorridos de campo. *In situ*, *S. pilosa* presentó flores púrpuras a lilas, mientras que las de *S. tomentosa* eran blancas, ambas especies carecían de lígulas en las cabezuelas, vilano en forma de corona. Las hojas se identificaron como alternas, simples y sin peciolo en *S. pilosa* y en *S. tomentosa* opuestas en la parte inferior del tallo, con peciolo (± 2 mm), más largas y anchas con respecto a *S. pilosa*. La altura del tallo de las dos especies fue superior a 40 cm (Cuadro 4).

La raíz se identificó rizomatosa en ambas especies con anclaje firme, medianamente raíces gruesa (2 – 5 mm) en *S. tomentosa* y delgada en *S. pilosa*. En ambas especies la inflorescencia fue un corimbo, cabezuelas numerosas y corimbos laterales en *S. tomentosa* y sésiles en *S. pilosa*. La corola fue de color púrpura y blanco en *S. pilosa* y *S. tomentosa*, respectivamente. El fruto se conoce botánicamente como aquenio. Su estructura apical se denomina vilano y facilitar la dispersión de las semillas. El vilano es erecto y extendido en *S. pilosa* y *S. tomentosa*, respectivamente.

Cuadro 4. Descripción morfológica de *S. pilosa* y *S. tomentosa* en la reserva natural el Hiloche.

Características	Especie	
	<i>S. pilosa</i>	<i>S. tomentosa</i>
Hojas	Alternas, simples, sésiles (sin peciolo), lineares y agudas, aserradas en el margen, desprovisto de pubescencia. Con presencia de exudado resinoso.	Opuestas en la parte inferior del tallo, posteriormente alternadas, pecioladas, elíptica, obtusa en el ápice, el margen aserrado, cuneada, con pocas o escasas gotas de exudado resinoso, en el envés de la hoja blanquesino.
Tallo	Erecto sin ramificaciones, piloso, ligeramente leñoso.	Ramificado, leñoso, pilosos (finos y muy cortos).
Raíz	Rizomatosa, delgadas y ligeramente leñosa, epidermis fácilmente desprendible.	Rizomatosa, medianamente gruesa y ligeramente leñosa, epidermis fácilmente desprendible.
Inflorescencia	Corimbo, único, aglomerados, cabezuelas sésiles; brácteas involucrales juntas con poca pubescencia.	Corimbo, cabezuelas numerosas, con corimbos laterales; con pedicelo pequeño, brácteas oblongas y obtusas en el ápice.
Flor	Corola de color púrpura, tubulosa, hermafrodita, hispídulas en los lóbulos.	Corola de color blanco, tubulosa, con pelillos muy finos, hermafrodita.
Fruto	Indehiscente; aquenio, con tres o cuatro ángulos, vilanos erectos.	Indehiscente; aquenio, con cuatro o cinco ángulos, vilanos extendidos.

6.1.2 Descripción edafoclimática

Los tres sitios evaluados se presentan en un gradiente altitudinal de 2 204, 2 509 y 2 822 m Huasca de Ocampo, Mineral del Chico y Mineral del Monte, respectivamente. El crecimiento de las especies de *Stevia* en función de la altitud podría ser más complejo que el simple efecto de las condiciones climáticas y deberse a varios factores combinados (suelo – clima, interacción planta – microorganismo, planta – patógeno, animales y hombre).

La temperatura afecta generalmente al desarrollo de la planta, y si no se tienen valores óptimos, el ciclo del cultivo puede ser corto o largo (Matsuda *et al.*, 2014). En Huasca de Ocampo la temperatura máxima y mínima fue 22.6 °C y 4 °C. Los productores comentaron que en Mineral del Monte la temperatura mínima puede llegar hasta -5 °C. Las semillas de determinadas especies no germinan si no han alcanzado valores mínimos, mientras que otras especies no florecen si no han estado expuestas a bajas temperaturas durante un cierto tiempo (Turnbull *et al.*, 2012). Aunque no se tienen datos sobre valores de temperaturas óptimas para estas especies, se puede suponer que las especies de *Stevia* tienen la capacidad para producir fenotipos diferentes, en respuesta a cambios en el ambiente.

En Mineral del Chico se tiene un ambiente húmedo y semifrío, debido a las precipitaciones registradas (1,427.8 mm), a la poca evaporación (131.5 mm) y a los días muy nublados (> 60 días). Sin embargo, en Mineral del Monte la precipitación es menor (870.7 mm), la evaporación es alta (1,137.9 mm) y los días nublados son igual que en Mineral del Chico. En Huasca de Ocampo es un clima más seco precipitaciones de 856.2 mm, con evaporaciones de 1,253.4 mm y los días nublados son escasos (Servicio Meteorológico Nacional, 2010).

En los ecosistemas, el calentamiento puede alterar casi todas sus propiedades: composición vegetal, tasas de crecimiento, estructura y arquitectura del dosel, ensombreamiento y profundidad de las raíces (Kozuka *et al.*, 2005). Aunque no se analizaron todas esas propiedades, se pudo observar un cambio en la estructura del dosel (elongación de tallos y pecíolos) en aquellas plantas recolectadas en Huasca de Ocampo. Mientras que las plantas recolectadas en Mineral del Chico se observó un impacto en el crecimiento y expansión foliar como lo reportado por Yano y Terashima (2004).

Las poblaciones de *Stevia* se vieron influenciada por las densidades arbóreas en las tres localidades. En los sitios de recolectas hubo convinación de bosques de *Pinus*, *Quercus* y

Juniperus. Las dos primeras especies predominaban en Huasca de Ocampo, pero hubo mayor diversidad de especies arbóreas en la localidad de Mineral del Monte. La elongación más alta en tallos se observó en Huasca de Ocampo, se puede suponer que la densidad de los árboles provocó dicho fenómeno. En Mineral del Chico donde no hubo cobertura vegetal *S. pilosa* tuvo mayor frondosidad.

Cuadro 5. Altitud, coordenadas geográficas y condiciones climatológicas de los sitios de recolecta de *S. pilosa* y *S. tomentosa* en Hidalgo, México.

Elemento	Localidad		
	Huasca de Ocampo (Zembo)	Mineral del Chico (San Sebastián)	Mineral del Monte (El Hiloche)
Altitud (m)	2 204	2 509	2 822
Latitud	20° 10' 29" N	20° 14' 40.7" N	20° 08' 44" N
Longitud	98° 33' 31" W	98° 46' 08.6" W	98° 41' 06" W
Temperatura (°C)	Máx	22.6	20.9
	Med	13.3	14.7
	Mín	4	8.7
Precipitación (mm)	856.2	1,427.8	870.7
Evaporación (mm)	1,253.4	131.5	1,137.9
Niebla (días)	0.7	69.40	62.2
Vegetación	Pino (<i>Pinus patula</i> , <i>P. teocote</i> , <i>P. michoacana</i>) y encino (<i>Quercus crassifolia</i> , <i>Q. rugosa</i>).	Pino (<i>Pinus teocote</i>), oyamel (<i>Abies religiosa</i>), junípero (<i>Juniperus monosperma</i>) y encino (<i>Q. rugosa</i>)	Pino (<i>Pinus moctezumae</i>), encino, oyamel y cedro (<i>Juniperus monticola</i>).

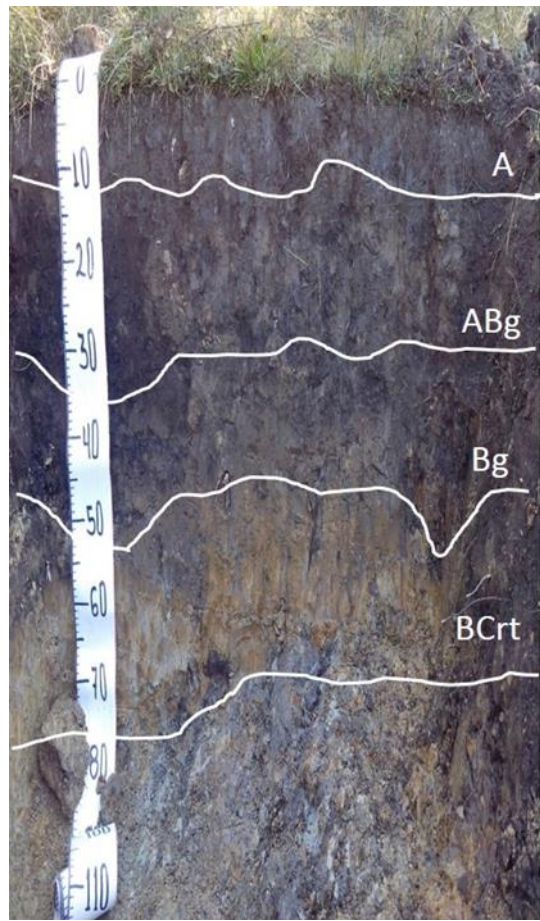
Máx: máxima, Med: media, Mín: mínima

Las características del suelo ejercen gran influencia sobre la ecología vegetal, edáfica, animal y en los humanos. El suelo es complejo en su composición, organización estructural y dinámico por lo que sus características y efectos en las plantas varían, en el espacio, en el tiempo y por las relaciones con el ambiente (Reyes, 2014).

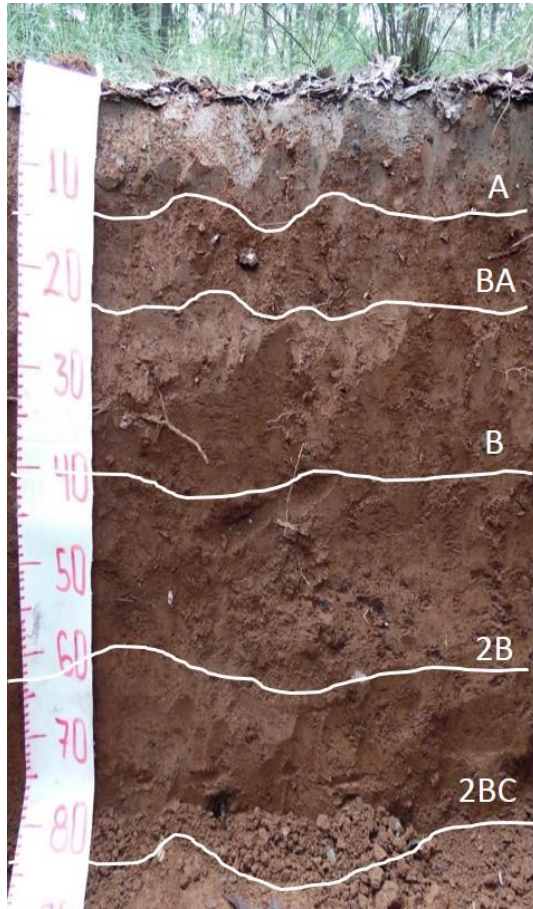
El perfil de suelo mostró condiciones de óxido reducción en los horizontes inferiores en los sitios Mineral del Chico y Mineral del Monte, lo que indica un exceso de humedad y mal drenaje de los suelos, lo que provoca poca aireación para las raíces. Éstas crecieron hasta 12 cm de profundidad en el Hiloche y Mineral del Monte; en contraste, en Mineral del Chico la profundidad fue más del doble. La diferencia, en parte se debió al manejo agronómico del suelo (para cultivo).

La estructura del suelo en ambos sitios es de bloques subangulares y migajosa, las cuales proporciona condiciones óptimas de humedad, aireación y contenido de materia orgánica (MO) para el crecimiento de las plantas. Los suelos en Mineral del Chico y Mineral del Monte correspondieron a un Luvisol (IUSS Working Group WRB, 2006). Ambas especies crecen en suelos arcillosos con drenaje deficiente (Cuadro 6 y 8). En el caso de Huasca de Ocampo el suelo pertenece a un Cambisol con buen drenaje en los diferentes horizontes (Cuadro 7) y con estructura migajón, granular y subangulares, lo que le permite a las plantas de *Stevia* una mejor exploración radical.

Cuadro 6. Caracterización morfológica de un perfil de suelo en la Reserva Natural el Hiloche, Mineral del Monte, Estado de Hidalgo.

Perfil	Horizonte – Profundidad – Descripción
	<p>A. 0-12 cm. Color en húmedo pardo oscuro (10 YR 2/2); textura arcillosa; bloques sub-angulares y estructura migajosa alrededor de las raíces de pastos y de plantas de <i>Stevia</i>; raíces finas y medias muy abundantes; poros muy finos; drenaje pobre; reacción fuerte al H₂O₂; baja reacción al HCl.</p>
	<p>ABg. 12-30 cm. Color en húmedo pardo oscuro (10 YR 4/2) con algunas manchas color pardo claro (10 YR 2/1); textura arcillosa; bloques sub-angulares pobremente desarrollados; raíces medias abundantes y gruesas por arboles (pino, cedro, encino); baja porosidad y escasa permeabilidad; media reacción al H₂O₂; baja reacción al HCl.</p>
	<p>Bg. 30-46cm. Color en húmedo pardo oscuro (10 YR 3/2) con algunas manchas color pardo amarillento (10 YR 5/6); textura arcillosa; estructura de bloques angulares pobremente desarrollos; pocas raíces medias por arboles (pino, cedro, encino); baja porosidad; drenaje pobre; baja reacción al H₂O₂; nula reacción al HCl.</p>
	<p>BCrt. 56-75 cm. Color en húmedo pardo claro (10 YR 6/2) con manchas blancas (10 YR 5/8); textura arcillosa; estructura pobremente desarrolla; escasas raíces medias por arboles (pino, cedro, encino); baja porosidad y pobre drenaje; condiciones redox; nula reacción al H₂O₂; nula reacción al HCl.</p>

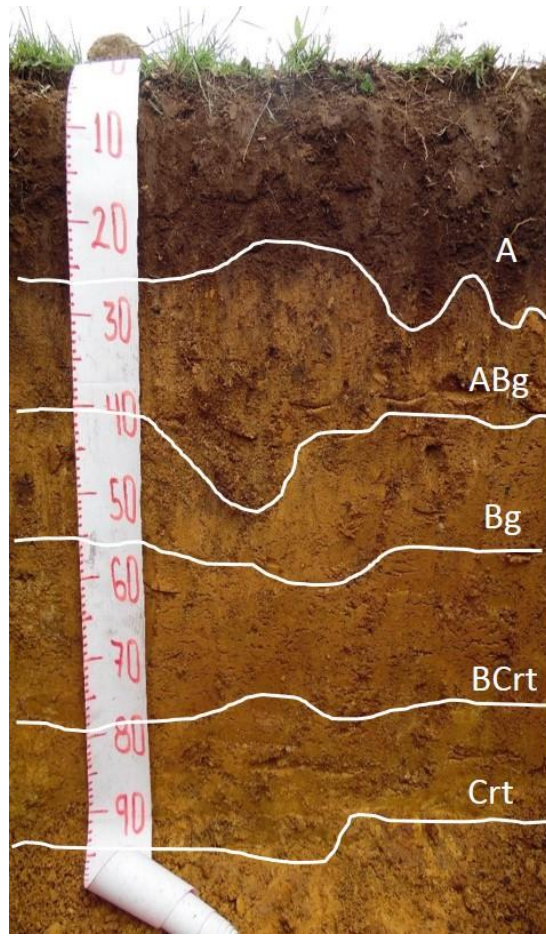
Cuadro 7. Caracterización morfológica del perfil de suelo en el Zembo, Huasca de Ocampo, Hidalgo.

Perfil	Horizonte – Profundidad – Descripción
	<p>A. 0-23cm. Color en húmedo pardo oscuro (10 YR 3/3); color en seco (10 YR 5/4); textura migajón arcilloso; 20% de estructura migajosa y 40% granulares de ligera a moderadamente desarrollada; un 40% de bloques subangulares muy grandes con moderado desarrollo; raíces de <i>Stevia pilosa</i> y <i>S. tomentosa</i>, pasto y encino, de raíces finas y delgadas abundantes hasta raíces gruesas y medianas raras; poros fisura y canal pocos y finos; con buen drenaje; reacción muy fuerte al H₂O₂ en el mantillo de hojas de encino; nula reacción al HCl.</p>
	<p>BA. 23-52 cm. Color en húmedo pardo oscuro (10 YR 3/6) color en seco (10 YR 6/4); textura migajón arenoso con mayor presencia de arcilla; 60% de estructura granular y bloques subangulares muy finos y 40% grandes medianos ligeramente desarrollada; raíces pocas medias y grandes raras; poros finos y numerosos, continuos; buen drenaje; reacción moderada al H₂O₂; nula reacción al HCl.</p>
	<p>B. 52-65 cm. Color en húmedo pardo oscuro (10 YR 3/6) color en seco (10 YR 6/4); textura migajón arenoso con mayor presencia de arena; estructura de bloques subangulares y angulares finos y medios ligeramente desarrollados; raíces finas raras; poros finos y medianos pocos y frecuentes, continuos; buen drenaje; reacción muy fuerte al H₂O₂; nula reacción al HCl.</p>

2B. 65-80 cm. Color en húmedo pardo claro (10 YR 3/4) color en seco (10 YR 7/4); textura arena migajosa; estructura de bloques subangulares y angulares medios moderadamente desarrollados; no hay presencia de raíces; poros finos frecuentes, continuos; buen drenaje; reacción fuerte al H₂O₂; nula reacción al HCl.

2BC. 80-90 cm. Color en húmedo pardo claro (10 YR 3/4) color en seco (10 YR 6/3); textura arena migajosa; estructura de bloques subangulares y angulares de finos a medianos y de fuerte a moderadamente desarrollados; no hay presencia de raíces; poros finos frecuentes, continuos; buen drenaje; reacción moderada al H₂O₂; nula reacción al HCl.

Cuadro 8. Caracterización morfológica de un perfil de suelo en San Sebastian, Mineral del Chico, Estado de Hidalgo.

Perfil	Horizonte – Profundidad – Descripción
	<p>A. 0-29 cm. Color en húmedo pardo oscuro a pardo claro (10 YR 3/3) color en seco (10 YR 5/4); textura arcillosa; transición media de forma ondulada; bloques sub-angulares, granular y migajosa alrededor de las raíces de pastos y de plantas de <i>Stevia</i>; raíces finas y medias muy abundantes; poros muy finos; drenaje pobre, reacción fuerte al H₂O₂; baja reacción al HCl.</p>
	<p>ABg. 29-41 cm. Color en húmedo marron oscuro (7.5 YR 5/8) color en seco amarillo rojizo (7.5 YR 7/6) con algunas manchas color pardo oscuro (10 YR 3/3); textura arcillosa; bloques sub-angulares y angulares pobremente desarrollados; raíces medias abundantes y gruesas por plantas de <i>Stevia</i>; baja porosidad y escasa permeabilidad; media reacción al H₂O₂; baja reacción al HCl.</p>
	<p>Bg. 41-57 cm. Color en húmedo marrón oscuro (7.5 YR 5/8) color en seco amarillo rojizo (7.5 YR 7/6); con algunas manchas color pardo claro (10 YR 2/1); textura arcillosa; estructura de bloques angulares pobremente desarrollos; pocas raíces medias por plantas de <i>Stevia</i>; baja porosidad; drenaje pobre; baja reacción al H₂O₂; nula reacción al HCl.</p>
	<p>BCrt. 57-80 cm. Color en húmedo marrón oscuro (7.5 YR 5/8), color en seco amarillo rojizo (7.5 YR 6/6); con algunas manchas rojo amarillento (5 YR 5/8) y color pardo claro (10 YR 2/1); textura arcillosa; estructura pobremente desarrolla bloques angulares;</p>

escasas raíces medias por plantas de *Stevia*; baja porosidad y pobre drenaje; revestimiento de arcilla por los canales de raíces; condiciones redox; nula reacción al H_2O_2 ; nula reacción al HCl.

Crt. 80-93 cm. Color en húmedo marrón oscuro (7.5 YR 5/8) color en seco amarillo rojizo (7.5 YR 6/6) con algunas manchas color pardo claro (10 YR 2/1); textura arcillosa; estructura pobremente desarrollada bloques angulares; muy pocas raíces medias por plantas de *Stevia*; baja porosidad y pobre drenaje; revestimiento de arcilla por los canales de raíces; condiciones redox; nula reacción al H_2O_2 ; nula reacción al HCl.

Las propiedades edáficas se clasifican como químicas, físicas y micromorfológicas (Ortiz y Gutiérrez, 1999). Con base en el triángulo de texturas, las propiedades físicas de los tres sitios de recolecta observamos que dominan los francos. La clase textural que domina en los sitios Mineral del Chico y Mineral del Monte es franco arcillosas y en Huasca de Ocampo el sitio de muestreo es franco limoso (Cuadro 9). Aunque no se tienen registros de las diferentes clases texturales donde crecen las demás especies de *Stevia*, Kujur *et al.* (2010) mencionan que *S. rebaudiana* crece en suelos arenosos cerca de arroyos y la concentración de esteviósido es mayor en comparación con aquellas especies que crecen en suelos arcillosos.

Cuadro 9. Propiedades físicas de los tres sitios de recolecta en el Estado de Hidalgo.

Sitio	Profundidad	Da g cm ⁻³	Color (seco)	Descripción	Color (Húmedo)	Descripción	A	L	R	Clase Textural
							----- % -----			
Huasca de Ocampo	0 – 23	1.25	10YR 5/4	Pardo amarillento	7.5YR 4/4	Pardo	7.6	65.7	26.8	Franco Limoso
	23 – 52	1.25	10YR 5/6	Pardo amarillento	7.5YR 4/6	Pardo intenso	19.3	57.6	23.1	Franco Limoso
	52 – 65	1.19	10YR 6/4	Pardo amarillento claro	7.5YR 4/6	Pardo intenso	14.9	59.3	25.8	Franco Limoso
	65 – 80	1.28	10YR 6/4	Pardo amarillento claro	7.5YR 4/6	Pardo intenso	14.8	58.0	27.3	Franco Limoso
	80 – 90	1.32	10YR 5/6	Pardo amarillento	7.5YR 4/6	Pardo intenso	12.7	54.0	33.2	Franco Arcillo Limoso
Mineral del Chico	0 - 29	1.08	10YR 4/6	Pardo amarillento oscuro	10YR 3/4	Pardo amarillento oscuro	9.5	55.7	34.8	Franco Arcillo Limoso
	29 - 42	1.33	10YR 5/8	Pardo amarillento	10YR 4/6	Pardo amarillento oscuro	24.2	38.4	37.4	Franco Arcilloso
	42 - 53	1.36	10YR 6/8	Amarillo pardoso	10YR 5/8	Pardo amarillento	33.0	33.0	34.0	Franco Arcilloso
	53 - 80	1.22	10YR 6/8	Amarillo pardoso	7.5YR 5/8	Pardo intenso	13.0	41.1	45.9	Arcillo Limoso
Mineral del Monte	80 - 93	1.09	10YR 7/8	Amarillo	7.5YR 5/8	Pardo intenso	10.5	42.2	47.2	Arcillo Limoso
	0 – 12	1.37	10YR 4/6	Pardo amarillento oscuro	10 YR 2/2	Pardo oscuro	7.2	53.6	39.2	Franco Arcilloso
	12 – 30	1.59	10YR 5/8	Pardo amarillento	10 YR 4/2	Pardo oscuro	9	52.2	38.8	Franco Arcilloso
	30 – 46	1.75	10YR 5/8	Pardo amarillento	10 YR 3/2	Pardo oscuro	12.3	40.4	47.3	Franco Arcilloso
	56 – 75	1.7	10YR 6/8	Amarillo pardoso	10 YR 6/2	Pardo amarillento claro	31.3	36.9	31.8	Franco

A= Arena; L= Limo; R= Arcilla; Da= Densidad aparente

El color refleja las propiedades biológicas, físicas y químicas de la relación suelo-planta y está influido por los porcentajes de MO (Gutiérrez *et al.*, 2009). En Mineral del Monte los diferentes horizontes son de color pardo oscuro y MO descompuesta (lo que les da ese color característico). Al estar mal drenados existe acumulación mayor de MO en las capas superficiales, dándole a esta coloración más oscura. En Mineral del Chico predomina el pardo amarillo, lo que refleja que el drenaje es intermedio en comparación con Mineral del Monte.

La densidad aparente (DA) es la relación del peso del suelo por unidad de volumen (g cm^{-3}), está relacionada con el peso específico de las partículas minerales y orgánicas, y la porosidad de los suelos (Carter *et al.*, 1997). La DA baja permite a las raíces mayor exploración. Éste sería el caso de Huasca de Ocampo donde la DA se incrementa con la profundidad, porque el suelo es más denso en los horizontes superficiales. En este horizonte la entrada de raíces se favorece, pero se dificulta en los horizontes posteriores como es el caso de Mineral del Monte.

El conocimiento de las características químicas de los suelos es fundamental para conocer su génesis y el diseño de prácticas de manejo. La capacidad de intercambio catiónico (CIC) representa la capacidad de un suelo para retener y liberar iones positivos, que depende del contenido de arcilla y MO (Doran *et al.*, 1996). Los perfiles de Mineral del Chico y Mineral del Monte mostraron valores altos de CIC. Éste último presentó contenidos altos de bases intercambiables (Ca, Mg, Na y K).

Los valores altos de MO se obtuvieron en los primeros 30 cm de profundidad en los tres sitios. En Mineral del Chico y Mineral del Monte presentaron los valores mayores de MO (6.6 y 6.82 % respectivamente). Una de las características más importantes del suelo es su reacción (pH), debido a que los microorganismos y las plantas superiores responden notablemente al medio químico. Los tres sitios fueron ligeramente ácidos (Cuadro 10). La concentración mayor de nitrógeno y fósforo se registró en Mineral del Chico y Mineral del Monte.

Cuadro 10. Propiedades químicas de los tres sitios de recolecta en el Estado de Hidalgo.

Sitio	Profundidad	pH	CO	MO	N	P	CIC	Ca	Mg	Na	K	PSB
			----- % -----	----- % -----	----- mg kg ⁻¹ -----	----- cmol(+) kg ⁻¹ -----	----- cmol(+) kg ⁻¹ -----	----- cmol(+) kg ⁻¹ -----	----- cmol(+) kg ⁻¹ -----	----- cmol(+) kg ⁻¹ -----		
	0 – 13	4.4	2.76	4.76	0.127	10.1	22.88	1.47	0.11	0.36	0.20	9.3
Huasca de Ocampo	13 – 25	4.5	0.75	1.29	0.055	6.7	20.80	0.31	0.08	0.23	0.15	3.7
	25 – 41	4.5	0.60	1.03	0.055	6.0	10.40	0.97	0.12	0.34	0.20	15.6
	41 – 63	4.7	0.30	0.51	0.036	7.5	15.86	0.33	1.52	0.32	0.24	15.2
	63 – 81	4.9	0.22	0.39	0.036	9.4	23.92	2.53	0.17	0.40	0.25	14.1
Mineral del Chico	0 – 29	5.3	3.96	6.82	0.264	33.4	26.26	3.71	1.92	0.43	0.87	26.4
	29 – 42	5.4	0.52	0.90	0.073	5.6	22.88	2.73	1.86	0.19	0.64	23.7
	42 – 53	5.3	0.97	1.67	0.055	5.2	18.46	3.04	2.05	0.27	0.45	31.5
	53 – 80	4.9	0.52	0.90	0.046	4.1	30.16	3.80	2.27	0.34	0.34	22.4
Mineral del Monte	80 – 93	4.6	0.52	0.90	0.046	4.1	31.20	2.26	1.92	0.25	0.12	14.6
	0 – 12	5.7	3.8	6.6	0.53	11.8	37.99	10.56	10.81	0.66	0.82	60.1
	12 – 30	5.7	2.6	4.5	0.24	10	38.94	12.23	12.72	0.78	0.15	66.5
	30 – 46	5.8	0.7	1.3	0.09	7.1	32.03	9.21	10.69	0.83	0.25	65.5
	56 – 75	6	0.2	0.4	0.04	4.6	17.58	6.77	2.84	0.97	0.28	61.8

CO= carbono orgánico; MO= materia orgánica; N= nitrógeno; P= fósforo; CIC= capacidad de intercambio catiónico; Ca= calcio; Mg= magnesio; Na= sodio; K= potasio; PSB= porcentaje de saturación de bases.

6.1.3 Semejanzas y diferencias morfológicas de *S. pilosa* y *S. tomentosa* en función del ambiente.

La morfología de la planta se refiere a la estructura y forma, y está en función del ecosistema o del manejo agronómico (Wahid *et al.*, 2012). La principal semejanza en ambas especies en los tres sitios fue el color de las flores. En *S. pilosa* las flores fueron púrpuras a lilas y en *S. tomentosa* fueron blancas. Durante el muestreo las cabezuelas de algunas plantas de *S. pilosa* estaban en proceso de senescencia, principalmente en Mineral del Monte.

La frondosidad del vástago de *S. pilosa* fue mayor en el ambiente sin cobertura vegetal (Mineral del Chico), lo anterior se correlacionó con el área foliar. Esto se debió a la acumulación mayor de radiación solar en comparación con los ambientes con cobertura arbórea. En *S. tomentosa*, el número de hojas fue bajo con respecto a Huasca de Ocampo. Resultados obtenidos por Xu *et al.*, (2009) demostraron que parámetros morfológicos de hoja, como tamaño, forma y el patrón de venación son significativamente dependientes del sitio de crecimiento.

En Huasca de Ocampo las poblaciones de *Stevia* fueron pocas (dos plantas por cada 9 m²) en comparación con Mineral del Chico (12 plantas por m²), éstas estaban alrededor de los árboles o en espacios donde se filtraba la luz solar. Ambas especies tuvieron altura mayor por efecto del sombreado. Al contrario, en Mineral del Monte las plantas fueron menores en altura, lo anterior es debido a las condiciones climáticas (frío). Además, se han registrado temperaturas frías a heladas y varios días nublados, por lo que es probable que estas condiciones afecten negativamente los procesos fisiológicos en ambas especies (Vinocur y Altman, 2005). Es importante señalar que las cabezuelas para ambas especies se encontraban relativamente juntas y las hojas erectas, lo que se puede inferir que los días nublados inducen cambios en la morfología foliar y alteraciones en el

desarrollo de las hojas como lo reportado por Ben Haj Salah y Tardieu (1995) Mientras que en Mineral del Chico y Huasca de Ocampo fueron erecto-extendida a extendidas, respectivamente.

Las hojas sésiles en *S. pilosa* fueron semejantes en los tres sitios, pero la fuerza de adhesión en el tallo fue diferente, ya que al disecar el vástago se requería aplicar menos fuerza para no desprender la epidermis del tallo. La facilidad para desprenderlas mostró el siguiente gradiente Mineral del Monte < Huasca de Ocampo < Mineral del Chico. Además las hojas fueron más delgadas en los dos últimos sitios para ambas especies. Lo anterior parece relacionarse con la eficiencia de captación de luz y fijación de carbono versus la persistencia en el tiempo de la planta y por ende la capacidad de resistir daños físicos (Ahmad *et al.*, 2011). Además las condiciones frías en el sitio de Mineral del Monte seguramente ocasionan cambios en la composición lipídica de la membrana. Resultados obtenidos por Ducruet *et al.*, (2007) demuestran que algunas condiciones morfológicas contribuyen a la aclimatación al estrés por temperatura, entre ellas la membrana de los tilacoides con temperaturas bajas la membrana es gruesa, y delgada con temperaturas altas.

Una de las principales semejanzas entre las especies fue la tolerancia a suelos arcillosos con deficiente drenaje como los de Mineral del Chico y Mineral del Monte, pero la exploración directa de las raíces fue deficiente en contraste con Huasca de Ocampo. La MO influye directamente en la disponibilidad de elementos minerales, debido al efecto de mineralización (Androili *et al.*, 2010). Las condiciones de manejo agronómico propiciaron mayor abundancia de raíces en Mineral del Chico. Principalmente por la incorporación del sistema radicular de cultivos anuales en años anteriores.

6.1.4 *S. pilosa*, crecimiento e índices de eficiencia fisiológica

Las variables de crecimiento en las plantas de *Stevia* fueron significativas y altamente significativas en función del tiempo y el lugar de muestreo. A los 110 días, la altura de planta fue significativa ($\alpha=0.05$), en Huasca de Ocampo donde se obtuvieron las plantas más altas (Figura 2A). La temperatura afecta la tasa de desarrollo de las plantas a través de sus distintas etapas de desarrollo, también en la producción de hojas, tallos y componentes del rendimiento. Aunque no se tienen datos sobre los rangos específicos de temperatura para *S. pilosa* se puede inferir, que a medida que aumenta la temperatura entre una temperatura base y una temperatura óptima su crecimiento es más rápido, mientras si desciende la temperatura el desarrollo se hace más lento (Hatfield y Prueger, 2015). El grosor del tallo se incrementó en función del tiempo (Figura 2B). Las plantas de *Stevia* desarrolladas en Mineral del Chico tienen tallos más gruesos en comparación con los otros dos sitios independientemente del muestreo.

Las plantas de *S. pilosa* que crecen en Mineral del Chico tienen mayor cantidad de hojas independientemente del muestreo (Figura 3A), el área foliar se incrementó en función del tiempo (Figura 3B). Éstas plantas colectadas en Mineral del Chico tienen mayor área foliar que las de Mineral del Monte y Huasca de Ocampo, independientemente del muestreo. El crecimiento del cultivo está determinado en primer lugar por la cantidad de radiación solar que puede interceptar y usar durante su desarrollo. Para obtener rendimientos altos las hojas deberán crecer y cubrir la mayor parte del suelo (Pereira, *et al.*, 2016).

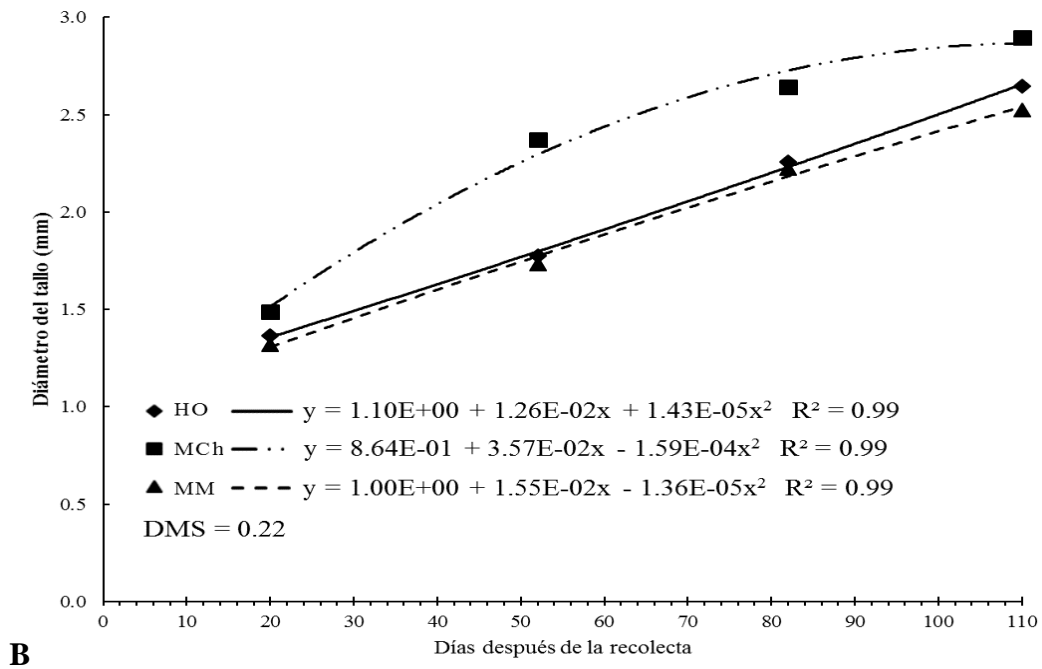
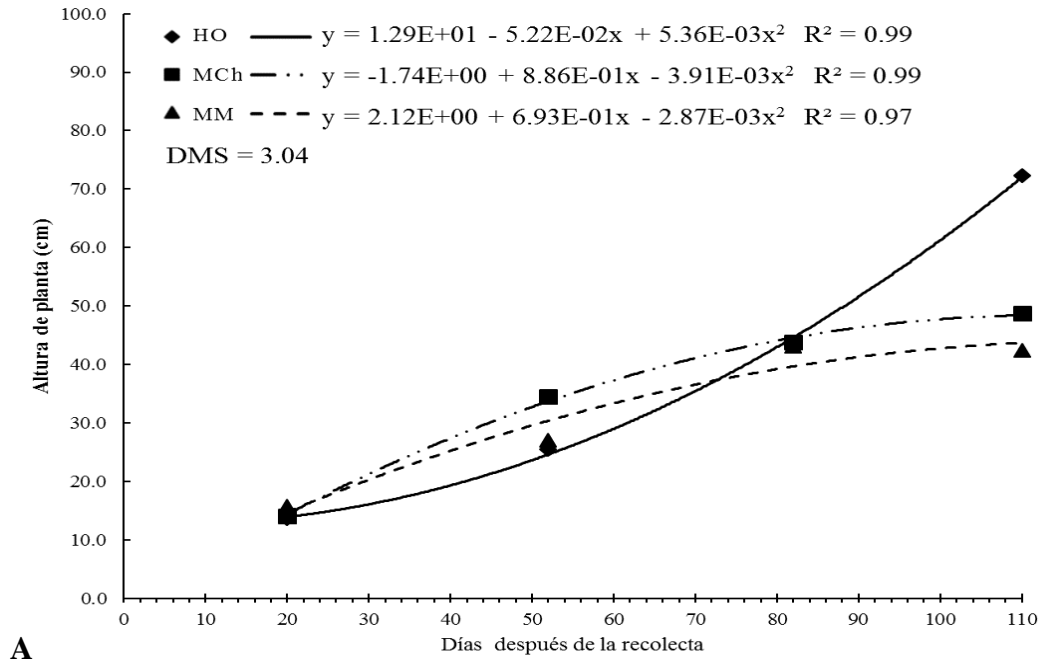
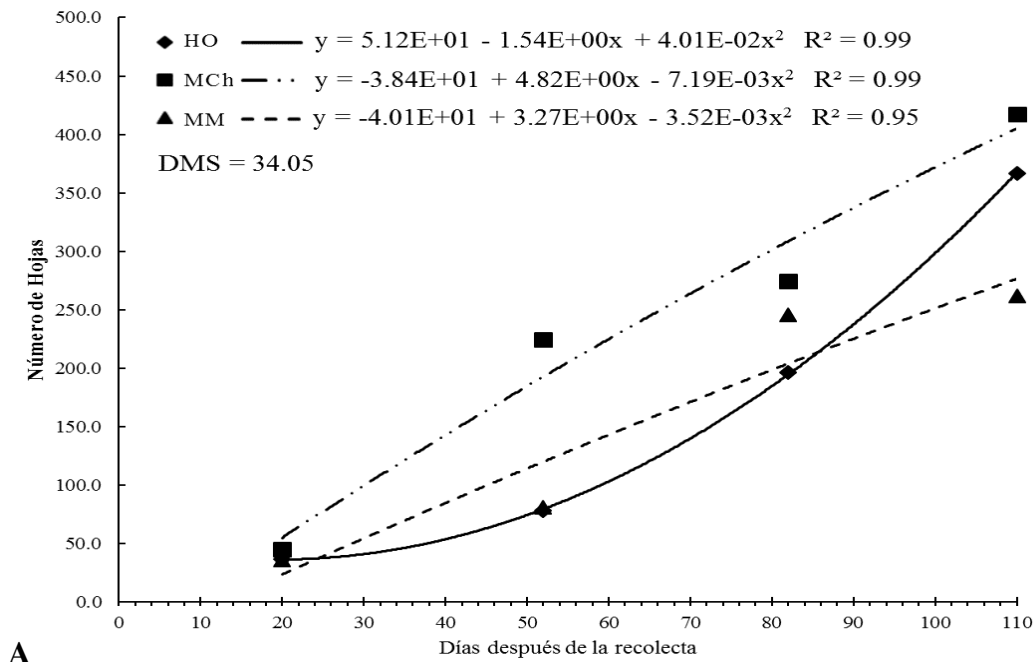
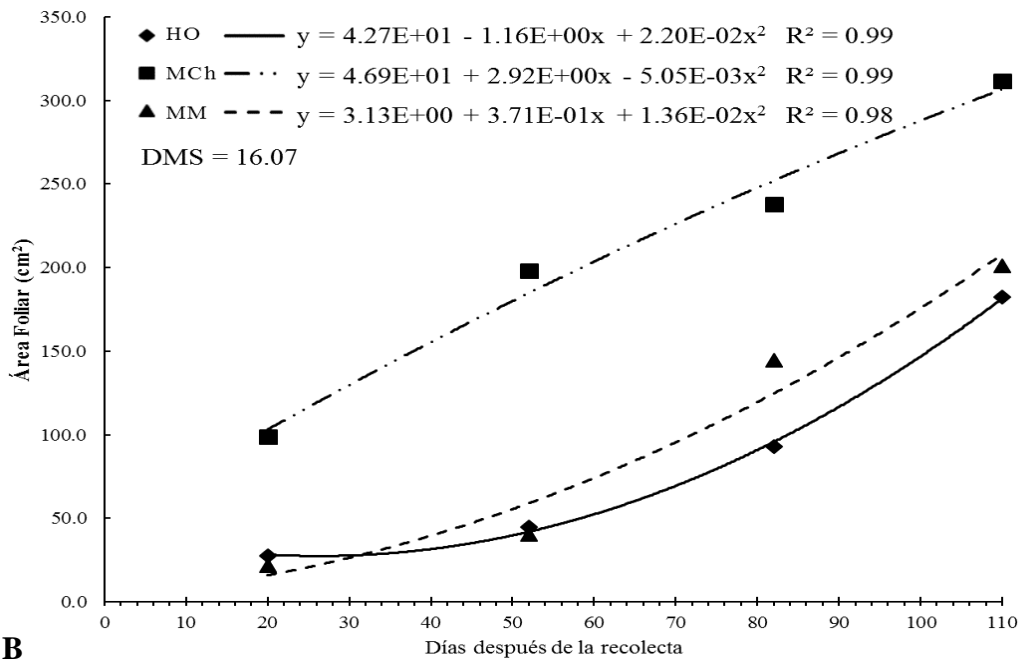


Figura 2. Dinámica de la altura (A) y diámetro del tallo (B) en *S. pilosa* en función del tiempo. HO; Huasca de Ocampo, MCh; Mineral del Chico, MM; Mineral del Monte.



A



B

Figura 3. Dinámica en el número de hojas (A) y área foliar (B) en *S. pilosa* en función del tiempo. HO; Huasca de Ocampo, MCh; Mineral del Chico, MM; Mineral del Monte.

Existe una relación mutua entre el peso seco de hojas relacionada con el número de hojas y el área foliar de las mismas. Los datos más altos en peso seco de hojas (Figura 4A) se obtuvieron en Mineral del chico independientemente del muestreo, mismo caso sucedió con la variable peso seco de tallos (Figura 4B). Al respecto Chalapathi *et al.* (1998), mencionan que el rendimiento en peso seco de *S. rebaudiana* se correlaciona positivamente con la altura de planta, número de ramas, hojas por planta y la acumulación de materia seca.

a. Índices de crecimiento

La TRC representa la eficiencia de la planta para producir nueva biomasa en un periodo determinado en función de la biomasa presente (Figura 5A). En las primeras etapas de desarrollo, *S. pilosa* colectada en Mineral del Chico presentó los valores más altos en TRC debido a la formación de biomasa nueva (aparato fotosintético). Posteriormente, las plantas disminuyen la actividad meristemática y elongación celular hacia la madurez fisiológica, debido a que algunas hojas sufrieron abscisión y otras se encontraban senescentes. Las plantas colectadas en los otros dos sitios (Huasca de Ocampo y Mineral del Monte) tuvieron una constante actividad meristemática, se incrementó la producción de órganos, la actividad fotosintética, se formaron nuevas yemas vegetativas, ramificación y estructuras de la planta. Lo que trajo como consecuencia que los fotosintatos producidos se invirtieran en mayor magnitud en mantener la estructura de la planta tal es el caso de las plantas colectadas en Huasca de Ocampo. Estudios experimentales han explorado que la TRC es fuertemente afectada por factores como luz, temperatura, CO₂, agua y nutrientes (Grubb *et al.*, 1996; Stirling *et al.*, 1998; Galmes *et al.*, 2005; Shipley, 2006).

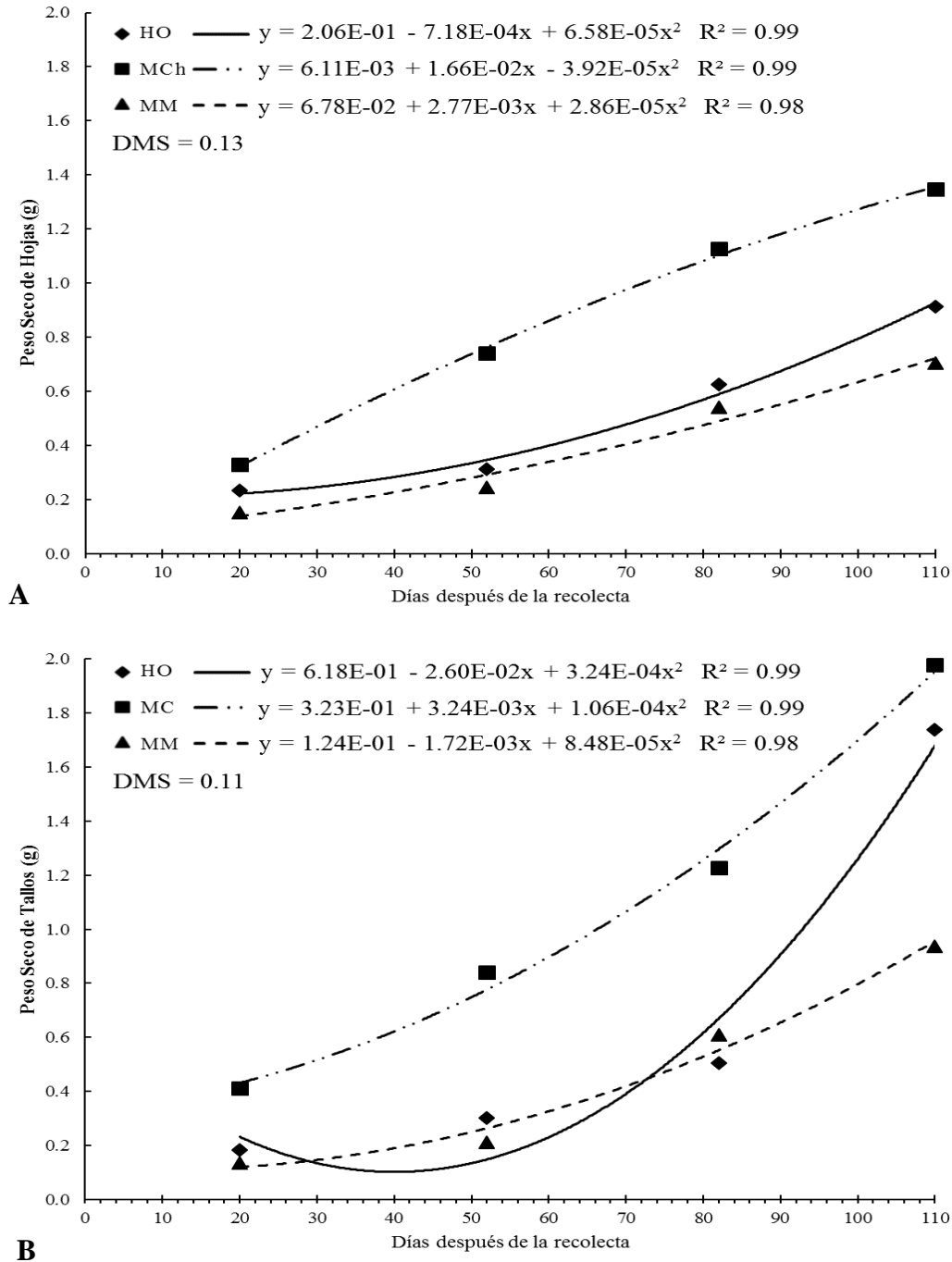


Figura 4. Dinámica de peso seco de hojas (A) y tallos (B) en *S. pilosa* en función del tiempo. HO; Huasca de Ocampo, MCh; Mineral del Chico, MM; Mineral del Monte.

La TAC determina el incremento absoluto en peso seco por unidad de tiempo. En el primer intervalo de tiempo, las plantas en Mineral del Chico tienen los mejores resultados en la TAC (Figura 5B). Al inicio del crecimiento sólo hay división celular, por lo que la fotosíntesis neta sólo

abastece la demanda existente en los dos primeros muestreos (Mineral del Chico), y para mantener dicha demanda hay mayor producción de fotosintatos en el último muestreo (Huasca de Ocampo). La TAC en Mineral del Monte se incrementó en forma lineal ascendente hasta los 62 días después de la recolecta estabilizándose ligeramente, debido a que las plantas presentaron floración. Se puede especular que la línea asíntota generada por las plantas de Mineral del Monte es debido a la limitación de recursos (agua, luz, minerales) o cambios ontogenéticos, tales como el inicio de la floración (Hunt, 2017; Damgaard y Weiner, 2008).

La TAN es uno de los principales índices fisiológicos utilizados para medir la capacidad del follaje como productor de materia seca (Iloki-Assanga *et al.*, 2013). La producción de materia seca fue significativa en el índice TAN. Los valores más altos ($5.01 \text{ mg cm}^{-2} \text{ d}^{-1}$) se obtuvieron de plantas colectadas en Mineral del Chico a los 32 días después de la recolecta (Figura 6A). En contraste, el valor de la TAN de las de Mineral del Monte fue diferente a los otros sitios, pues se obtuvo al inicio del experimento el valor más bajo ($1.51 \text{ mg cm}^{-2} \text{ d}^{-1}$) y alcanzó su máximo valor ($4.65 \text{ mg cm}^{-2} \text{ d}^{-1}$) a los 62 días después de la recolecta, lo cual indica que las plantas son menos eficientes autotróficamente y para sobrevivir depende en gran parte de las reservas de la raíz. Entre los días 62 y 90 se incrementó el valor de la TAN en plantas de Huasca de Ocampo debido al incremento de la fotosíntesis para reponer las pérdidas de biomasa debidas a la respiración y translocación de fotosintatos a órganos reproductivos. Algunos autores mencionan que el curso ontogenético de este índice fisiológico se aproxima a una “U” extendida (Moorby, 1970) o bien a una “U” invertida (Necas, 1968). La discrepancia en el comportamiento de esta variable a través del tiempo se debe en gran medida a las condiciones climáticas principalmente disponibilidad de luz (Meziane y Shipley, 1999) y nutrimentos (Shipley, 2002). En el presente estudio se puede agregar el número

de muestreos realizados y a la poca información sobre las etapas fenológicas precisas de dicha especie.

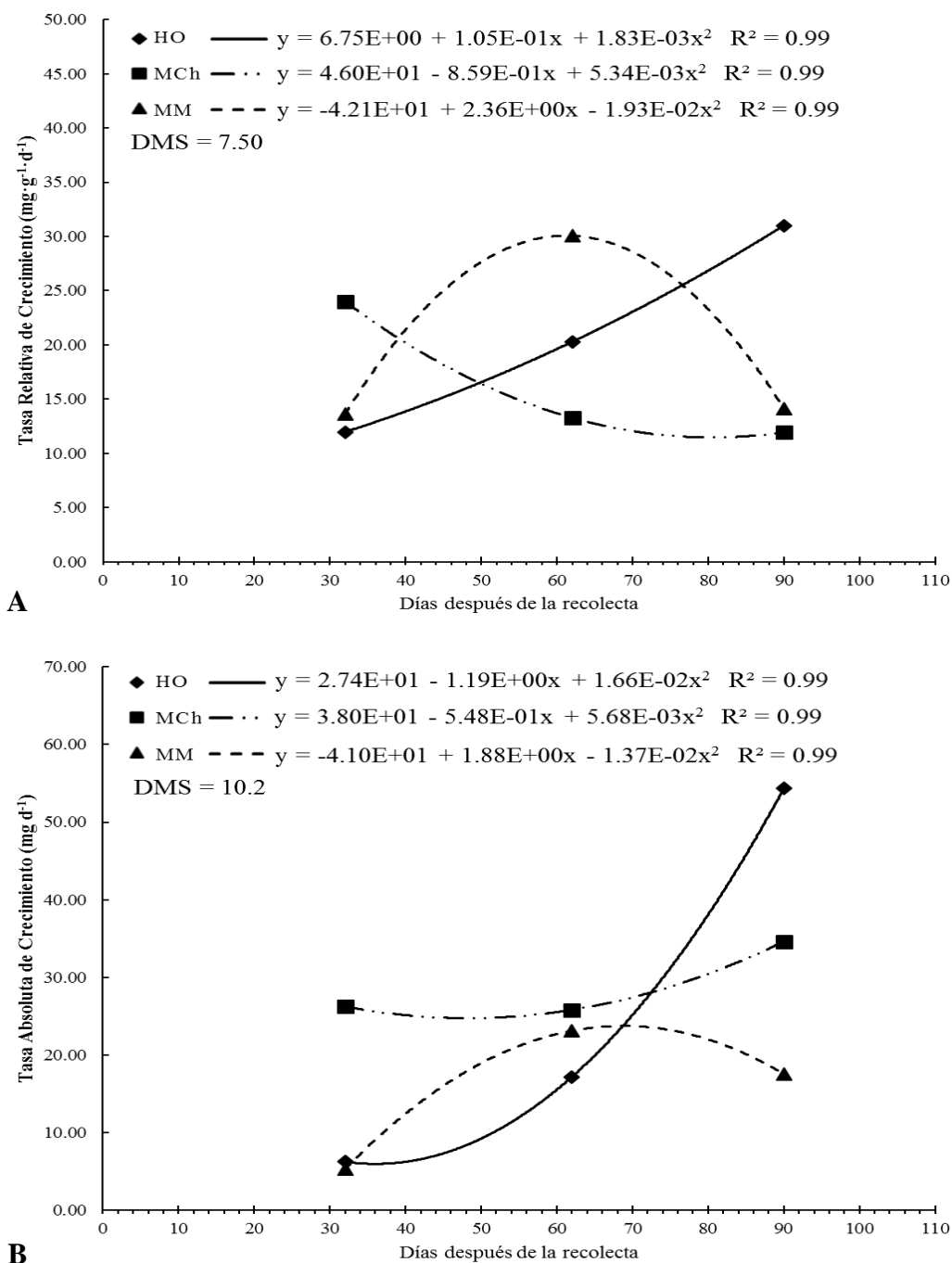


Figura 5. Tasa relativa (A) y absoluta (B) de crecimiento en plantas de *S. pilosa* durante el crecimiento en tres sitios del estado de Hidalgo. HO; Huasca de Ocampo, MCh; Mineral del Chico, MM; Mineral del Monte.

La importancia de la utilización de este índice se refiere al espesor de la hoja (AFE). Los valores más altos en AFE ($291.68 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$) se obtuvieron de las plantas colectadas en Mineral del Chico (Figura 6B), debido a que existe una alta expansión foliar, después de los 32 días después de la recolecta la AFE disminuyó de manera constante y continua hasta la floración, debido a que los fotoasimilados se distribuyen a las zonas de división y expansión celular de mayor demanda (meristemas). Sin embargo, las plantas desarrolladas en Huasca de Ocampo y Mineral del Monte se incrementan en función del tiempo, éste último tuvo el valor más alto ($324.25 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$). La AFE es el índice más sensible a cambios ambientales y más propensa a los ontogenéticos (Shipley, 1995; 2002), de manera que mucho sombreado provoca aumento en su valor y repercute negativamente en la TAN como sucedió en nuestro caso.

La RAF representa la superficie asimiladora por unidad de peso seco de ésta. La tendencia es similar a la que se observa con el AFE, esto es debido a que en mineral del chico las hojas son más grandes en el transcurso del tiempo, sin embargo, al final del muestreo son más delgadas al sombreado del dosel vegetal, ya que no tienen cobertura vegetal alrededor. Mientras que en Mineral del Monte los valores en RAF fueron más altos (Figura 7A). Se puede suponer que las necesidades metabólicas y respiratorias de la planta, son diferentes en ambientes contrastantes por lo que el aumento o disminución en el valor de la RAF significa que los cambios en el AF son mucho más críticos en floración y formación de semilla que en la fase inicial del crecimiento.

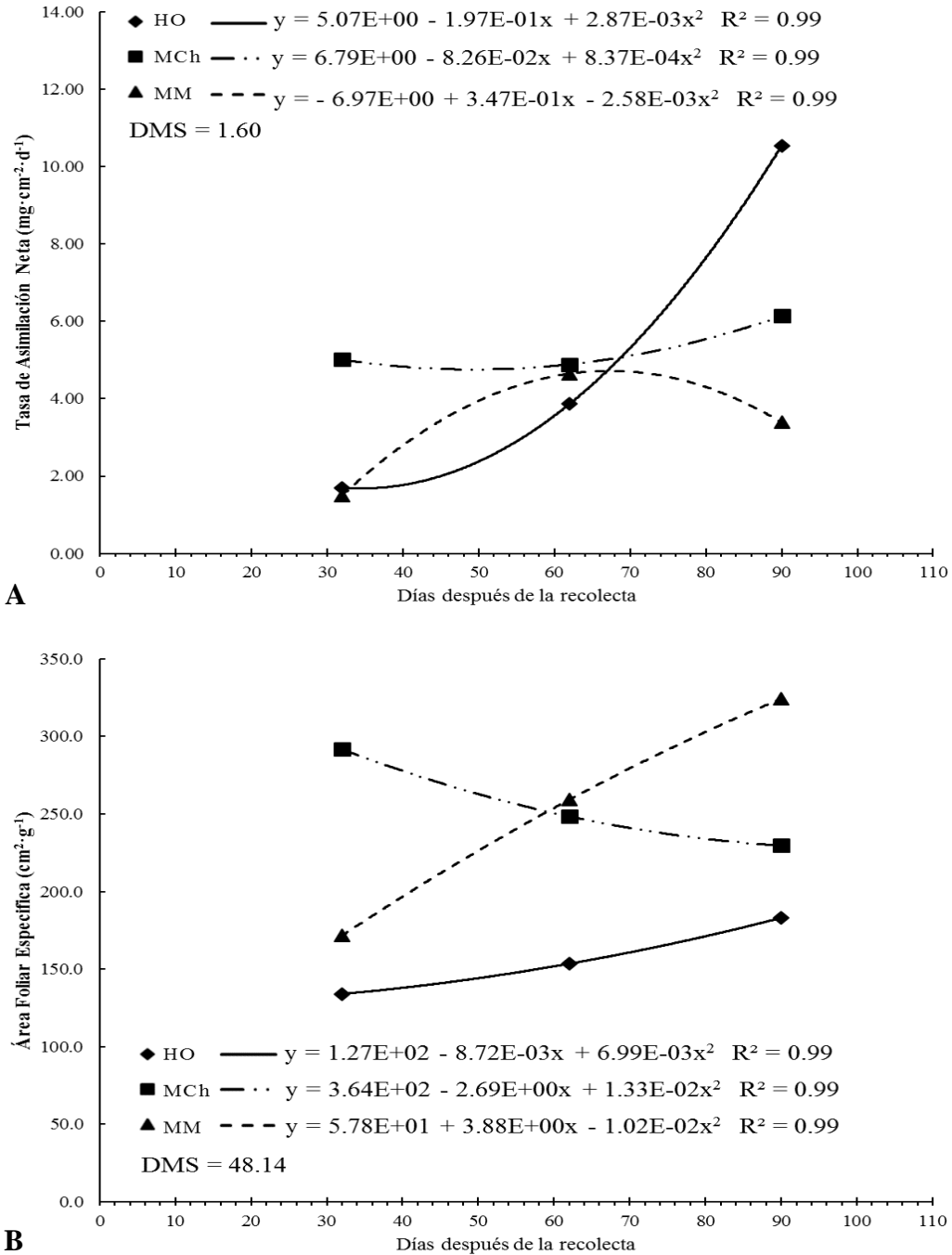
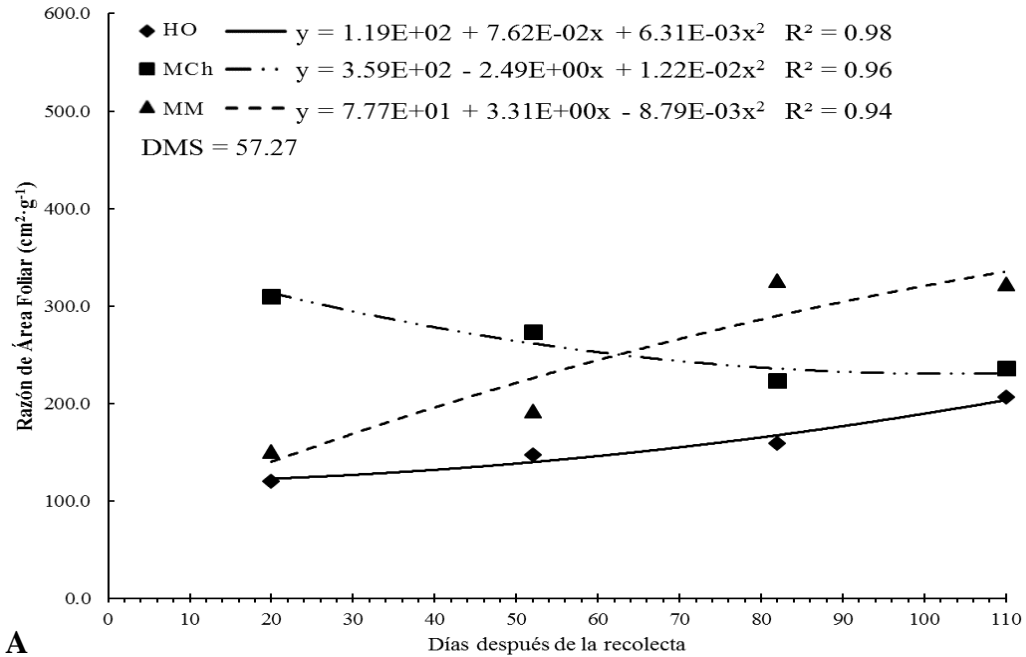
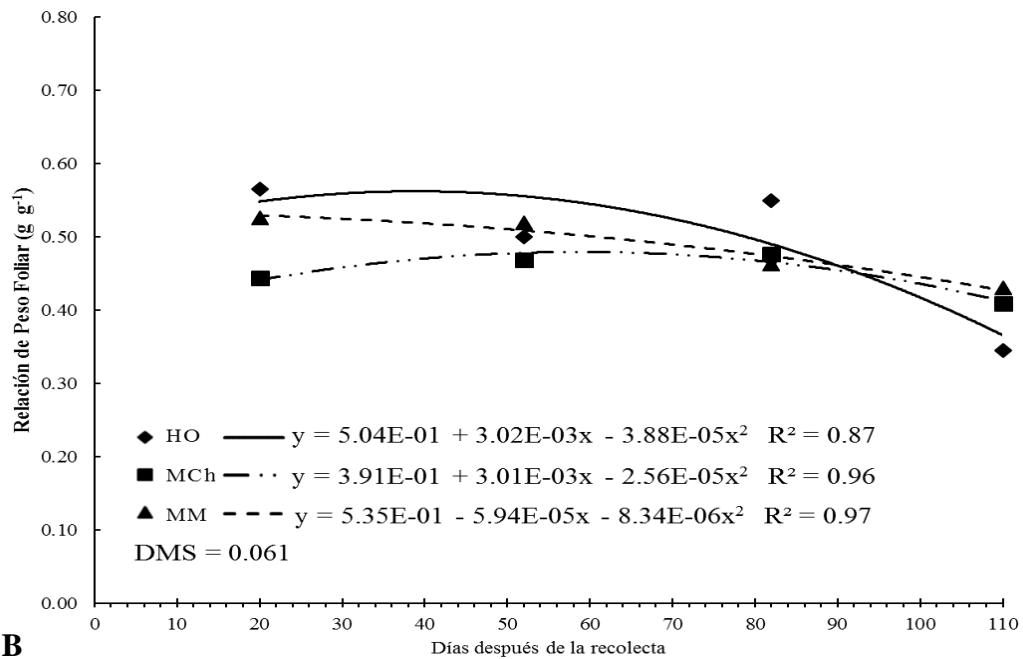


Figura 6. Tasa de asimilación neta (A) y área foliar específica (B) de crecimiento en plantas de *S. pilosa* durante el crecimiento en tres sitios del estado de Hidalgo. HO; Huasca de Ocampo, MCh; Mineral del Chico, MM; Mineral del Monte.



A



B

Figura 7. Razón de área foliar (A) y relación de peso foliar (B) en plantas de *S. pilosa* durante el crecimiento en tres sitios del estado de Hidalgo. HO; Huasca de Ocampo, MCh; Mineral del Chico, MM; Mineral del Monte.

La relación de peso foliar (RPF), representa la relación entre el peso seco de las hojas y el peso seco total y define la utilización del material asimilado para la producción de hojas. Los valores más altos en RPF se obtuvieron de las plantas desarrolladas en Huasca de Ocampo y Mineral del Monte en el primer muestreo (Figura 7B), conforme se avanza a la etapa de floración el índice decrece. La asignación de biomasa hacia las hojas tendió a disminuir debido a la capacidad intrínseca de distribución y acumulación de biomasa hacia otros órganos diferentes como los aquenios e incluso hacia las raíces.

Se han encontrado correlaciones positivas entre AFE y los contenidos de N y P (Wright *et al.*, 2001) valores altos en AFE indican menor dureza en hojas y mayor calidad nutritiva de la planta, valores más altos de RPF, muestra mayor dureza de la hoja. La información sobre *S. pilosa* es muy escasa; sin embargo, es posible afirmar que los valores significativamente mayores reflejan una mayor dureza de la hoja que puede interpretarse como una adaptación al ambiente.

Ewané *et al.*, (2012) indican que hay una alta correlación entre los índices AFE y RAF, con los componentes citoplasmáticos como proteínas, minerales y ácidos orgánicos, como es el caso de éste estudio; sin embargo, cuando los valores son bajos indican que poseen mayor cantidad de componentes de la pared celular, especialmente lignina.

6.1.5 Crecimiento e índices de eficiencia fisiológica de *S. tomentosa*

Las plantas de Mineral del Chico y Mineral del Monte casi triplicaron su altura en el periodo de evaluación, pero entre los 82 y 110 días estabilizaron su crecimiento longitudinal del tallo. En contraste, las plantas de Huasca de Ocampo aumentaron cinco veces más su altura y a los 110 días continuaba incrementando, por lo que estas plantas fueron significativamente las más altas (Figura 8A). El grosor del tallo incrementó exponencialmente en el tiempo en las plantas de Huasca de

Ocampo y Mineral del Chico. En contraste, las plantas que crecieron en Mineral del Monte tuvieron tallos hasta 40 y 50 % menos gruesos, entre los 52, 82 y 110 días que en los otros sitios (Figura 8B).

Las plantas de Mineral del Chico tuvieron el número mayor de hojas en los intervalos de 52 y 82 días, pero a los 110 días las plantas de Huasca de Ocampo aumentaron notablemente. Los tres sitios no mostraron decaimiento en la producción de hojas (Figura 9A). El área foliar también se incrementó linealmente en función del tiempo. Las plantas de Mineral del Chico tuvieron entre el doble y hasta cuatro veces más área foliar, en comparación con los otros sitios, entre los 52 y 110 días (Figura 9B), ésta estructura del dosel vegetal está íntimamente relacionado con el arreglo espacial de las hojas, actúa como un captador de radiación, ejerce influencia en la temperatura; concentración de vapor y régimen de radiación; afecta los procesos de fotosíntesis, transpiración, crecimiento y competencia entre especies (Daughtry *et al.*, 1983; Montemayor *et al.*, 2006). La producción de materia seca está estrechamente vinculada con el aprovechamiento de la radiación solar incidente, también de la capacidad del dosel para interceptarla y transformarla (Jarma *et al.*, 2010).

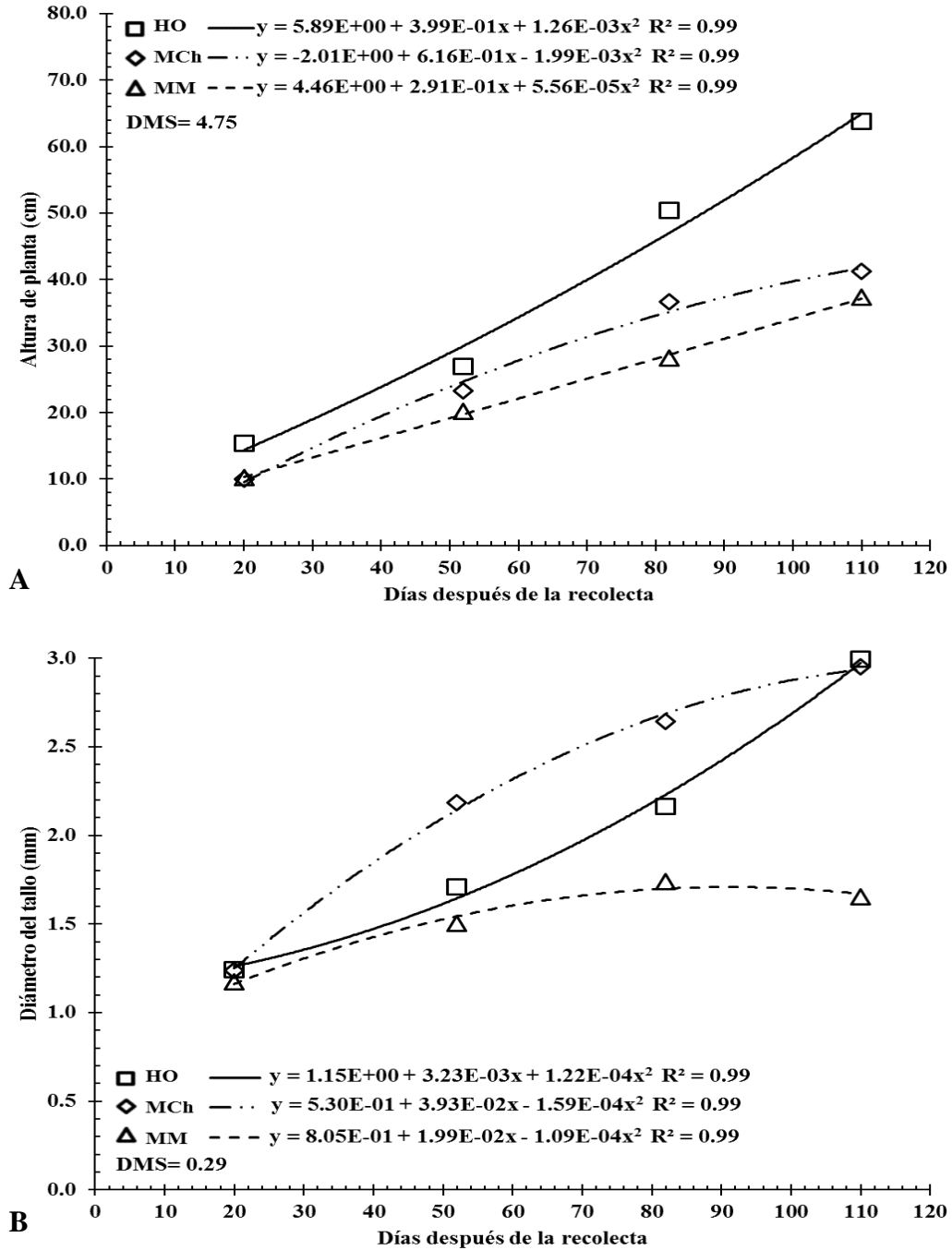


Figura 8. Altura (A) y diámetro (B) en tallos de *S. tomentosa* durante el crecimiento en tres sitios del estado de Hidalgo. HO; Huasca de Ocampo, MCh; Mineral del Chico, MM; Mineral del Monte.

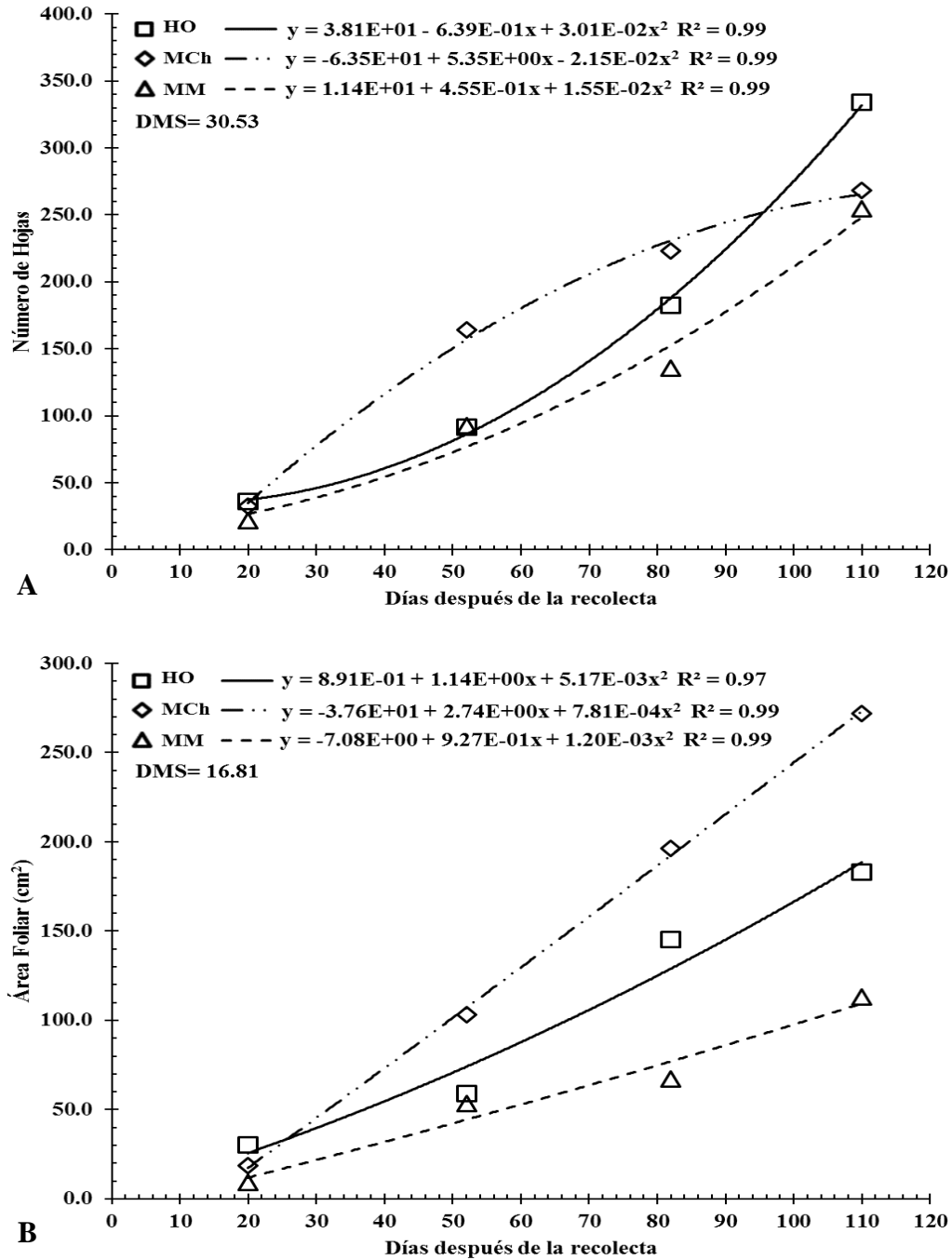


Figura 9. Número de hojas (A) y área foliar (B) en *S. tomentosa* durante el crecimiento en tres sitios del estado de Hidalgo. HO; Huasca de Ocampo, MCh; Mineral del Chico, MM; Mineral del Monte.

Los valores más sobresalientes de materia seca en hojas fueron de las plantas de Mineral del Chico entre los 52 y 110 días, sin embargo, al final del muestreo no hubo diferencias entre éstas y Huasca de Ocampo (Figura 10A); mientras que los tallos de las plantas de Huasca de Ocampo fueron al final mejores en comparación con los otros sitios (Figura 10B). La cantidad de radiación solar absorbida por el dosel vegetal y la utilización de esta energía en el crecimiento vegetal constituyen los procesos biofísicos que controlan la producción de biomasa y el rendimiento de los cultivos a una tasa potencial (De la Casa *et al.*, 2011), como sucede con las plantas de Huasca de Ocampo y Mineral del Chico.

El incremento en biomasa de la planta por unidad de tiempo (TAC) mostró tendencia similar en los sitios de Mineral del Chico y Mineral del Monte. A los 30 días las plantas de Mineral del Chico y Mineral del Monte mostraron la mayor TAC y a los 62 días hubo un descenso, posteriormente el incremento fue relativamente poco hasta los 110 días (Figura 11B). Sin embargo, las plantas de Huasca de Ocampo tuvieron cerca del doble y hasta triple TAC respecto a los otros sitios en los muestreos posteriores. La biomasa seca de la planta estuvo relacionado directamente con el incremento del área foliar, por ejemplo, al inicio sólo hubo división celular, por lo que la fotosíntesis neta sólo abasteció la demanda existente en los dos primeros muestreos. El incremento de la biomasa en la TAC fue lineal, esto se puede deber que las plantas de Huasca de Ocampo estaban en la etapa de floración, pero no se observaba formación de aquenios, y la energía asignada en forma de fotoasimilados se trasladaron a órganos de mayor demanda y al mantenimiento de la estructura formada previamente.

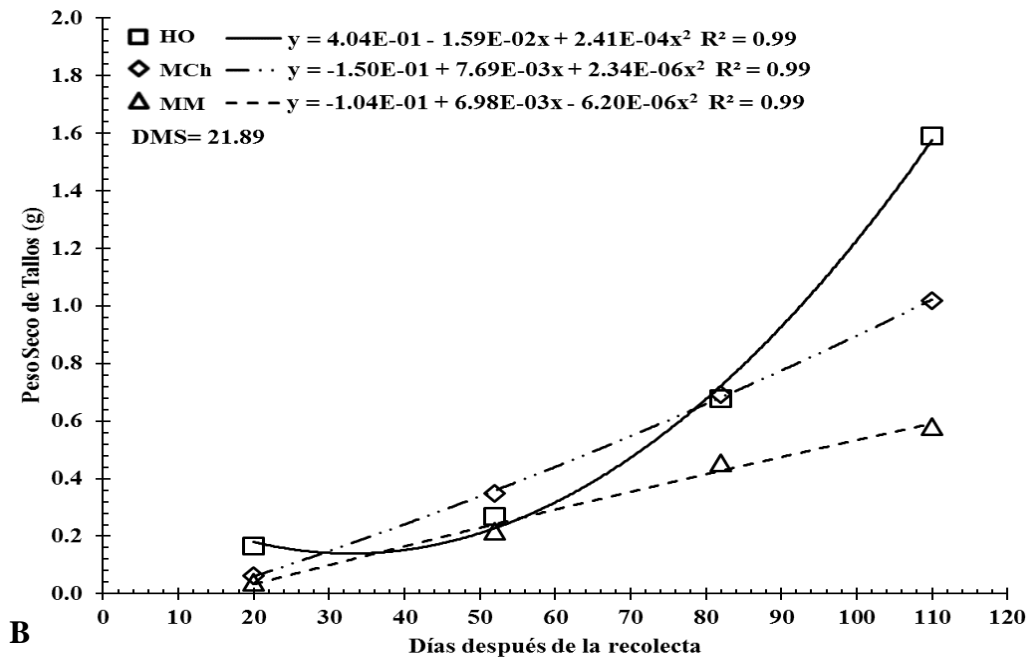
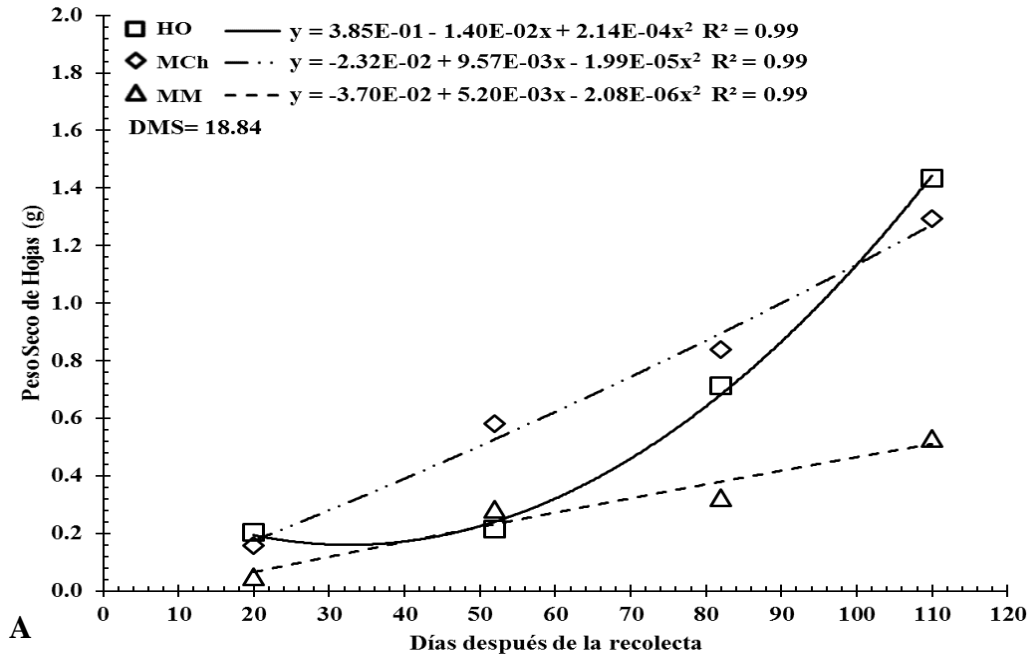


Figura 10. Materia seca de hojas (A) y tallo (B) durante el crecimiento de *S. tomentosa* en tres sitios del estado de Hidalgo. HO; Huasca de Ocampo, MCh; Mineral del Chico, MM; Mineral del Monte.

a. Índices de eficiencia fisiológica

En las primeras etapas de desarrollo, *S. tomentosa* en Mineral del Chico y Mineral del Monte mostró los valores mayores de TRC (Figura 11A). Esto como el resultado de la formación de biomasa nueva, que incluye estructuras fotosintéticas. Luego, con la madurez fisiológica disminuye la actividad meristemática, y como se observó en las plantas de ese sitio, se acelera la abscisión de las hojas y otras se muestran senescentes (Muhammad *et al.*, 2014). En contraste, las plantas de Huasca de Ocampo duplicaron la TRC a los 62 días, como mantenimiento de la actividad meristemática, incremento de la producción de órganos y la actividad fotosintética, con la formación de yemas vegetativas nuevas y otras estructuras de la planta. En consecuencia, los fotosintetizados producidos se invertirán en el mantenimiento de las estructuras de la planta.

La producción de materia seca en el índice TAN fue similar a lo obtenido de la TAC. Aunque estos índices no se aproximan a la forma de una “U” extendida, debido a los pocos muestreos realizados y en gran medida a las condiciones climáticas, se podría suponer que las plantas son menos eficientes autotróficamente y para sobrevivir depende en gran parte de las reservas de la raíz, caso Mineral del Chico y Mineral del Monte (Figura 12A). Los valores más altos de TAN ($11.5 \text{ mg cm}^{-2} \text{ d}^{-1}$) se obtuvieron a los 90 días de plantas recolectadas de Huasca de Ocampo. El comportamiento de la TAN en Huasca de Ocampo fue diferente a los otros sitios, el valor más pequeño ($0.92 \text{ mg cm}^{-2} \text{ d}^{-1}$) fue aumentando y alcanzó su máximo valor en el intervalo de 82 y 110 días.

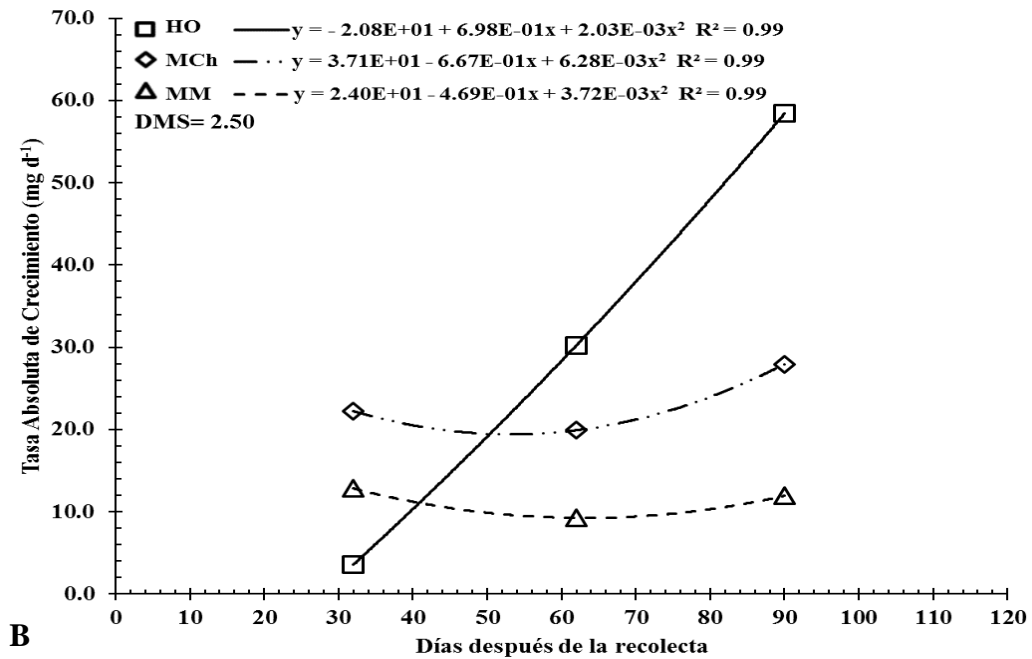
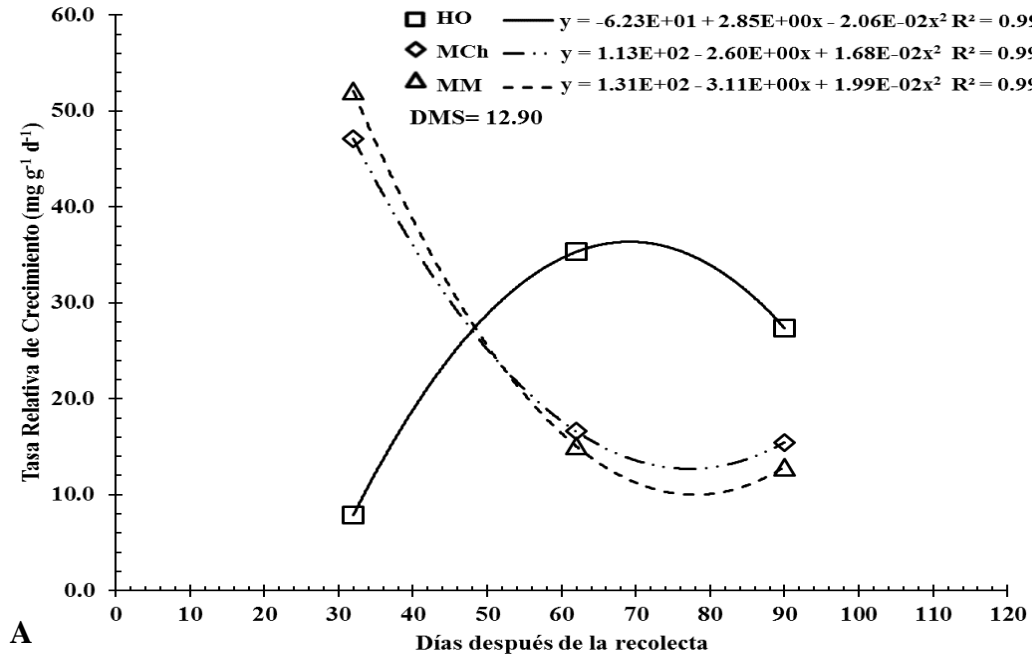


Figura 11. Tasa relativa (A) y absoluta (B) de crecimiento de plantas de *S. tomentosa* durante el crecimiento en tres sitios del estado de Hidalgo. HO; Huasca de Ocampo, MCh; Mineral del Chico, MM; Mineral del Monte.

El AFE es más sensible a cambios ambientales y ontogenéticos, éste índice fue diferente en los tres sitios. Los valores más altos en AFE ($364.78 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$) correspondieron a las plantas de Mineral del Monte a los 32 días (Figura 12B). Como resultado de alta expansión foliar, el AFE disminuyó hasta la floración, que es el evento en donde los fotoasimilados se distribuyen a las zonas con mayor demanda. En las plantas de Huasca de Ocampo se muestra una estabilidad en el AFE entre los 32 y 62 días; posteriormente desciende hacia la etapa de floración. Mientras que en Mineral del Chico la AFE se incrementó con el tiempo.

La tendencia es similar a la que se observa con el AFE (Figura 13A). En las plantas de Mineral del Monte se obtuvo el valor mayor en RAF ($507.58 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$), cuando las plantas empiezan a crecer, el área foliar alcanza su punto máximo para sostener la demanda existente de los órganos en crecimiento, después del punto máximo tiende a disminuir, posteriormente se incrementa gradualmente para satisfacer las necesidades de los órganos de mayor demanda (la formación de flores y achenios). Mientras que en Huasca de Ocampo y Mineral del Chico los valores en RAF fueron más bajos. Suponiendo que las necesidades respiratorias y metabólicas de las plantas eran iguales en ambos sitios, este cambio en la RAF respecto a las plantas de Mineral del Monte indica que los cambios ocurridos en el área foliar durante la fase vegetativa son menos críticos que los sucedidos durante la formación y crecimiento de flores y achenios en Mineral del Monte.

Los valores más altos de material asimilatorio para desarrollo de follaje (RPF) se obtuvieron de las plantas de Mineral del Chico independientemente del muestreo (Figura 13B). En los tres sitios los mejores resultados fueron al inicio de la fase vegetativa, conforme se avanza a la etapa de floración el índice decrece. La asignación de biomasa hacia las hojas disminuye debido a la capacidad intrínseca de distribución y acumulación de biomasa hacia otros órganos como los achenios e incluso hacia las raíces.

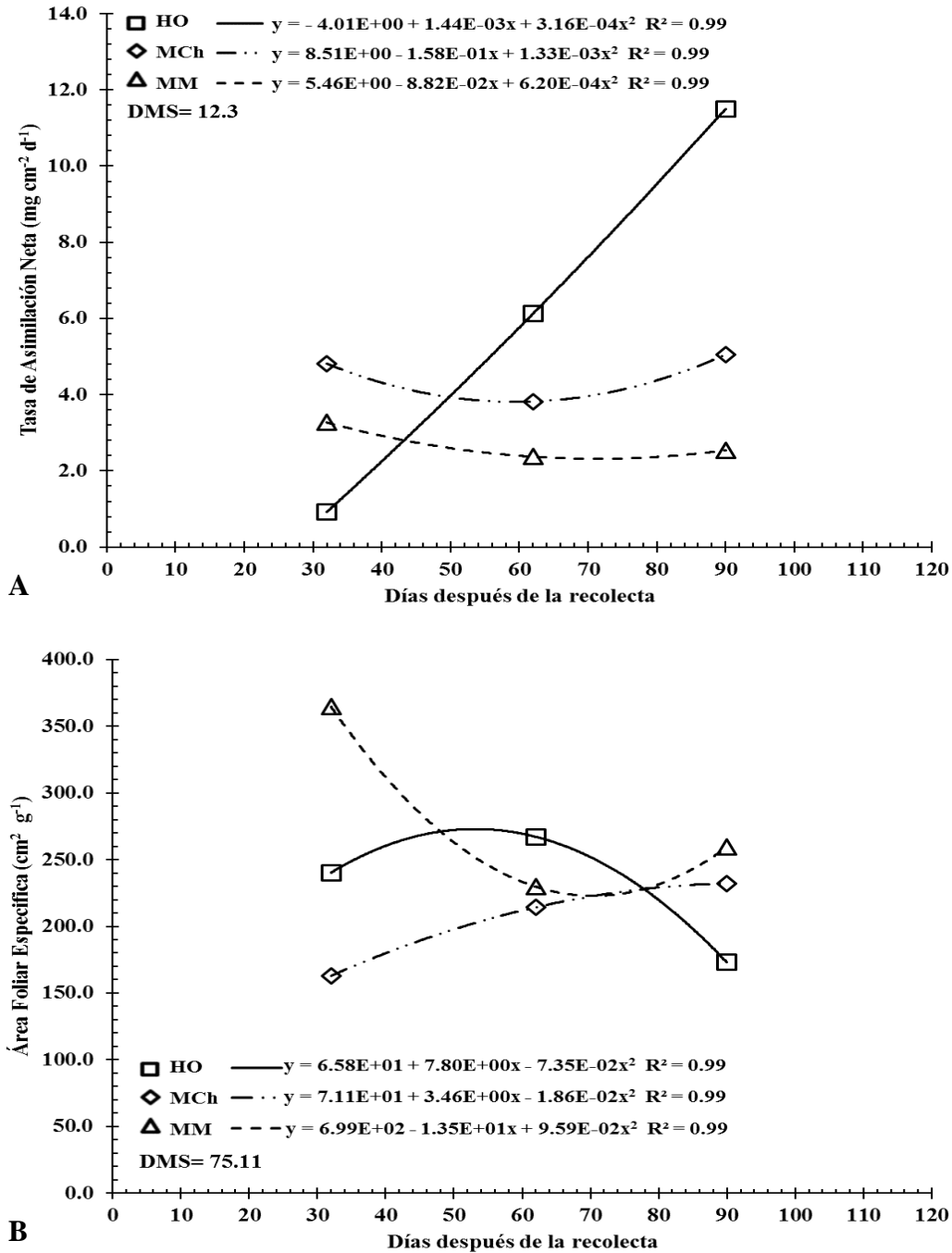


Figura 12. Tasa de asimilación neta (A) y área foliar específica (B) en *S. tomentosa* durante el crecimiento en tres sitios del estado de Hidalgo. HO; Huasca de Ocampo, MCh; Mineral del Chico, MM; Mineral del Monte.

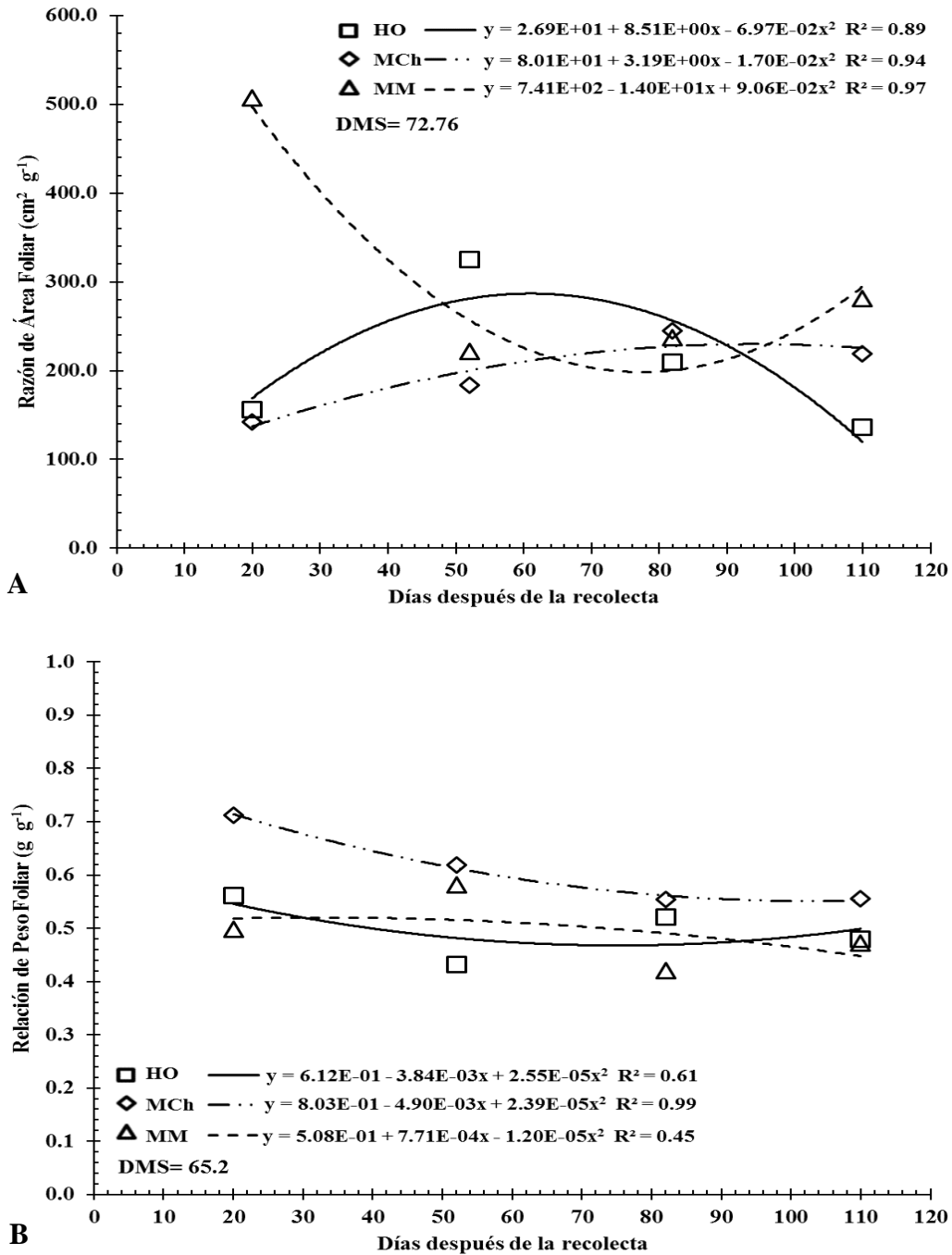


Figura 13. Razón de área foliar (A) y relación de peso foliar (B) en *S. tomentosa* durante el crecimiento en tres sitios del estado de Hidalgo. HO; Huasca de Ocampo, MCh; Mineral del Chico, MM; Mineral del Monte.

La habilidad de la planta para producir y mantener activa el área foliar, asimilar (Valladares y Brittes 2004) y acumular la biomasa está íntimamente relacionada con la duración de ésta (Jarma *et al.*, 2005); además con la radiación total interceptada (Kikuzawa, 2003), por lo que los índices AFE, RAF y RPF están íntimamente relacionados con el hábitat donde se encuentran las especies de *Stevia*.

6.2 Efecto de soluciones nutritivas en el desarrollo de *S. pilosa* y *S. tomentosa* en invernadero

Durante el experimento se observaron diferencias entre especies y la aplicación de las soluciones y el análisis estadístico demostró diferencias entre muestreos y variables en función de los tratamientos evaluados (Cuadro 11). Las variables evaluadas al inicio del ciclo del cultivo no fueron estadísticamente significativas en función de los tratamientos y final como en el caso de la longitud radical al final del ciclo. Sin embargo, en el último muestreo se obtuvieron diferencias estadísticas en todas las variables evaluadas.

Cuadro 11. Significancia estadística de las especies de *Stevia*, soluciones nutritivas y la interacción de éstas en las variables de crecimiento.

FV.	ALT		LR		DIA		Ni	Po	Ca	AF		PSH		PST		PSR	
	I	F	I	F	I	F				I	F	I	F	I	F	I	F
F1	ns	**	ns	ns	ns	**	**	**	ns	ns	**	Ns	**	ns	**	ns	**
F2	ns	**	ns	ns	ns	**	**	**	**	ns	**	Ns	**	ns	**	ns	*
F1×F2	ns	**	ns	ns	ns	**	**	**	**	ns	**	Ns	**	ns	**	ns	**
CV (%)	2.7	12.4	3.7	12.7	7.4	7.3	21.4	7.9	9.3	7.4	26.9	12.8	29.4	28.42	29.9	12.5	30.7

** : Altamente significativo, * : significativo, ns : no significativo, FV : fuente de variación, F1 : Factor especie, F2 : Factor Soluciones nutritivas, F1×F2 : interacción de los factores, CV : coeficiente de variación, I : inicio, F : final, ALT : altura de planta, LR : longitud radical, DIA : diámetro del tallo, Ni : nitratos, Po : potasio, Ca : calcio, AF : área foliar, PSH : peso seco de hojas, PST : tallos, PSR : raíz.

En el análisis de comparación de medias por la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$) los resultados obtenidos en el primer muestreo no se encontró diferencias estadísticas en las variables de crecimiento (Cuadro 12). Pero en el último muestreo se puede observar que con la solución Steiner

se obtienen los mejores resultados sobre las variables altura de planta y diámetro del tallo en *S. tomentosa*, mientras que en la longitud radical no se encontraron diferencias estadísticas.

Cuadro 12. Efecto de la solución nutritiva en altura, longitud radical y diámetro del tallo de especies de *Stevia*.

Especie	Solución	Altura (cm)		Longitud (cm)		Diámetro (mm)	
		Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
<i>S. pilosa</i>	EFLU	9.1a [§]	23.12c	7.8a	23.75a	1.3a	2.059d
		(±0.26)	(±4.1)	(±0.33)	(±4.7)	(±0.10)	(±0.21)
	STE	8.9a	22.95c	7.8a	24.08a	1.3a	2.571ab
<i>S. pilosa</i>	EXT	(±0.22)	(±4.5)	(±0.29)	(±3.2)	(±0.09)	(±0.22)
		8.9a	26.35b	7.9a	25.79a	1.3a	2.455b
	EFLU	9.1a	18.2d	7.9a	23.81a	1.3a	1.798e
<i>S. tomentosa</i>	STE	(±0.22)	(±2.5)	(±0.28)	(±2.0)	(±0.07)	(±0.15)
		8.9a	35.48a	7.8a	25.49a	1.3a	2.641a
	EXT	8.9a	28.31b	7.9a	24.51a	1.3a	2.224c
		(±0.22)	(±1.4)	(±0.26)	(±1.9)	(±0.10)	(±0.11)

EFLU: efluente de vermicompost, STE: solución Steiner, EXT: extracto de vermicompost. [§]Medias con letras iguales dentro de las columnas, son estadísticamente similares (Duncan, $\alpha=0.05$). \pm represente la desviación estándar.

La mayor concentración de nitratos y calcio se obtuvo con la solución Steiner, mientras que potasio fue con efluente de vermicompost (Cuadro 13). *S. tomentosa* tuvo la concentración más alta de nitratos (123380 mg kg⁻¹). En el primer muestreo, el área foliar no presentó diferencias estadísticas, pero sí se observó diferencias entre especies, siendo *S. tomentosa* con mayor cobertura vegetal utilizando la solución Steiner con 67.1 cm². El contenido de nutrientes, reguladores de crecimiento y microorganismos benéficos que contiene el extracto de vermicompost como se ha documentado (Atiyeh *et al.*, 2002a; Ingham, 2005; Pant *et al.*, 2009) no provocó un efecto significativo en ninguna de las dos especies de *Stevia*.

Cuadro 13. Efecto de la solución nutritiva en la concentración de nitratos, potasio y calcio en extracto de tallos y área foliar en especies de *Stevia*.

Especie	Solución	Inometros (ppm)			Área Foliar (cm ²)	
		Nitratos	Potasio	Calcio	Inicial	Final
<i>S. pilosa</i>	EFLU	2186e	4760a	530d	10.1a	21.3c
		(±590.05)	(±384.27)	(±29.08)	(±0.61)	(±3.9)
	STE	48380c	2020f	2106a	9.9a	20.8c
		(±8149.39)	(±191.56)	(±192.35)	(±0.70)	(±5.5)
	EXT	16120d	4520b	1344c	9.6a	22.9c
		(±1403.01)	(±361.48)	(±68.51)	(±0.96)	(±7.1)
<i>S. tomentosa</i>	EFLU	5640e	2360e	626d	9.9a	15.9c
		(±1446.22)	(±51.64)	(±76.19)	(±0.80)	(±4.0)
	STE	123380a	3060c	1434c	10.3a	67.1a
		(±17780.94)	(±217.05)	(±23.66)	(±0.65)	(±11.8)
	EXT	82320b	2760d	2024b	10.1a	52.7b
		(±14298.78)	(±183.79)	(±215.98)	(±0.65)	(±15.0)

EFLU: efluente de vermicompost, STE: solución Steiner, EXT: extracto de vermicompost. [§]Medias con letras iguales dentro de las columnas, son estadísticamente similares (Duncan, $\alpha=0.05$). \pm represente la desviación estándar.

La materia seca de hojas, tallo y raíz, se incrementó con la aplicación de la solución Steiner seguida del extracto de vermicompost, mientras que el tratamiento con efluente generó plantas con valores más bajos (Cuadro 14). Las plantas más vigorosas (más follaje) fueron de *S. tomentosa*, con los mejores resultados en materia seca de hojas, tallo y raíz se obtuvieron con Steiner; 657.0g, 913.4g y 885.1 g, respectivamente. Aunque se ha documentado que los extractos de vermicompost tienen una alta calidad biológica, en el presente trabajo no se encontró un efecto significativo en *Stevia* (Scheuerell y Mahaffee, 2002; NOSB, 2004; Ingham, 2005; Pant *et al.*, 2009; Pant *et al.*, 2012) de ahí que se destaque la importancia de los materiales de inicio para el proceso de compostaje y vermicompostaje.

Cuadro 14. Efecto de la solución nutritiva en altura, longitud radical y diámetro del tallo en especies de *Stevia*.

Especie	Solución	Hojas (mg)		Tallo (mg)		Raíz (mg)	
		Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
<i>S. pilosa</i>	EFLU	34.7a	119.4c	22.9a	251.0c	26.9a	426.1c
		(±4.20)	(±47.82)	(±7.20)	(±94.33)	(±3.63)	(±211.93)
	STE	31.7a	176.2c	23.6a	238.9c	27.3a	249.3d
		(±1.72)	(±48.31)	(±7.71)	(±56.92)	(±3.97)	(±94.49)
	EXT	33.9a	202.7c	20.2a	273.1c	25.0a	312.9cd
		(±4.20)	(±58.23)	(±2.45)	(±69.37)	(±2.54)	(±101.77)
<i>S. tomentosa</i>	EFLU	34.1a	187.7c	20.4a	226.6c	25.8a	425.1c
		(±5.10)	(±91.12)	(±4.81)	(±76.65)	(±3.02)	(±145.68)
	STE	31.7a	657.0a	22.3a	913.4a	26.7a	885.1a
		(±4.74)	(±123.9)	(±6.52)	(±236.43)	(±2.91)	(±160.69)
	EXT	33.7a	518.3b	22.2a	484.0b	27.7a	666.9b
		(±4.77)	(±135.06)	(±7.06)	(±76.64)	(±3.68)	(±164.07)

EFLU: efluente de vermicompost, STE: solución Steiner, EXT: extracto de vermicompost. [§]Medias con letras iguales dentro de las columnas, son estadísticamente similares (Duncan, $\alpha=0.05$). ± represente la desviación estándar.

Los resultados obtenidos muestran evidencia que la solución Steiner es suficiente para el desarrollo de las especies evaluadas, ya que con éste se obtienen resultados sobresalientes en algunas variables. Por el contrario, al utilizar efluente y extracto de vermicompost no favorece el desarrollo de las dos especies de *Stevia*. Resultados similares se obtuvieron en menta (Romero *et al.*, 2013), el agregar efluentes al sistema de riego inhibió el crecimiento de las plantas y por consecuencia el peso en materia seca.

6.3 Efecto de sustratos orgánicos en el crecimiento de *S. pilosa* y *S. tomentosa*

6.3.1 Análisis de componentes principales (ACP)

Los resultados de la presente investigación se interpretaron con base en los eigenvalores (autovalores) y eigenvectores (Afifi *et al.*, 2012). Los primeros tres componentes principales (CP) explicaron 83.72 % de la variación total. La matriz de correlación mostró que 46 valores (50.55 %) fueron estadísticamente significativos, lo que confirmó correlación significativa en la mayoría de las características evaluadas (Siswadi *et al.*, 2012). Las variables de mayor y menor participación pueden deberse principalmente a las similitudes entre las especies y a la reacción parecida entre ellas al ambiente de cultivo y la presencia de vermicompost.

Con el ACP se identificaron grupos de comportamiento fisiológico y de crecimiento en las plantas. El NH, AF, PSH, PST y PSR fueron las características con mayor valor descriptivo del CP 1, el que se denominó “componente de crecimiento” (Cuadro 15), que representa el incremento en biomasa y número de los diferentes órganos de la planta, como hojas, tallo y raíz.

Los valores significativos en el CP 2 permitieron identificar su relación con “eficiencia y potencial fotosintético” de las plantas para producir tejido nuevo. Las variables con valor relativo mayor en este CP fueron TRC, AFE y RAF (Cuadro 15). En el CP 3 la variable principal que lo conformo permitió denotarlo como CP de “masa foliar”, en este CP sólo fue significativo la RPF. Esto mostró la dependencia del desarrollo foliar de las plantas en función de la proporción de vermicompost aplicada para el crecimiento de la planta.

Cuadro 15. Vectores propios para las variables respuesta de dos especies de *Stevia* en función de la proporción de vermicompost.

Variables	Componente de crecimiento	Eficiencia fotosintética	Masa foliar
ALT (cm)	0.30	0.06	-0.33
LR (cm)	0.26	-0.28	-0.12
NH	0.34 [§]	0.11	0.05
DIA (mm)	0.29	0.16	-0.23
AF (cm ²)	0.33 [§]	0.18	0.05
PSH (g)	0.32 [§]	0.06	0.27
PST (g)	0.33 [§]	0.08	-0.02
PSR (g)	0.33 [§]	-0.09	-0.03
TRC (g g ⁻¹ d ⁻¹)	-0.14	0.47 [§]	0.19
TAC (g d ⁻¹)	0.30	0.20	0.21
TAN (g cm ⁻² d ⁻¹)	0.25	0.21	0.22
AFE (cm ² g ⁻¹)	-0.14	0.55 [§]	-0.21
RAF (cm ² g ⁻¹)	-0.12	0.45 [§]	-0.37
RPF (g g ⁻¹)	-0.10	0.14	0.66 [§]

§ Coeficientes con mayor valor absoluto cercano a 1 para describir al componente principal. ALT: altura de la planta, LR: longitud radical, NH: número de hojas, DIA: diámetro del tallo, AF: área foliar, PSH: peso seco de hojas, PST: peso seco de tallos, PSR: peso seco de raíz, TRC: tasa relativa de crecimiento, TAC: tasa absoluta de crecimiento, TAN: tasa de asimilación neta, AFE: área foliar específica, RAF: razón de área foliar y RPF: relación peso foliar.

En el análisis de varianza se detectaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en la mayoría de las variables de mayor influencia en la definición de los componentes principales para las fuentes de variación. Las dos especies de *Stevia* tuvieron diferentes respuestas en función de la proporción de vermicompost; sin embargo, la interacción entre especie y sustrato no tuvo efecto significativo sobre la tasa relativa de crecimiento (Cuadro 16). Con base en estos resultados se puede concluir que factores como agua, luz, nutrientes, microorganismos no modificaron el peso seco en el componente de eficiencia fotosintética.

Cuadro 16. Significancia estadística para las variables con mayor peso en tres componentes principales en la producción de *Stevia* en función de la proporción de vermicompost.

Fuente de variación	Componente del crecimiento					Eficiencia fotosintética		Masa foliar	
	NH	AF cm ²	PSH g	PST g	PSR g	TRC g g ⁻¹ d ⁻¹	AFE cm ² g ⁻¹	RAF cm ² g ⁻¹	RPF g g ⁻¹
Especie	**	**	**	**	**	*	**	**	**
Sustrato	**	**	**	**	**	**	**	**	**
Especie × sustrato	**	**	**	**	**	ns	**	**	**

*, ** Significancia estadística a una probabilidad de 0.05 y 0.01, respectivamente. ns: no significativo; NH: número de hojas; AF: área foliar; PSH: peso seco de hojas; PST: peso seco de tallos; PSR: peso seco de raíz; TRC: tasa relativa de crecimiento; AFE: área foliar específica; RAF: razón de área foliar; RPF: relación peso foliar.

Con base en la prueba de Duncan ($P \leq 0.05$) hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos. El porte de las plantas de *Stevia* se modificó como respuesta a los sustratos utilizados. La variación en peso seco de los órganos (componente del crecimiento) refleja a nivel fisiológico los cambios bioquímicos que se manifiestan en función de la nutrición (Barraza *et al.*, 2004). Los datos del Cuadro 3 muestran que el aumento en la cantidad de vermicompost tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de los órganos, ya que en las dos especies de *Stevia* no se encontraron diferencias estadísticas en el NH con el 75 y 100 % de vermicompost; sin embargo, la biomasa aérea en *S. tomentosa* aumentó con 100 % de vermicompost. Los valores más altos de PST se obtuvieron en *S. pilosa* con 75 y 100 % de vermicompost; mientras que el PSR se incrementó en ambas especies con 75 % de vermicompost. Lo que significa que *S. pilosa* y *S. tomentosa* prefieren desarrollarse en ambientes donde la materia orgánica ya está humificada; esto puede ser una alternativa para considerar en la producción a nivel de vivero con fines de reinserción en su hábitat natural.

En la eficiencia fotosintética se observan diferencias entre tratamientos (Cuadro 17). Los valores más altos en la TRC se obtuvieron con *S. tomentosa* en la mayoría de los tratamientos, lo que reflejó una acumulación de carbono fijado e incorporado a la biomasa estructural de la planta.

En *S. pilosa*, el AFE, que muestra la variación de crecimiento, fue más eficiente que en *S. tomentosa* con un valor de 397.05 cm² g⁻¹ (100 % de vermicompost).

Cuadro 17. Medias de las variables con mayor peso de los primeros tres componentes principales en función de los tratamientos.

Especie (porcentaje de vermicompost)	Componente del crecimiento					Eficiencia fotosintética			Masa foliar
	NH	AF cm ²	PSH g	PST g	PSR g	TRC g g ⁻¹ d ⁻¹	AFE cm ² g ⁻¹	RAF cm ² g ⁻¹	RPF g g ⁻¹
<i>S. pilosa</i> (100)	311.8 a [§]	270.3 a	0.97 c	2.04 a	0.87 b	0.33 ab	397.05 a	329.12 a	0.30 d
<i>S. pilosa</i> (75)	272.7 a	237.5 b	0.92 c	1.85 ab	1.08 a	0.31 abc	340.54 b	280.59 b	0.26 e
<i>S. pilosa</i> (50)	222.6 b	165.6 c	0.81 c	1.38 c	1.04 a	0.30 abc	290.59 cd	222.48 c	0.26 e
<i>S. pilosa</i> (25)	101.8 cd	63.6 de	0.34 e	0.60 d	0.75 b	0.24 cd	267.06 cde	205.24 cd	0.22 f
<i>S. pilosa</i> (0)	63.84 de	41.6 e	0.17 e	0.31 de	0.41 c	0.20 d	303.21 bc	248.74 bc	0.22 f
<i>S. tomentosa</i> (100)	270.3 a	236.6 b	1.59 a	1.65 bc	0.88 b	0.36 a	251.11 de	224.38 c	0.42 a
<i>S. tomentosa</i> (75)	268.1 a	239.1 b	1.32 b	1.41 c	1.11 a	0.36 a	255.75 de	226.19 c	0.36 c
<i>S. tomentosa</i> (50)	82.8 cd	62.8 de	0.32 e	0.21 de	0.32 cd	0.25 bcd	245.71 e	225.0 c	0.39 b
<i>S. tomentosa</i> (25)	112.6 c	76.2 d	0.57 d	0.53 d	0.82 b	0.34 a	195.11 f	166.48 d	0.30 d
<i>S. tomentosa</i> (0)	39.2 e	33.8 e	0.18 e	0.11 e	0.25 d	0.29 abc	234.6 e	205.13 cd	0.38 bc

[§] Valores con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente (Duncan, 0.05). NH: número de hojas; AF: área foliar; PSH: peso seco de hojas; PST: peso seco de tallos; PSR: peso seco de raíz; TRC: tasa relativa de crecimiento; AFE: área foliar específica; RAF: razón de área foliar; RPF: relación peso foliar.

Se han encontrado correlaciones positivas entre AFE y los contenidos de N y P (Wright *et al.*, 2001). Valores altos en AFE indican menor dureza y mayor calidad nutritiva del follaje de la planta. La misma tendencia se presentó con la RAF (329.12 cm² g⁻¹). En contraste, *S. tomentosa* presentó los valores más altos de RPF, lo que muestra mayor dureza de la hoja. La información sobre estas dos especies de *Stevia* es muy escasa; sin embargo, es posible afirmar que los valores significativamente menores entre especies (caso *S. tomentosa*) reflejan una mayor dureza de la hoja que puede interpretarse como una adaptación al ambiente.

6.3.2 Componente del Crecimiento

El NH varió en función del tiempo, la especie y proporciones de sustrato. En el último muestreo, *S. tomentosa* produjo más hojas que *S. pilosa* con 75 y 100 % de vermicompost (Figura 14).

El AF se incrementó en función del tiempo y las proporciones de vermicompost. A los 82 días después de la emergencia (dde) las hojas de *S. tomentosa* produjeron la mayor cantidad de AF con las mezclas 25:75 y 0:100 (fibra de coco: vermicompost) con valores de 440.87 cm² y 426.98 cm², respectivamente (Figura 15). La misma tendencia se presentó en *S. pilosa*.

Las combinaciones de los sustratos permitieron diferenciar la cantidad producida en biomasa aérea en ambas especies. A los 82 dde *S. tomentosa* tuvo valores significativos en la acumulación de materia seca en hojas, lo que supera a *S. pilosa* con las proporciones 75 y 100 % de vermicompost (Figura 16).

Aunque el PST se incrementó en ambas especies en las mismas proporciones, *S. tomentosa* presentó tallos más leñosos que *S. pilosa*. Los porcentajes de 75 y 100 % de vermicompost fueron los más sobresalientes (Figura 17).

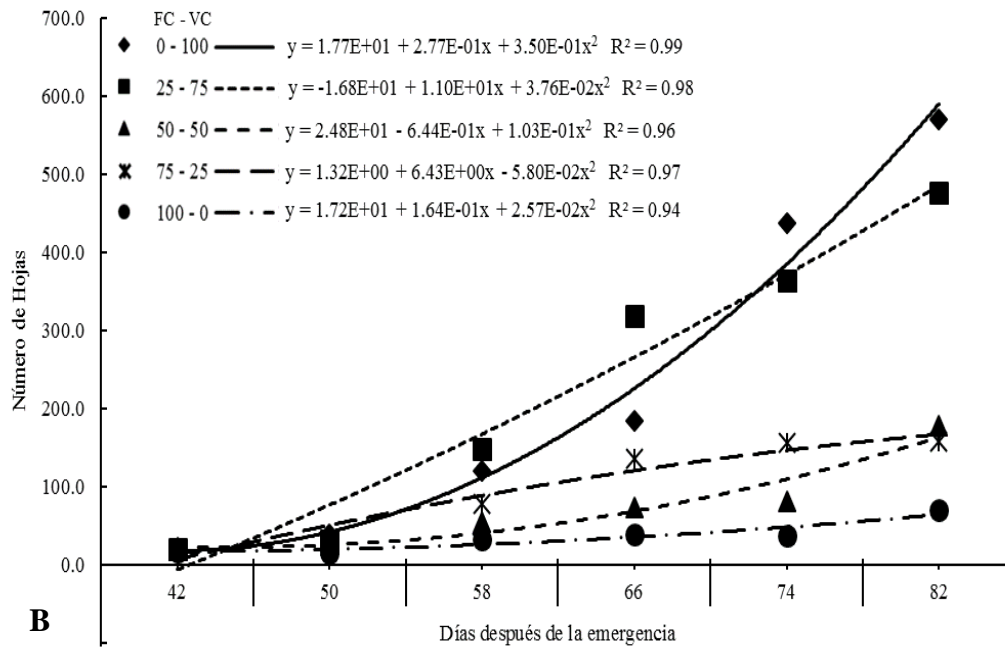
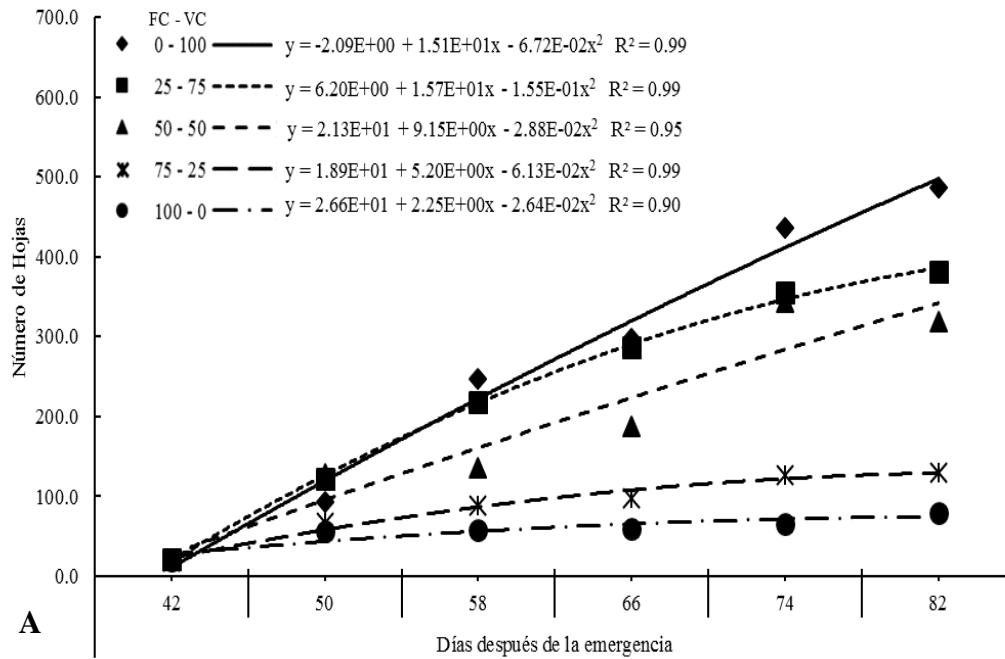


Figura 14. Dinámica del número de hojas en plantas de *S. pilosa* (A) y *S. tomentosa* (B) en función de la proporción fibra de coco:vermicompost y el tiempo de muestreo.

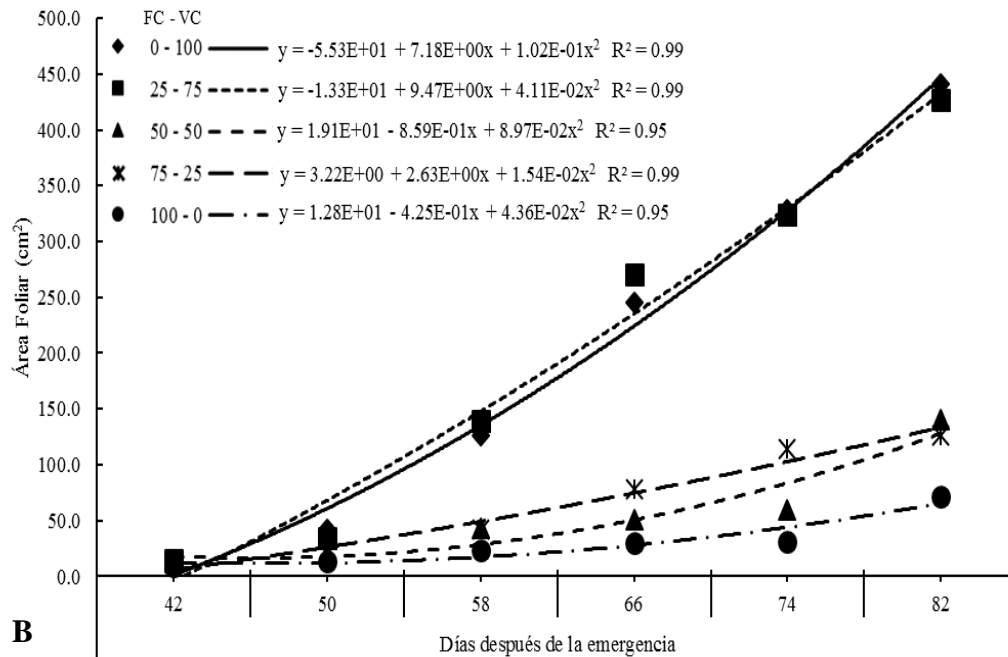
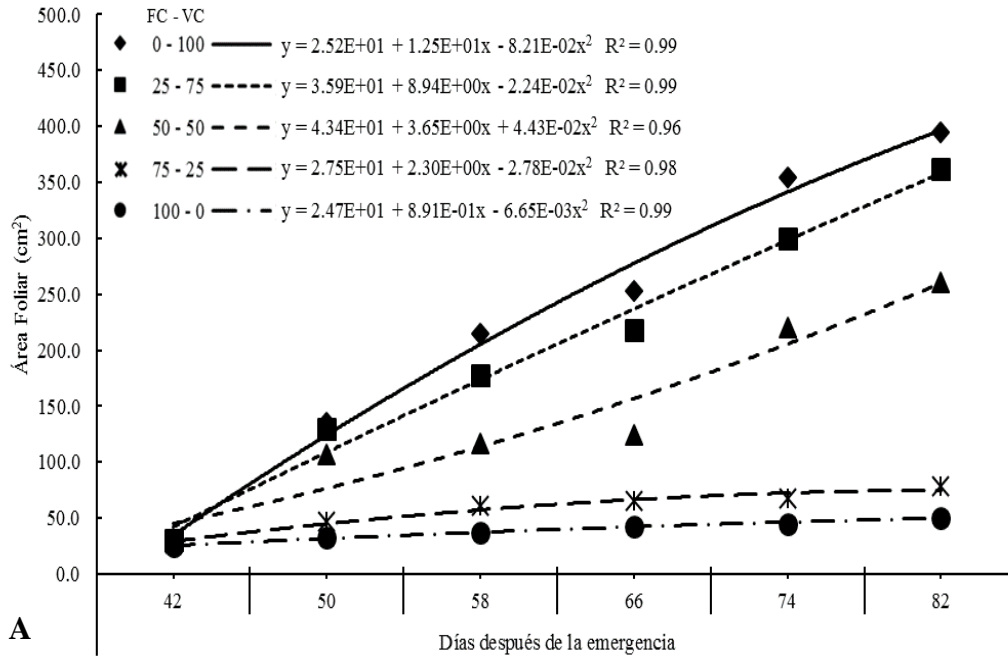


Figura 15. Dinámica del área foliar en plantas de *S. pilosa* (A) y *S. tomentosa* (B) en función de la proporción fibra de coco:vermicompost y el tiempo de muestreo.

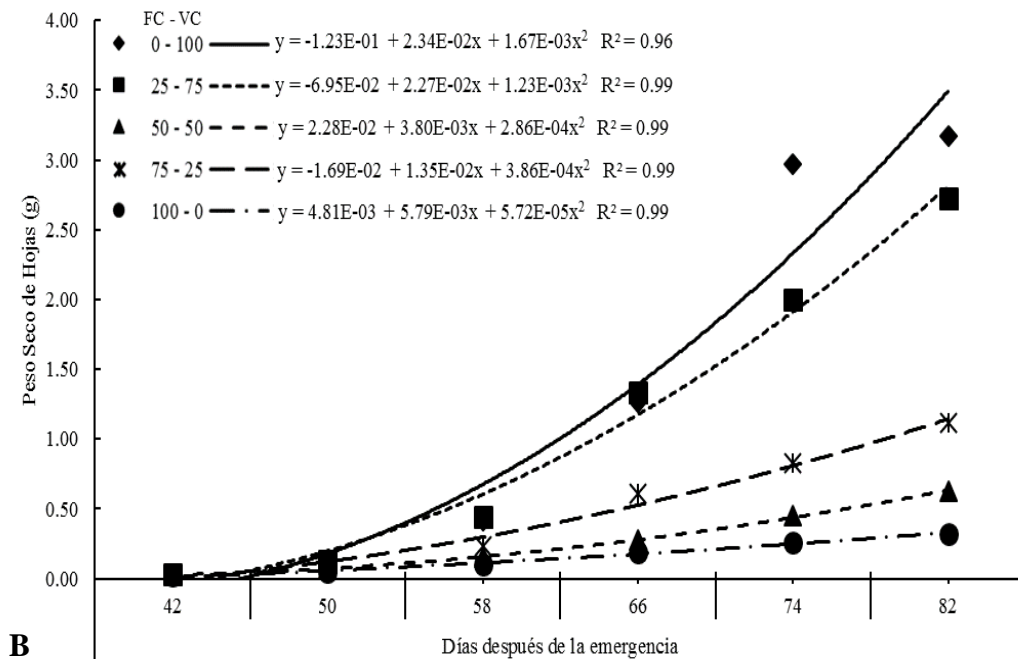
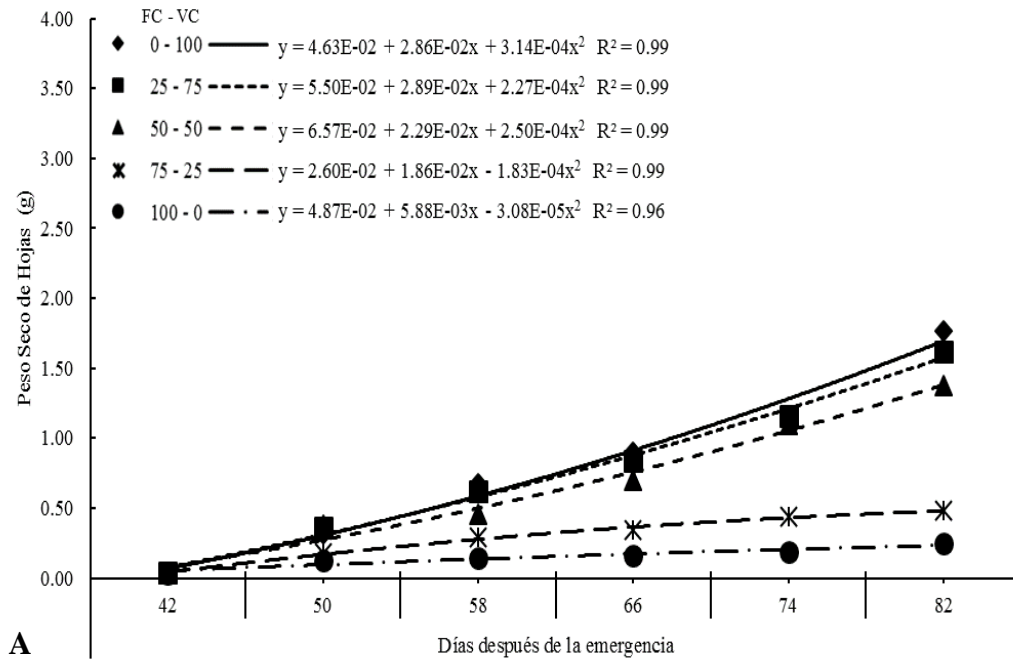
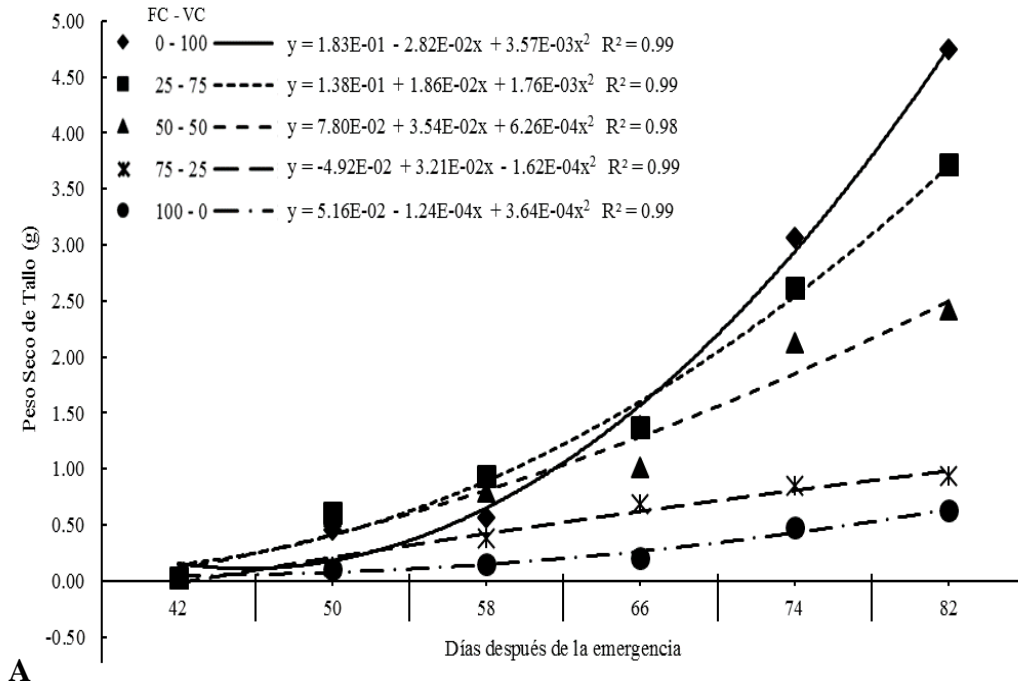
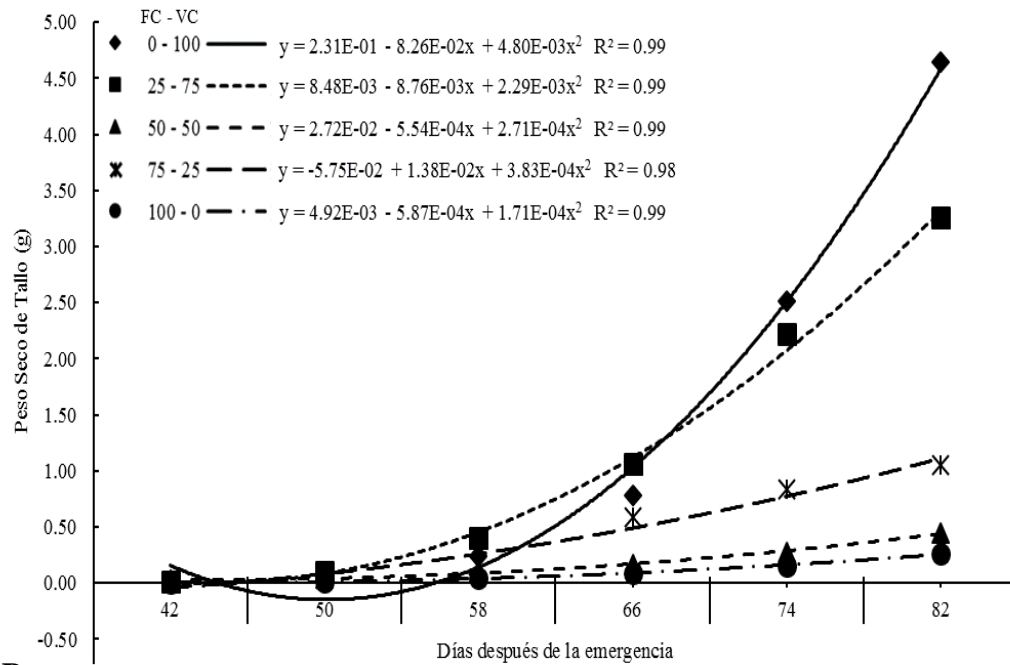


Figura 16. Dinámica del peso seco de hojas en plantas de *S. pilosa* (A) y *S. tomentosa* (B) en función de la proporción fibra de coco:vermicompost y el tiempo de muestreo.



A



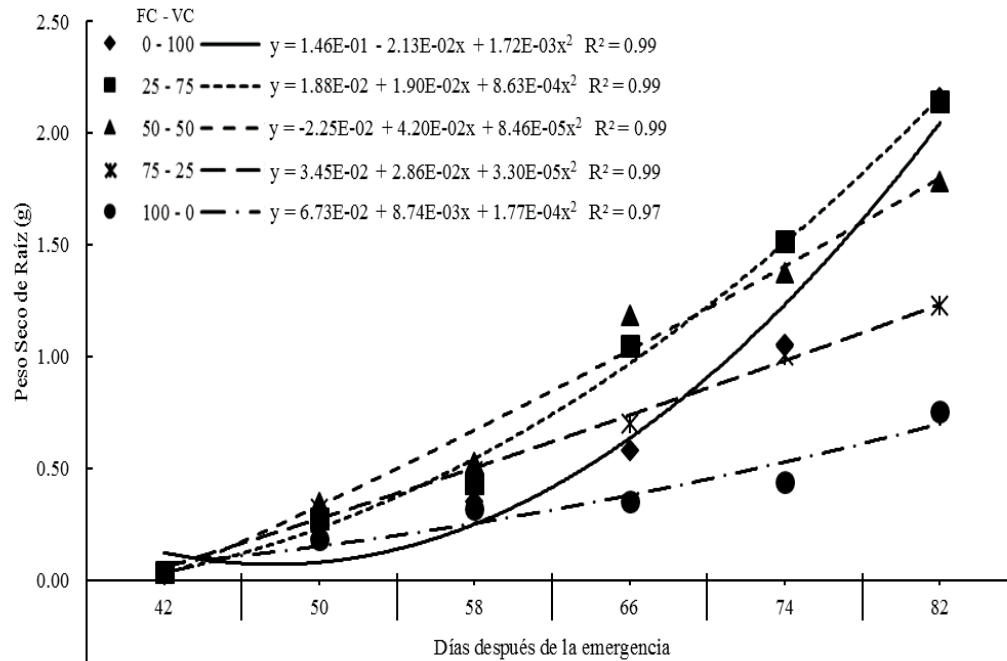
B

Figura 17. Dinámica del peso seco de tallos en plantas de *S. pilosa* (A) y *S. tomentosa* (B) en función de la proporción fibra de coco:vermicompost y el tiempo de muestreo.

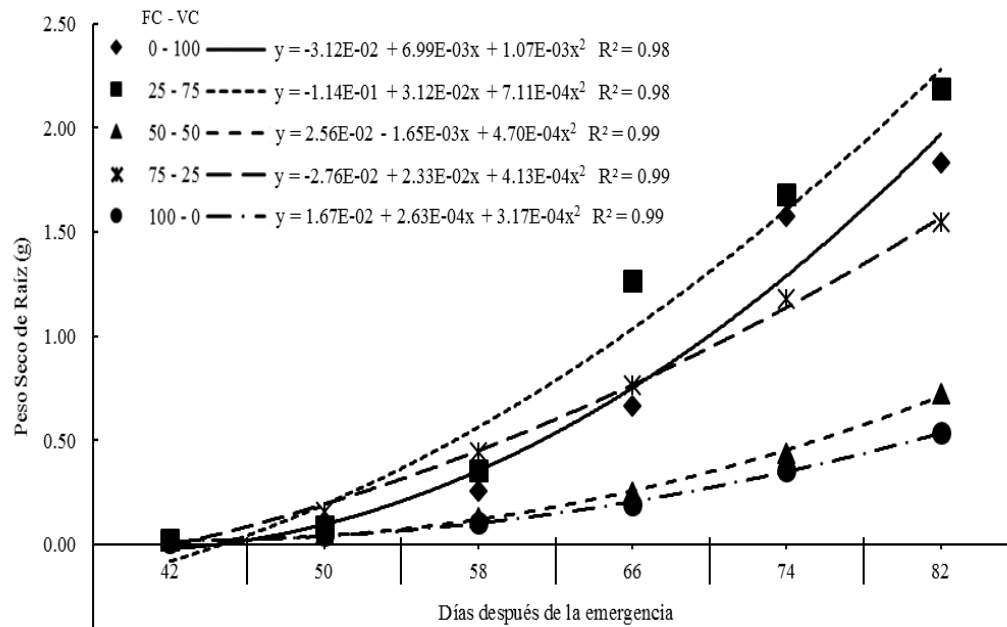
En ambas especies el desarrollo de raíz se modificó en función de la cantidad de vermicompost (Figura 18), pues con 100 % las raíces fueron abundantes pero delgadas; mientras que con el 25 % el número de raíces fue menor pero éstas fueron más gruesas. Estos resultados denotan el efecto positivo del humus sobre el desarrollo de las raíces de las plantas, debido a la presencia de compuestos promotores del crecimiento y actividad microbiana que favorece el desarrollo de la raíz (Marschner, 2012). Se especula que la presencia de sustancias similares a fitohormonas en el humus de lombriz (Arancon *et al.*, 2010) ocasionó la respuesta observada, tanto en crecimiento como en el desarrollo de las especies de *Stevia*.

6.3.3 Eficiencia fotosintética

En ambas especies la TRC fue alta en el primer muestreo (de 42 a 50 dde). En *S. pilosa* la TRC fue mayor con la adición de 50, 75 y 100 % de vermicompost ($0.954 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $0.893 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y $0.838 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente), lo que supera entre 27 y 45 % a *S. tomentosa* con el 25 % de vermicompost ($0.657 \text{ g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$) (Figura 19). La planta en la etapa vegetativa es más eficiente para producir tejido, porque depende de la fotosíntesis total y la respiración (Pommerening y Muszta, 2016); mientras que durante la senescencia la planta disminuye su actividad meristemática y elongación celular (Muhammad *et al.*, 2014). Desde el punto de vista de las relaciones entre los órganos que producen fotoasimilados y los que los consumen, la TRC es un indicador para medir esa eficiencia (Nassi o Di Nasso *et al.*, 2011).



A



B

Figura 18. Dinámica de pesos secos de raíz en plantas de *S. pilosa* (A) y *S. tomentosa* (B), en función de la proporción fibra de coco:vermicompost y el tiempo de muestreo.

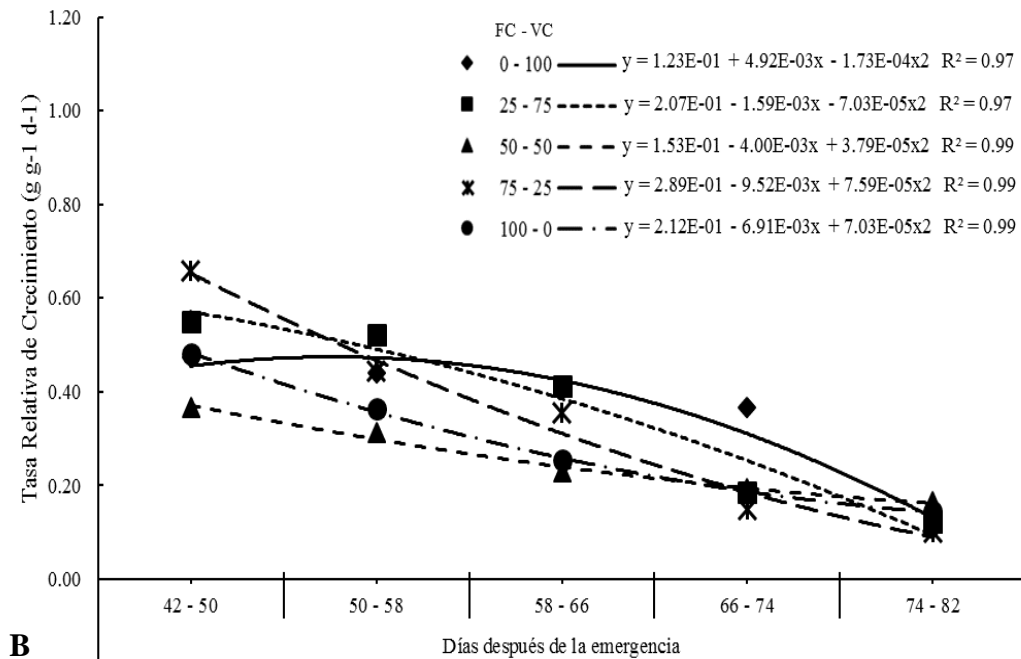
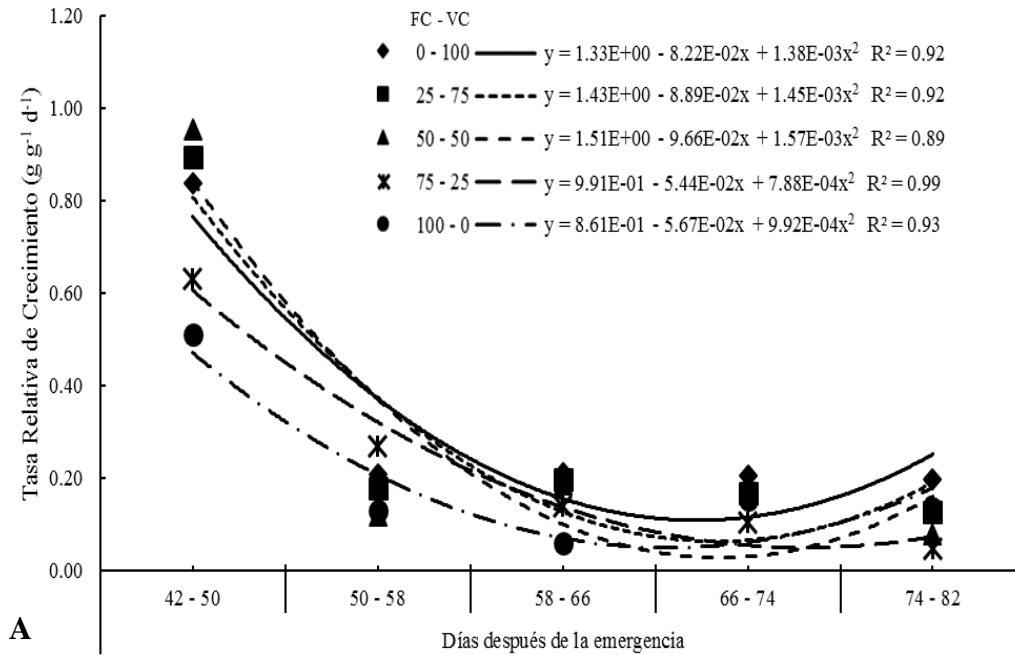


Figura 19. Dinámica de la tasa relativa de crecimiento en plantas de *S. pilosa* (A) y *S. tomentosa* (B), en función de la proporción fibra de coco:vermicompost y el tiempo de muestreo.

El AFE, que representa la relación entre el espesor y la superficie de la hoja (Clavijo, 1989), y en forma indirecta el efecto de la nutrición del cultivo y de la estructura del dosel, se incrementó en las primeras etapas de desarrollo en ambas especies. En *S. pilosa* el valor fue 62.25 % más que en *S. tomentosa*, independientemente de las relaciones de vermicompost (Figura 20). En ambas especies los valores de AFE fueron decreciendo en función del tiempo debido a que los fotoasimilados se distribuyeron a las zonas de división y expansión celular de mayor demanda (meristemas). Las especies con crecimiento rápido bajo óptimas condiciones son aquellas que tienen la mayor AFE (Poorter y De Jong, 1999), como es el caso de *S. pilosa* con 100 % de vermicompost.

La RAF es la relación entre el área foliar de la planta y la materia seca total (Clavijo, 1989), índice que muestra la proporción de asimilados fotosintéticos que son asignados a la producción de follaje. En la presente investigación, a los 42 dde *S. pilosa*, con 50, 75 y 100 % de vermicompost, obtuvo los valores más altos en RAF con respecto a *S. tomentosa* (Figura 21). En muestreos posteriores del cultivo este índice fue decreciendo y mostró estabilidad.

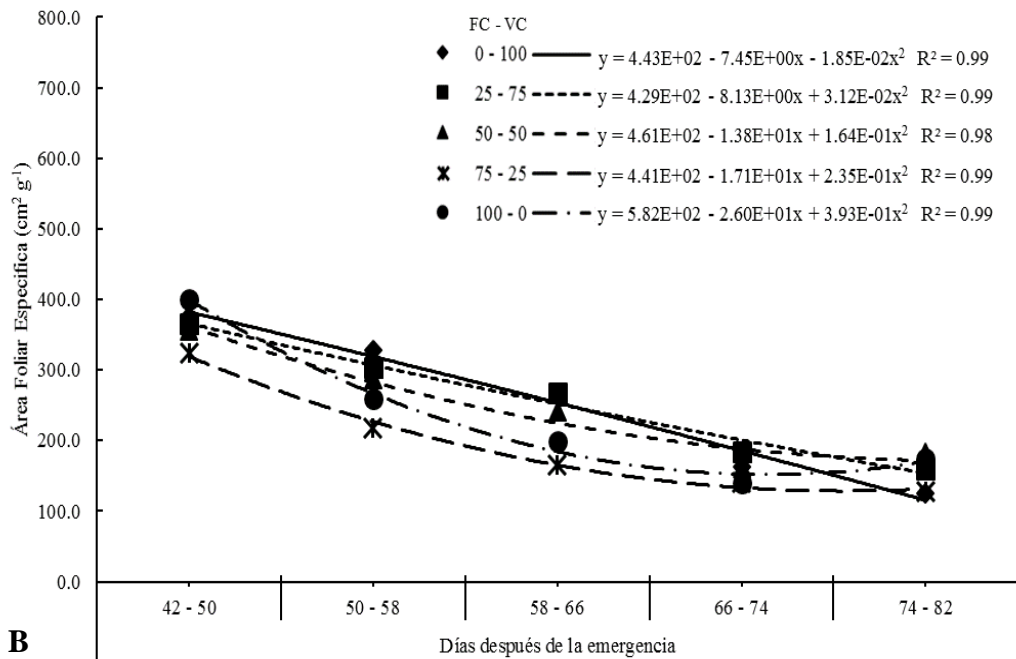
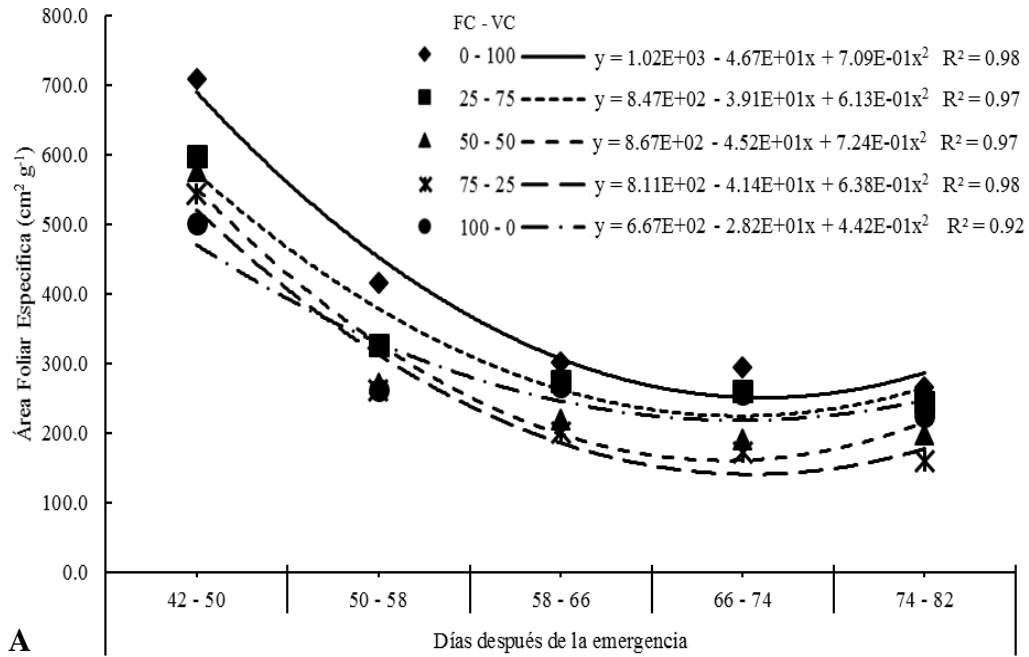


Figura 20. Dinámica del área foliar específica en plantas de *S. pilosa* (A) y *S. tomentosa* (B), en función de la proporción fibra de coco:vermicompost y el tiempo de muestreo.

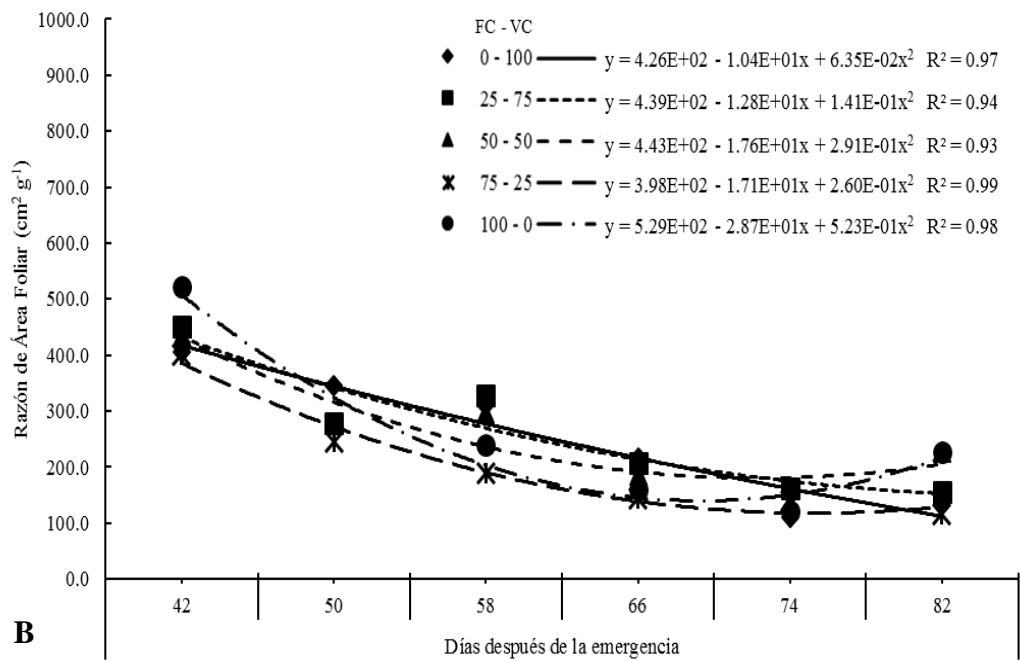
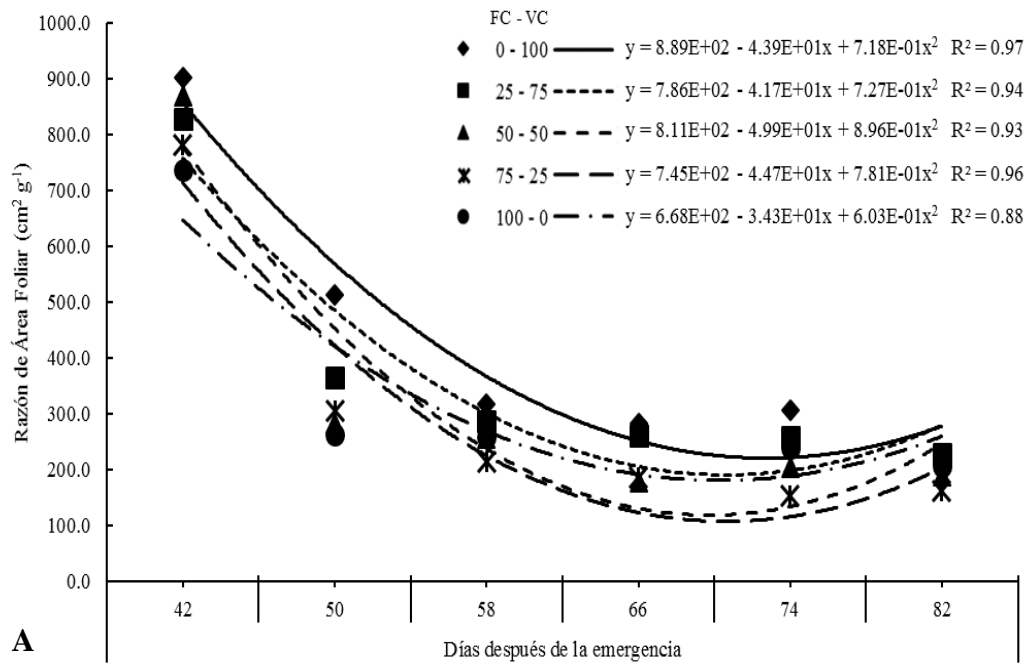


Figura 21. Dinámica de la razón de área foliar en plantas de *S. pilosa* (A) y *S. tomentosa* (B), en función de la proporción fibra de coco:vermicompost y el tiempo de muestreo.

6.3.4 Masa foliar

El índice de la RPF indica el peso seco foliar con respecto al peso seco total (Clavijo, 1989) y es un indicador de la masa foliar de la planta que expresa cuándo y cuántos fotoasimilados se traslocan en función del tiempo. Los valores obtenidos para este factor a los 42 dde muestran que *S. tomentosa* asignó una mayor cantidad de fotoasimilados al follaje con 0 y 25 % de vermicompost en comparación con *S. pilosa* (Figura 22). Por lo tanto, a los 42 dde *S. tomentosa* invirtió más tejido foliar en 0 y 25 % de vermicompost debido a la falta de nutrimentos, para poder captar la mayor cantidad de luz y dióxido de carbono (Jarma *et al.*, 2010).

Conforme avanzó el ciclo del cultivo en las dos especies, los valores del AFE, RAF y RPF disminuyeron debido a que en las primeras etapas de crecimiento mayor cantidad de fotoasimilados se asignó al establecimiento de las estructuras foliares. Estas se van reduciendo gradualmente a medida que la planta acumula más carbohidratos en otros órganos. Además, la disponibilidad de los nutrimentos y el desarrollo ontogénico influyó en la asignación de biomasa a esos diferentes órganos de la planta, como se observa en las figuras.

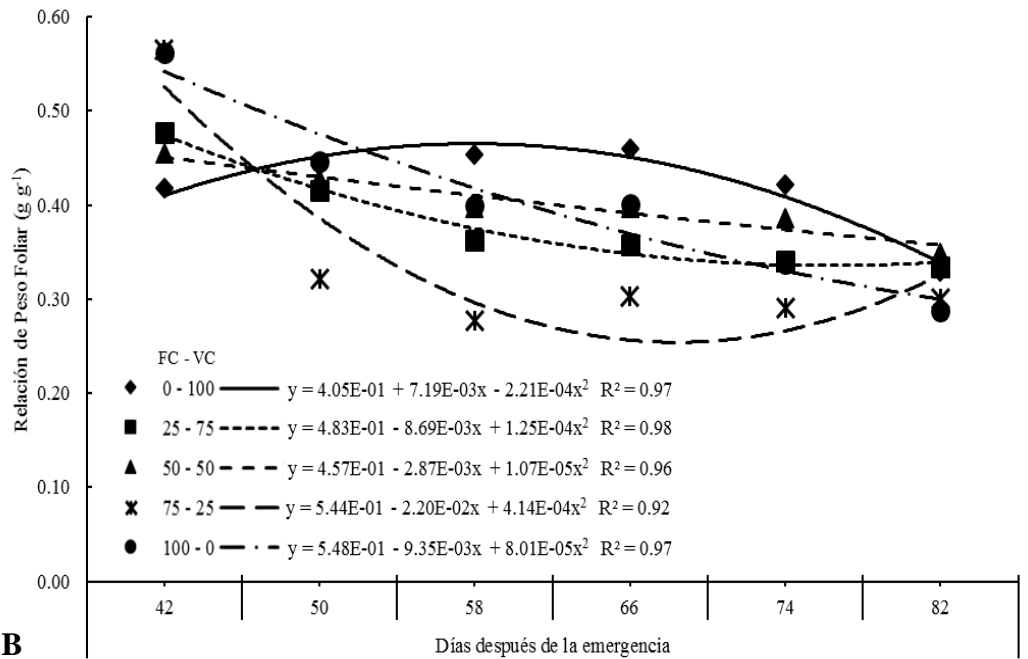
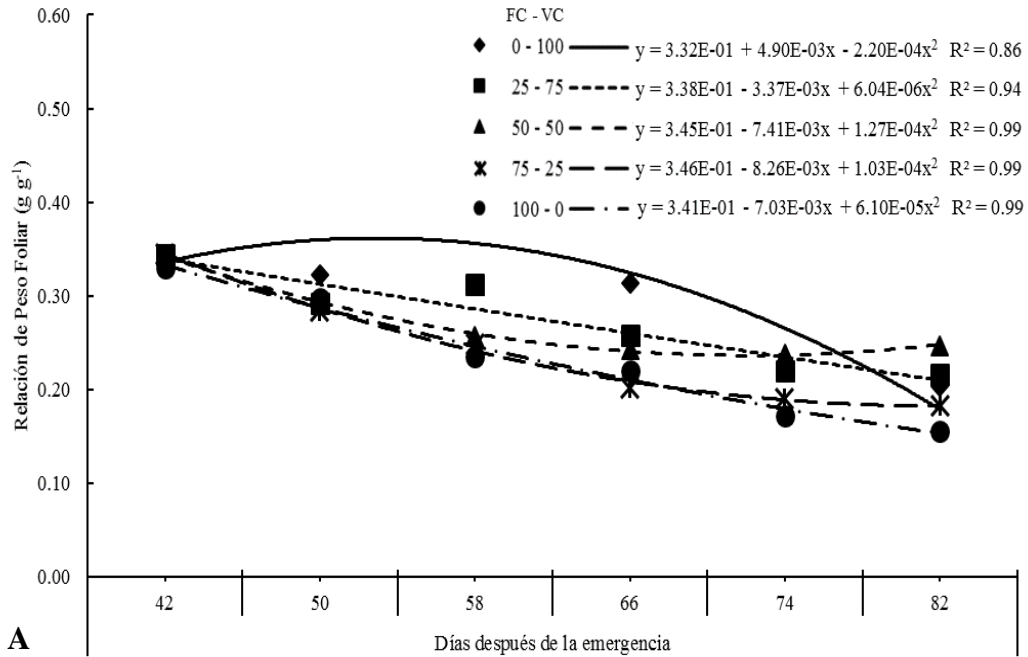


Figura 22. Dinámica de la relación de peso foliar en plantas de *S. pilosa* (A) y *S. tomentosa* (B), en función de la proporción fibra de coco:vermicompost y el tiempo de muestreo.

6.4 Concentración química

6.4.1 Análisis fitoquímico preliminar

El análisis preliminar con los disolventes diclorometano, metanol y agua confirmó la presencia de terpenos en ambas especies. También, se detectaron alcaloides, fenoles y flavonoides (Cuadro 18, 19 y 20). De acuerdo con García y Pereda (2002) en el género *Stevia* existe gran variedad de compuestos triterpénicos, y en los tejidos aéreos se han identificado varios flavonoides.

Con hexano, por su polaridad baja las fuerzas intermoleculares soluto-disolvente fueron de baja solubilización y por lo tanto con los disolventes más polares, diclorometano < metanol, permitieron observar la presencia de ciertos compuestos químicos (Cuadro 20 y 21). Las muestras mostraron espuma escasa durante la agitación, lo que permite suponer la presencia de saponinas escasa.

Cuadro 18. Análisis preliminar fitoquímico con el extracto acuoso obtenido de plantas de *S. pilosa* y *S. tomentosa*.

Trat	Tipo de Prueba*						
	Alcaloides	Fenoles	Taninos	Flavonoides	Terpenoides	Saponinas	Aceites Esenciales
2	+	+	NP*	NP	NP	NP	NP
4	++	++	+	+	++	NP	NP
6	+	+	NP	NP	+	NP	NP
10	+++	+++	++	+++	+++	NP	NP
12	+	+	NP	NP	+	NP	NP
14	+	+	NP	+	+	NP	NP
15	+	++	+	+	++	NP	NP
16	+	+	NP	NP	+	NP	NP

*NP = no presenta; + = levemente marcado; ++ = marcado; +++ = muy marcado.

Cuadro 19. Análisis preliminar fitoquímico con el extracto hexánico obtenido de plantas de *S. pilosa* y *S. tomentosa*.

Trat	Tipo de Prueba*						
	Alcaloides	Fenoles	Taninos	Flavonoides	Terpenoides	Saponinas	Aceites Esenciales
1	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
3	NP	NP	NP	NP	+	NP	NP
5	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
7	NP	NP	NP	NP	++	NP	NP
8	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
9	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
11	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
13	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP

*NP = no presenta; + = levemente marcado; ++ = marcado; +++ = muy marcado.

Cuadro 20. Análisis preliminar fitoquímico con el extracto diclorometano obtenido de plantas de *S. pilosa* y *S. tomentosa*.

Trat	Tipo de Prueba*						
	Alcaloides	Fenoles	Taninos	Flavonoides	Terpenoides	Saponinas	Aceites Esenciales
1	+	+	NP	+	+	NP	NP
3	+	+	NP	+	+	NP	NP
5	+	+	NP	+	++	NP	NP
7	++	++	NP	++	+++	NP	NP
8	++	++	+	++	++	NP	NP
9	++	+	NP	+	++	NP	NP
11	+	+	NP	+	+	NP	NP
13	+	+	NP	+	+	NP	NP

*NP = no presenta; + = levemente marcado; ++ = marcado; +++ = muy marcado.

Cuadro 21. Análisis preliminar fitoquímico con el extracto metanólico obtenido de plantas de *S. pilosa* y *S. tomentosa*.

Trat	Tipo de Prueba*						
	Alcaloides	Fenoles	Taninos	Flavonoides	Terpenoides	Saponinas	Aceites Esenciales
1	+	+	NP	NP	NP	NP	NP
3	+++	+	NP	NP	+++	NP	NP
5	++	+	NP	NP	++	NP	NP
7	+++	++	NP	NP	++	NP	NP
8	+	++	NP	NP	+	NP	NP
9	++	+++	NP	NP	+++	NP	NP
11	++	++	NP	NP	+	NP	NP
13	+	+	NP	NP	+	NP	NP

*NP = no presenta; + = levemente marcado; ++ = marcado; +++ = muy marcado.

Con los resultados del análisis preliminar, se decidió hacer una búsqueda con diclorometano y metanol en cromatografía de capa fina (CCF). No se detectaron alcaloides con ningún disolvente (Figura 23).

Al realizar la prueba para compuestos fenólicos en CCF, se observó una leve presencia en los diferentes tratamientos en comparación con el estándar utilizado (Figura 24). Sin embargo, la presencia más marcada se mostró con el disolvente metanol.

En los tratamientos se presentaron diversas bandas de terpenos identificados por la coloración característica que va desde el color morado, violeta a marrón al ser revelados con vainillina/ácido sulfúrico, siendo notoria la relación con el estándar (Figura 25). Sin embargo, la presencia más marcada se mostró con el disolvente diclorometano.

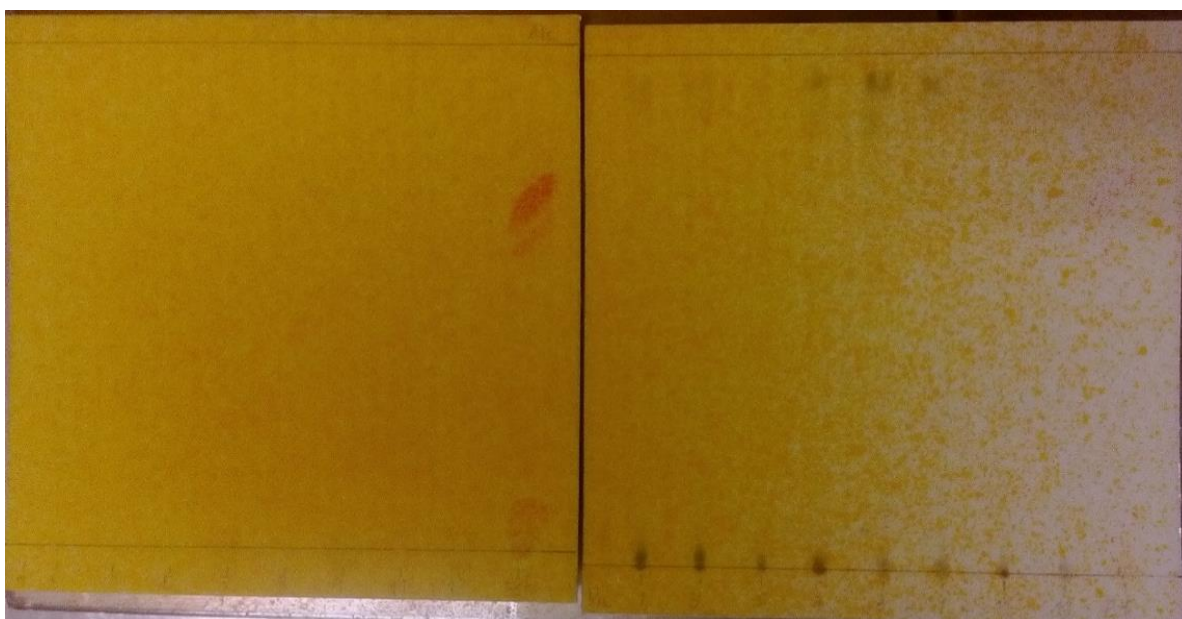


Figura 23. Prueba para alcaloides en cromatografía en capa fina con diclorometano (derecha) y metanol (izquierda).

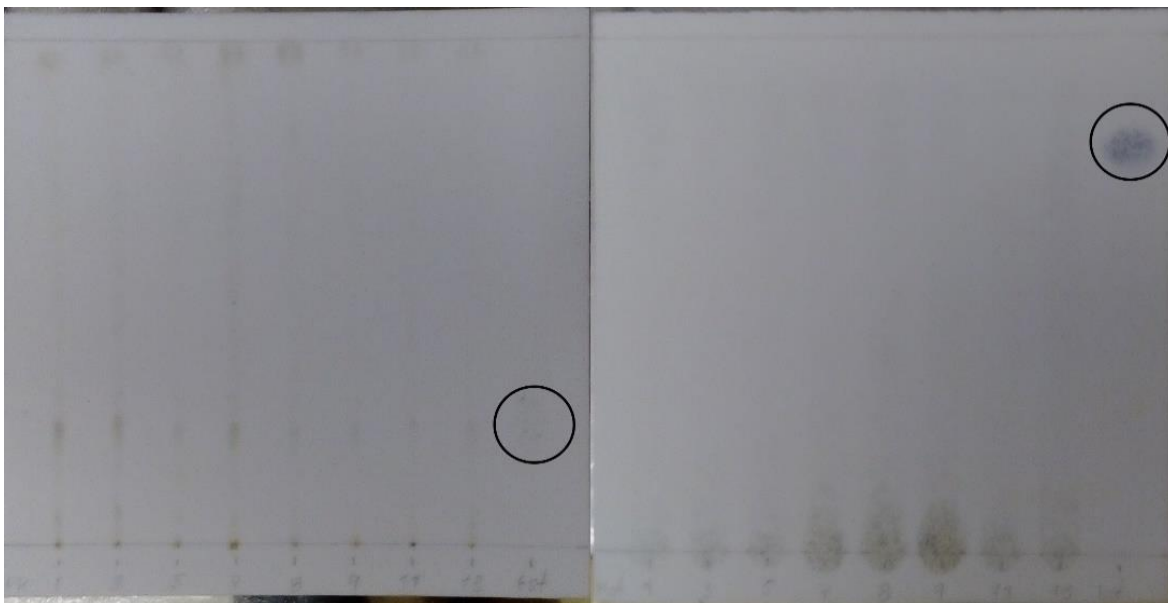


Figura 24. Prueba para fenoles en cromatografía en capa fina con diclorometano (izquierda) y metanol (derecha) círculos muestran el desplazamiento del estándar.

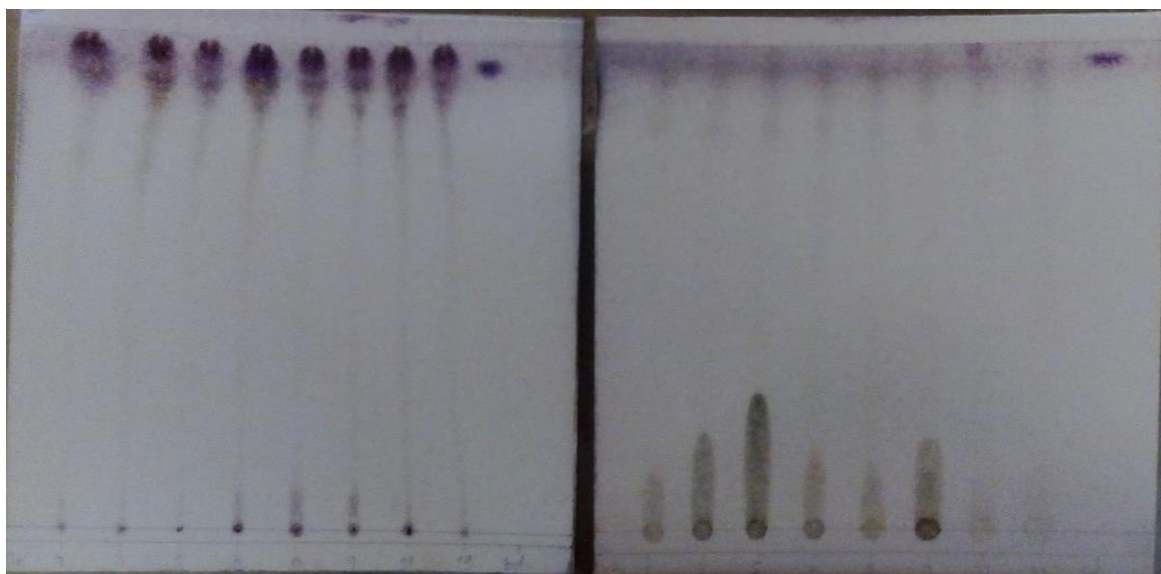


Figura 25. Prueba para terpenoides en cromatografía en capa fina con diclorometano (izquierda) y metanol (derecha).

La prueba de flavonoides en Cromatografía en Capa Fina, se observó la presencia marcada en los diferentes tratamientos en comparación con el estándar utilizado (Figura 26).

De igual forma con el disolvente diclorometano la relevancia de estos compuestos fue notoria por la fluorescencia frente a la luz UV.

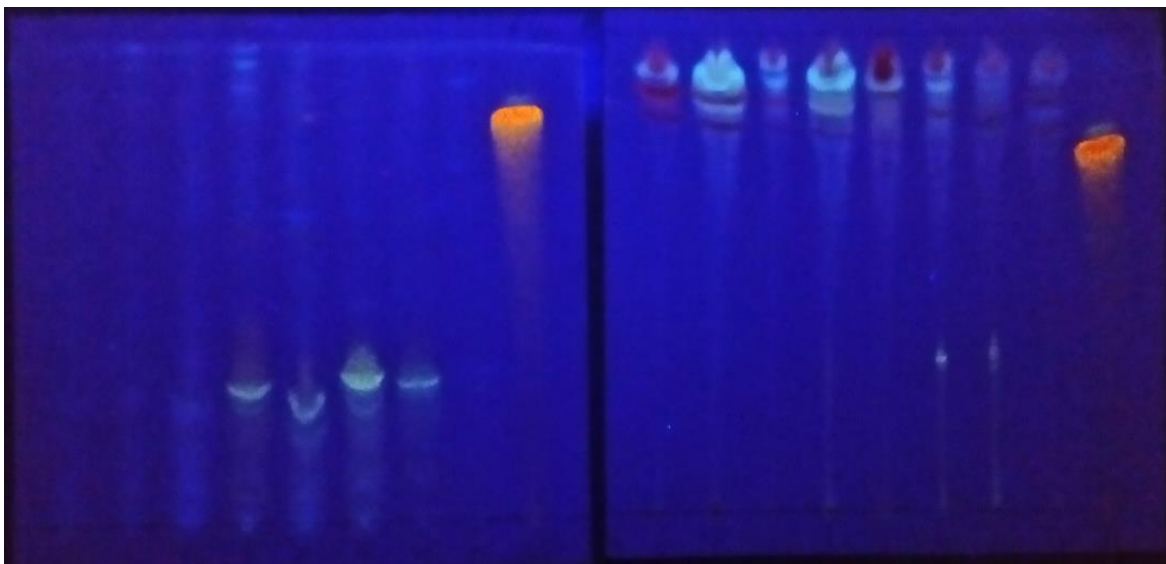


Figura 26. Prueba para flavonoides en cromatografía en capa fina con diclorometano (Derecha) y metanol (Izquierda).

Las curvas estándar de ácido gálico, quercetina y ácido masticadienoico tuvieron R^2 cercana a uno (Figuras 27, 28 y 29).

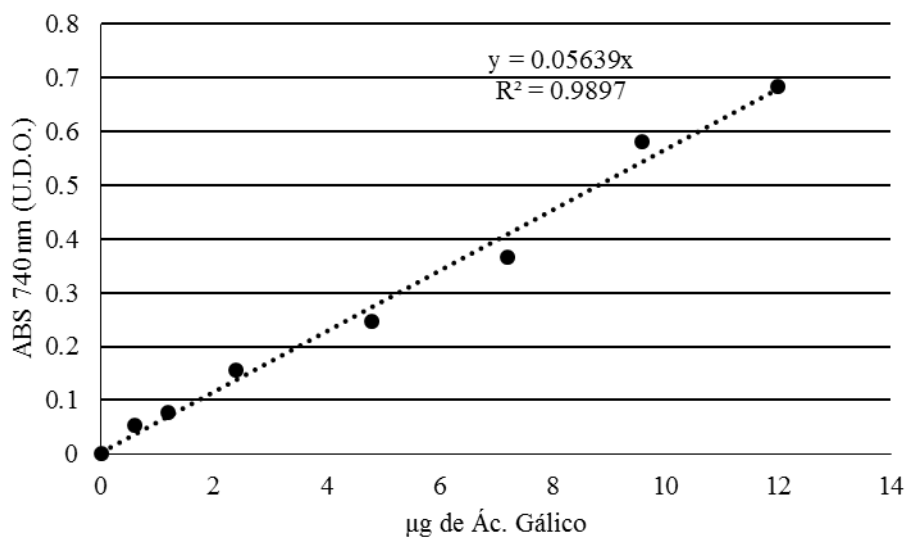


Figura 27. Curva estándar de ácido gálico para análisis de compuestos fenólicos.

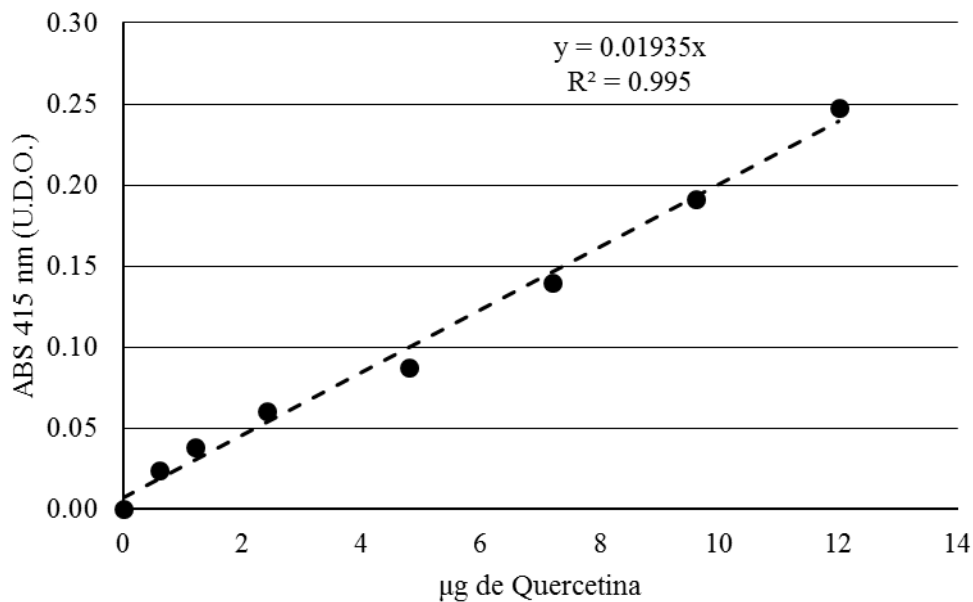


Figura 28. Curva estándar de Quercetina para análisis de flavonoides.

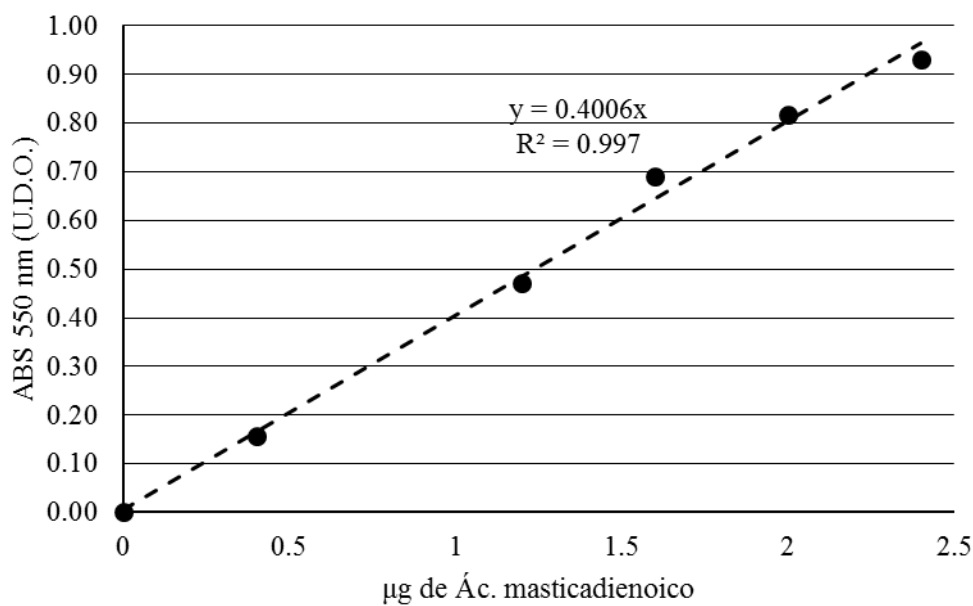


Figura 29. Curva estándar de ácido masticadienoico para análisis de triterpenos.

En las pruebas cromatográficas de capa fina se observó la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides y terpenos. Sin embargo, en un tamizaje fitoquímico de *S. rebaudiana*

corroboró la presencia de taninos, alcaloides, glucósidos cianogénicos, saponinas y esteroides (Tadhani y Subhash, 2006).

6.4.2 Concentración química de especies de *Stevia* bajo condiciones *in situ*.

En la fuente de variación especie no influyó el contenido de fenoles y flavonoides, pero sí en terpenos. En cuanto al sitio de muestreo sólo tuvieron significancia las concentraciones de fenoles y terpenos. En la interacción entre especie y sitio fueron altamente significativas las concentraciones de fenoles y terpenos (Cuadro 22). Las plantas responden a variaciones ambientales y de producción, como los ocasionados por la época del año, a la fertilización, a daños causados por plagas y enfermedades, lo cual influye en la producción de metabolitos secundarios (Pal *et al.*, 2015). El género *Stevia* perteneciente a la familia Asteraceae se ha reportado que presenta metabolitos triterpénicos y lactonas sesquiterpénicas (García y Pereda, 2002), que sirven como antiinflamatorias (Hohmann *et al.*, 2016) y la prevención del cáncer (Sampaio *et al.*, 2016). Por otro lado, hoy en día existe un interés creciente en *S. rebaudiana* debido a su alto contenido de compuestos fenólicos y flavonoides (Pérez *et al.*, 2016).

Cuadro 22. Significancia estadística del análisis de varianza en las concentraciones químicas de las especies de *Stevia* en función del sitio de muestreo.

F.V.	Fenoles	Flavonoides	Terpenos
Especie	0.059ns	0.061ns	0.002**
Sitio	1.511ns	0.354ns	0.030**
Especie X sitio	1.688**	0.694ns	0.006**
Pr > Fc	0.0071	0.3385	<.0001

* significativo, ** altamente significativo, ^{ns} no significativo, FV: fuente de variación

En la evaluación química se observaron diferencias entre especies de *Stevia* y sitios de muestreo. Las concentraciones más altas de fenoles y flavonoides se obtuvieron de las plantas

de *S. tomentosa* provenientes de Huasca de Ocampo; además, se observó una tendencia descendente en función al incremento del porcentaje de bases intercambiables (Figura 30). Misma tendencia se presentó en terpenos totales pero con *S. pilosa*. Las condiciones del sitio de Huasca de Ocampo permitieron obtener las mejores concentraciones químicas, pero con diferencias entre especies. Aunque, no existen estudios similares realizados en las especies de *Stevia* estudiadas, se pudiera inferir que las diferencias encontradas en las concentraciones de los metabolitos secundarios puede deberse a las condiciones climáticas y de la altitud del lugar tal como lo describe Cui *et al.* (2006), Zavala *et al.* (2006), Magangana y Makunga (2016). Por otro lado, se ha documentado, que algunas especies al estar en temperaturas máximas pero dentro de su óptimo de crecimiento permite el incremento de metabolitos secundarios aunado con un estrés nutrimental en suelo (Zhao *et al.*, 2016).

Debido a que existe poca información sobre el manejo o la relación edafoclimática en la producción de metabolitos secundarios de *Stevias* mexicanas (*Stevia elatior*, *S. eupatoria*, *S. glandulosa*, *S. jorullensis*, *S. lucida*, *S. pilosa*, entre otras), se puede inferir que ciertos factores como, la disponibilidad de agua (Karimi *et al.*, 2015), microorganismos en la rizósfera (Borda *et al.*, 2011), temperatura (Kumar *et al.*, 2015) y calidad de luz (Ahmad *et al.*, 2016) pueden incrementar fenoles, flavonoides y los diterpenos.

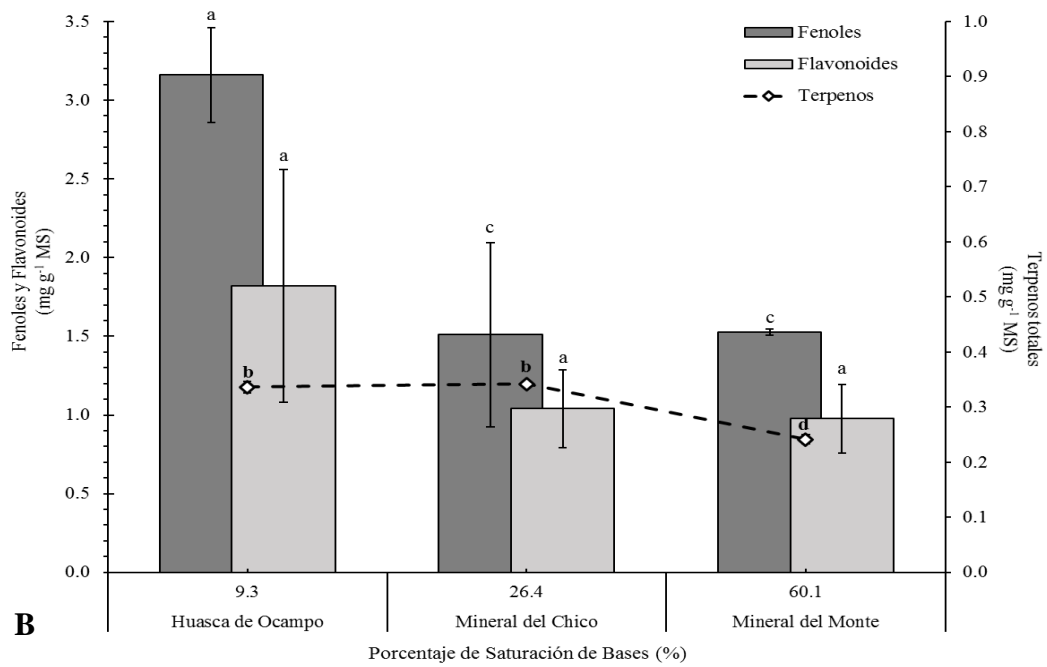
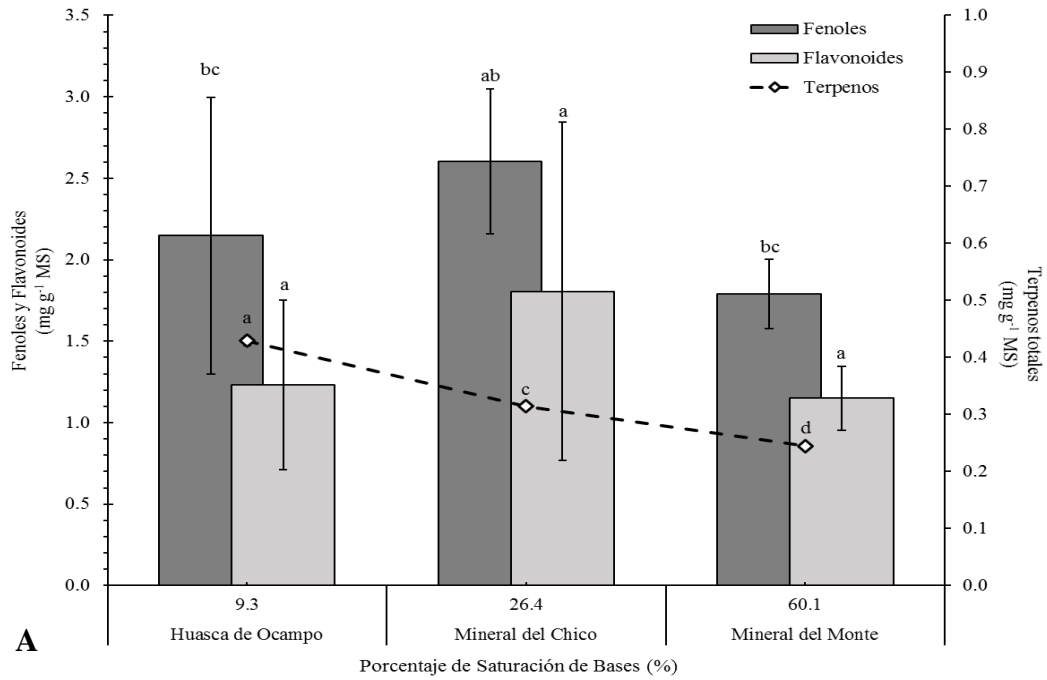


Figura 30. Concentración química en plantas de *S. pilosa* (A) y *S. tomentosa* (B), en función del porcentaje de saturación de bases *in situ*.

6.4.3 Metabolitos secundarios de especies de *Stevia* cultivadas con soluciones nutritivas en invernadero

En las fuentes de variación especie y soluciones nutritivas y su interacción fueron altamente significativas para la concentración de fenoles y terpenos (Cuadro 23). Durante el crecimiento las hojas de *S. tomentosa* se percibieron algo rígidas al tacto. Al respecto, Bassman (2004) menciona que esto se debe a la presencia de compuestos fenólicos que aumentan la rigidez de las paredes celulares porque actúa como puentes moleculares entre los componentes de la pared celular. Además, estos compuestos fenólicos son precursores de la lignina. Las peroxidasas intervienen en la catálisis de los polímeros fenólicos, estos se polimerizan y originan la lignina durante el crecimiento de los tejidos y en eventos de estrés como cuando hay lesiones.

Cuadro 23. Significancia estadística del análisis de varianza en las concentraciones químicas de las especies de *Stevia* en función del sitio de muestreo.

F.V.	Fenoles	Flavonoides	Terpenos
Especie	1.66 **	0.048ns	0.009**
Solución nutritiva	0.72**	0.005ns	0.003**
Especie X solución	0.49**	0.090ns	0.030**
Pr < Fc	<0.0001	0.7845	<0.0001

* significativo, ** altamente significativo, ^{ns} no significativo, FV: fuente de variación

Las soluciones nutritivas y las diferencias entre especies indujeron diferencias en las concentraciones químicas. Con la solución Steiner, las concentraciones más altas en fenoles y flavonoides fueron con *S. tomentosa* (2.34 y 0.84 mg g⁻¹ MS, respectivamente). Con éstos resultados se puede suponer que hay una tendencia ascendente hacia las soluciones que tiene un balance iónico deseable para el caso particular de *S. tomentosa*. Mientras que en *S. pilosa* no se observa tendencia para los diferentes metabolitos evaluados (Figura 31). La

concentración más alta en terpenos se obtuvo de *S. pilosa* con efluente de vermicompost (0.82 mg g⁻¹ MS).

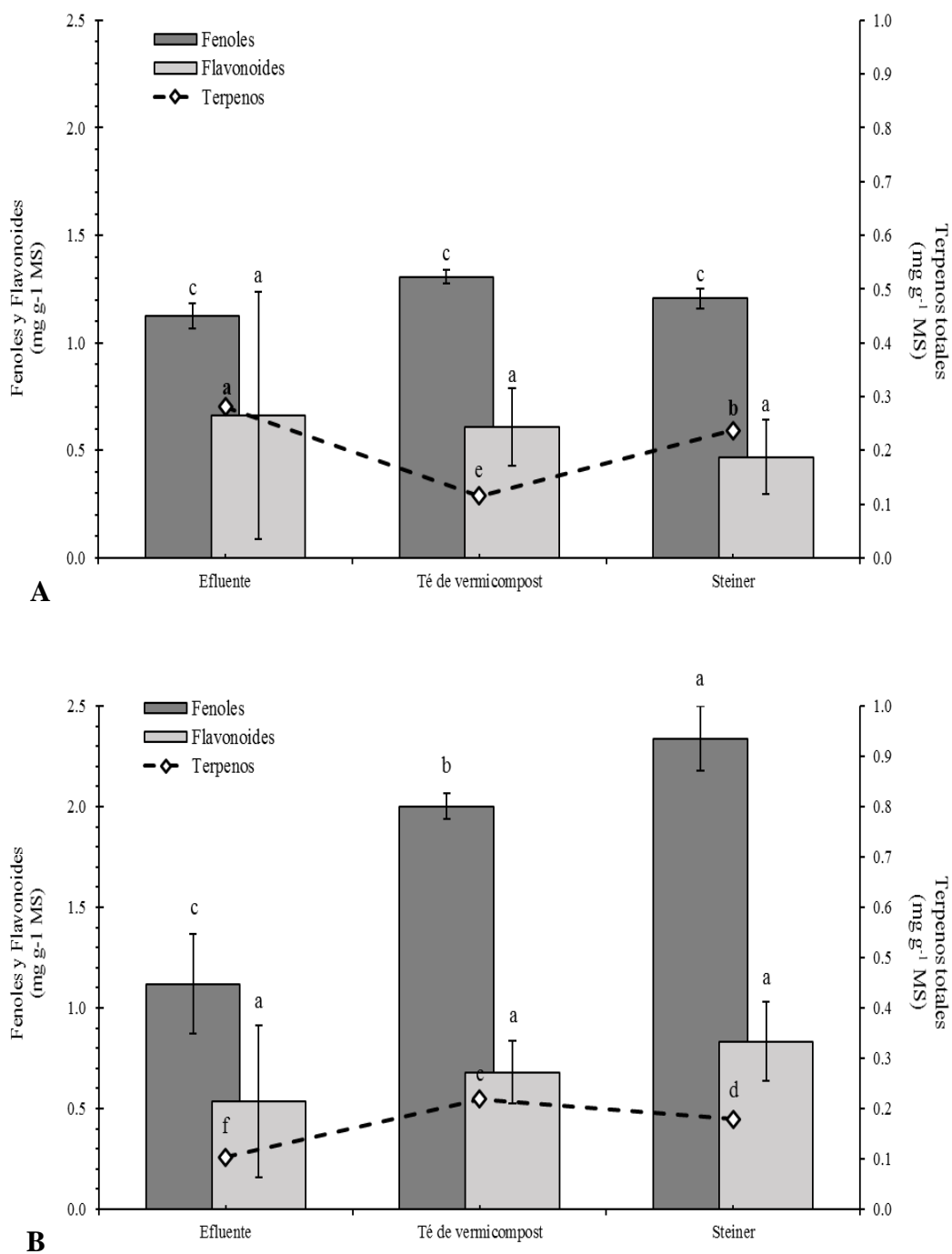


Figura 31. Concentración química en plantas de *S. pilosa* (A) y *S. tomentosa* (B), en función de la solución nutritiva en invernadero.

Hendawy *et al.* (2010) estudiaron el crecimiento, rendimiento y porcentaje de aceite en tomillo tratado con diferentes tipos de fertilizantes orgánicos, el compost más té de compost y roca fosfórica favorecieron algunos caracteres evaluados comparados con otros compost realizados con estiércol de oveja y bovino. Aunque no se observó un efecto significativo de las soluciones orgánicas en la concentración de fenoles y flavonoides, el estrés nutrimental que provocó el efluente de vermicompost en *S. pilosa* fue altamente significativo en la concentración de terpenos totales.

6.4.4 Metabolitos secundarios de especies de *Stevia* cultivadas en dependencia de la cantidad de vermicompost como sustrato en invernadero

La fuente de variación especie no influyó en el contenido de fenoles y flavonoides. Mismo caso sucedió con la interacción entre especie y sustrato. Sin embargo, la proporción de vermicompost como medio de crecimiento influyó en el contenido de metabolitos secundarios (Cuadro 24).

Cuadro 24. Significancia estadística del análisis de varianza de la concentración de metabolitos secundarios en plantas de *Stevia*.

Fuente de Variación	Fenoles	Flavonoides	Triterpenos
Especie	0.16ns	0.009ns	0.029**
Sustrato	3.53*	0.575*	0.120**
EspecieXsustrato	0.92ns	0.074ns	0.086**

**= altamente significativo; *= significativo; ns= no significativo.

En condiciones de invernadero y con diferentes concentraciones de vermicompost como sustrato se encontraron diferencias entre especies. Hubo una relación estrecha entre las concentraciones químicas y el porcentaje de vermicompost como sustrato. A mayor proporción de vermicompost mayor fue la concentración química, caso particular fenoles y

flavonoides en plantas de *S. pilosa* (Figura 32A). La concentración de terpenos también tuvo una relación similar con respecto a lo anterior, pero sólo fue para el caso de *S. tomentosa* (Figura 32B).

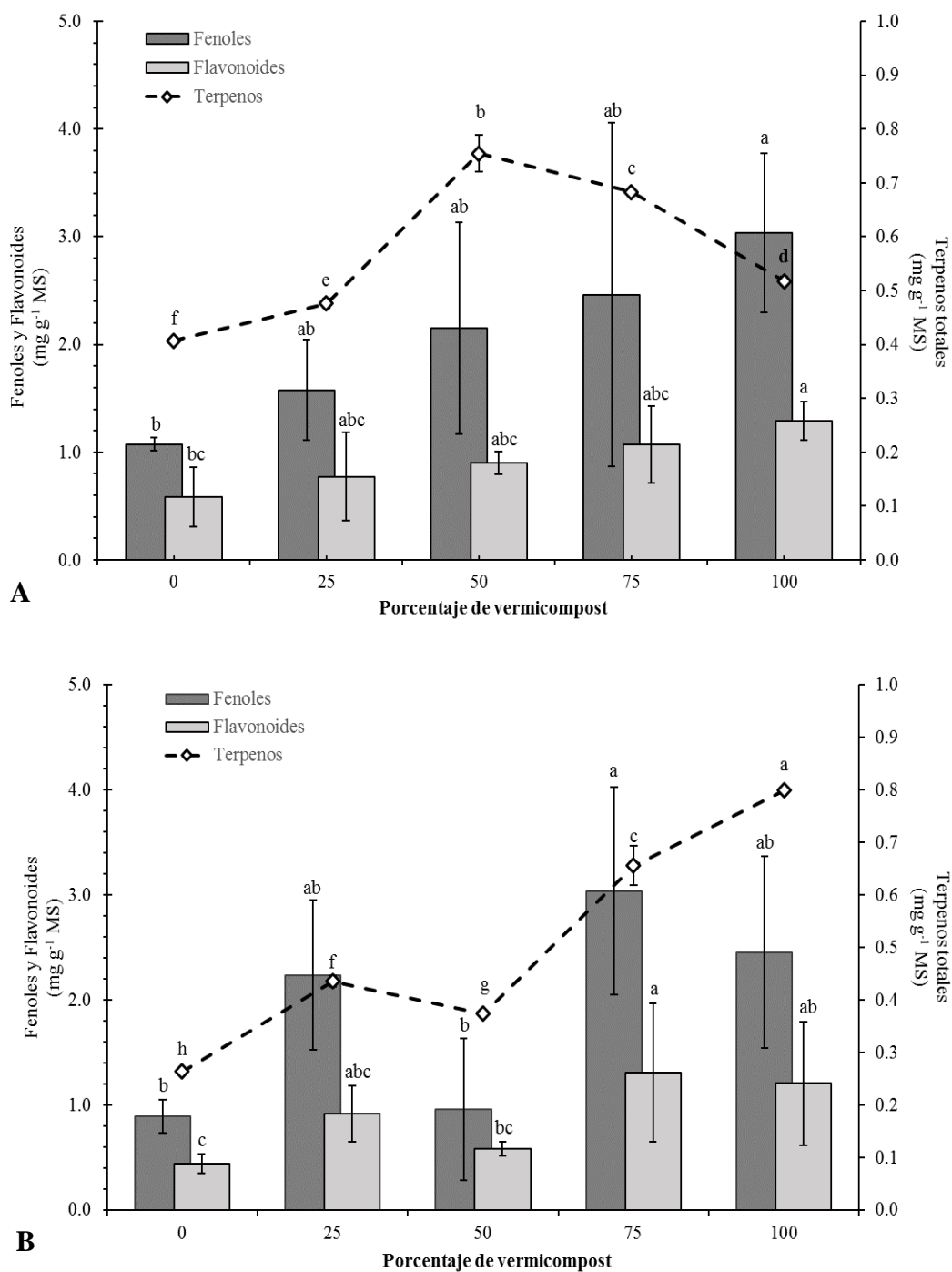


Figura 32. Concentración química en plantas de *S. pilosa* (A) y *S. tomentosa* (B), en función del porcentaje de vermicompost como sustrato en invernadero.

El incremento en la concentración de metabolitos secundarios por las plantas de *Stevia* estuvo en función del incremento en la proporción de vermicompost. Aunque no se tienen datos para comparar con alguna de las dos especies estudiadas, se ha reportado que *S. rebaudiana* posee propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y antimicrobianas, debido a los compuestos fenólicos, flavonoides, ácidos aromáticos y terpenoides (Muanda *et al.*, 2011). Otros autores han realizado prácticas para incrementar dichos metabolitos los cuales consisten en evaluar época de corte (Soufi *et al.*, 2016), fertilización orgánica y mineral (Liu *et al.*, 2011), fase fenológica (Serfaty *et al.*, 2013), fotoperiodo (Ceunen *et al.*, 2013), entre otros.

6.5 Composición nutrimental

6.5.1 Composición nutrimental de especies de *Stevia* dependiente de las condiciones edafoambientales

El efecto significativo en la fuente de variación especie indica que sólo algunos elementos fueron significativos; N, P, K, Ca, S, B, Cu, y Na; mientras que en el factor sitio sólo N, Mo, B y Na. La interacción entre especies y sitios de muestreo sólo el nitrógeno tuvo significancia (Cuadro 25).

Cuadro 25. Significancia estadística del análisis de varianza de la concentración nutrimental en plantas de *Stevia* en función del sitio.

Elementos minerales	Fuente de variación			
	Macronutrientes	Especie	Sitio	Especie X Sitio
N	1.563**	7.539**	0.749**	
P	1.896**	0.493ns	0.061ns	
K	4.421*	2.036ns	0.204ns	
Ca	4.333*	0.895ns	0.035ns	
Mg	3.843ns	1.591ns	0.004ns	
S	3.096*	0.409ns	0.350ns	
Micronutrientes				
Fe	0.192ns	0.096ns	0.029ns	
Zn	0.015ns	0.013ns	0.001ns	
Mn	0.0052ns	0.0056ns	0.0010ns	
Mo	0.0028ns	0.0111*	0.0001ns	
B	0.0562**	0.0336**	0.0014ns	
Cu	0.0020**	0.0002ns	0.0003ns	
Na	1.1884**	0.7019**	0.0184ns	
Ni	0.0072ns	0.0018ns	0.0010ns	

**= altamente significativo; *= significativo; ns= no significativo.

En el análisis de comparación de medias por la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$) se tuvieron diferencias entre especies y sitios. Se encontraron diferencias significativas en macroelementos en las plantas recolectadas en Huasca de Ocampo y Mineral del Chico. Al incrementarse el porcentaje de saturación de bases en el suelo se observa que las concentraciones de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg y S) descienden en *S. tomentosa* (Figura 33).

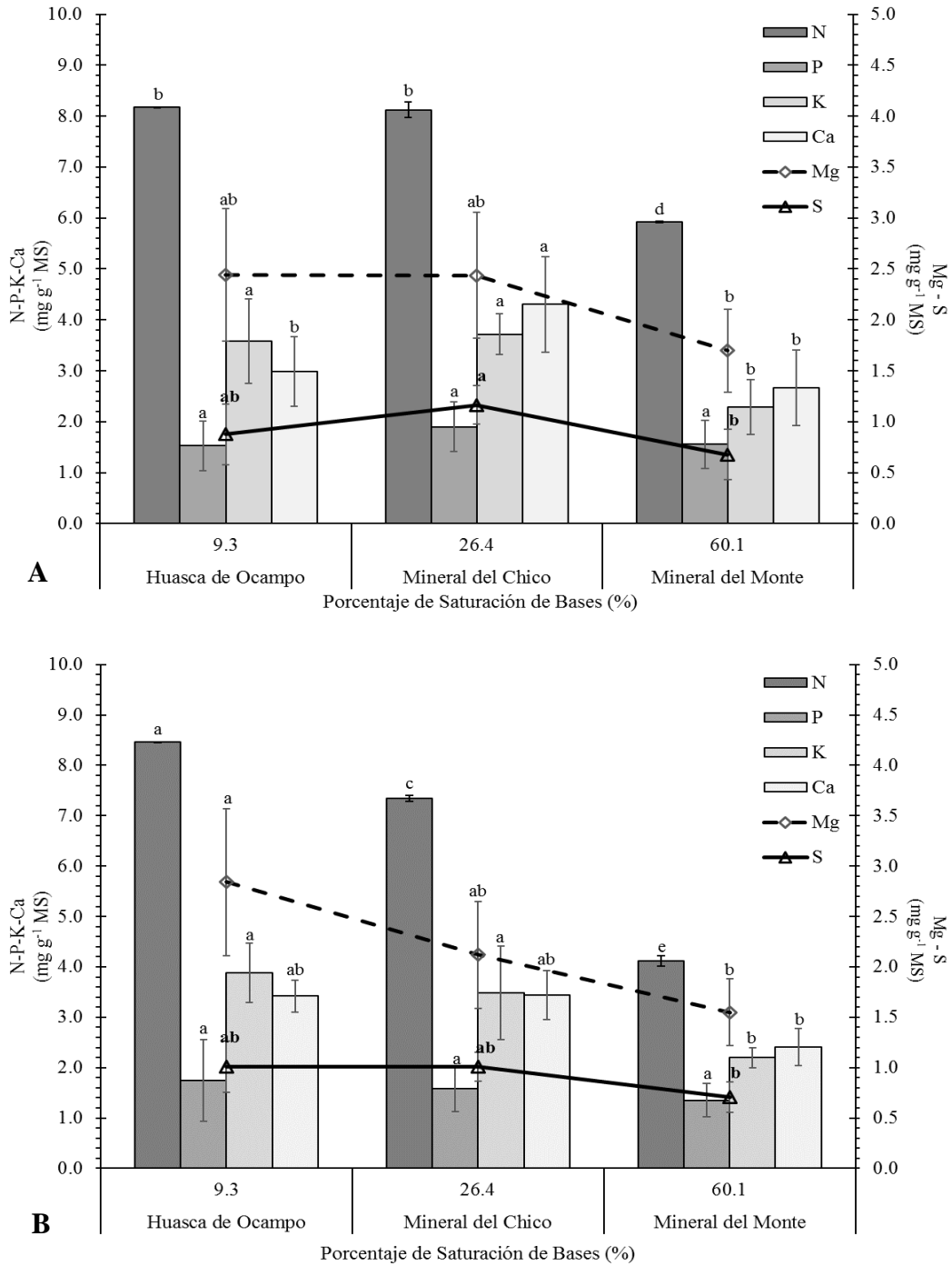


Figura 33. Extracción de macro-nutrientes (N-P-K-Ca-S) en plantas de *S. pilosa* (A) y *S. tomentosa* (B), en función del porcentaje de saturación de bases *in situ*.

En la concentración de microelementos (Fe, Zn, Mn, Mo) no se encontraron diferencias entre especies, pero entre sitios los mejores resultados en la concentración de Fe fueron

obtenidos en Mineral del Chico. En plantas de Huasca de Ocampo se obtuvo los valores más altos en Zn, Mn y Mo (Figura 34). Cabe destacar que se encontró una tendencia ascendente en función del incremento del porcentaje de bases.

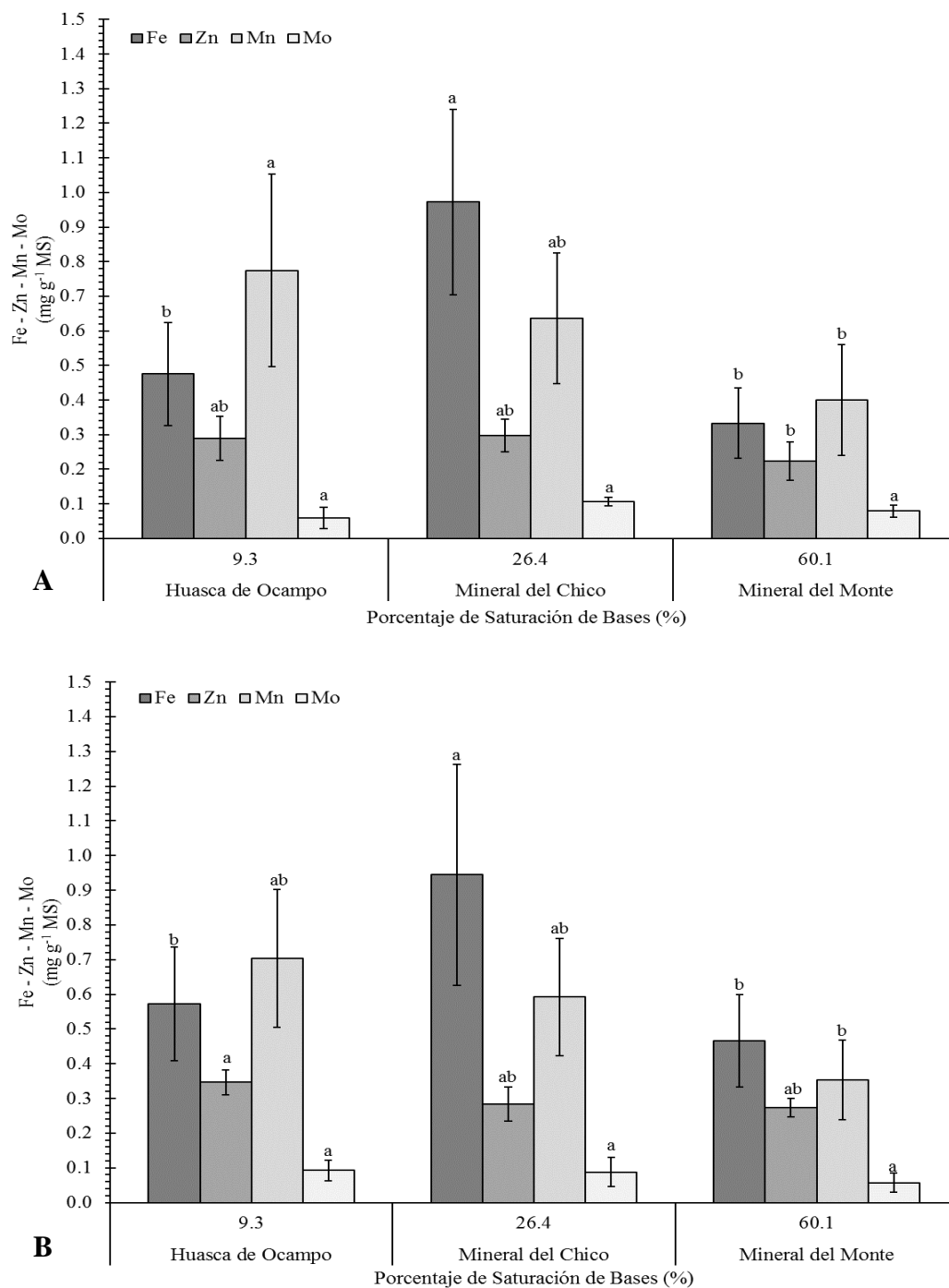


Figura 34. Extracción de micro-nutrientes (Fe-Zn-Mn-Mo) en plantas de *S. pilosa* (A) y *S. tomentosa* (B), en función del porcentaje de saturación de bases *in situ*.

La concentración de boro no mostró diferencias estadísticas. En contraste sodio y cobre tendieron a disminuir con el porcentaje de saturación. En la concentración de níquel no hubo diferencias (Figura 35).

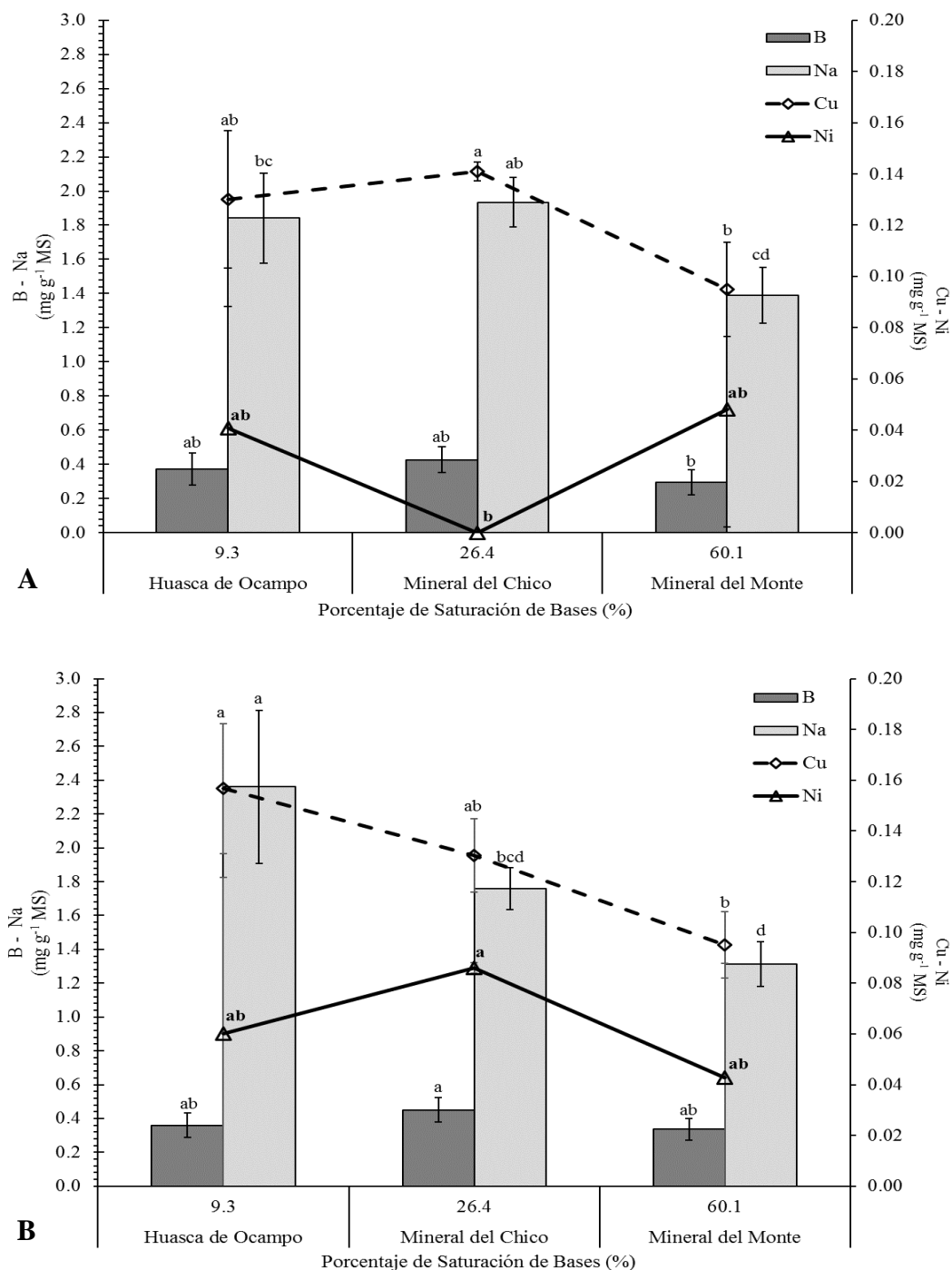


Figura 35. Extracción de micro-nutrientes (B-Na-Cu-Ni) en plantas de *S. pilosa* (A) y *S. tomentosa* (B), en función del porcentaje de saturación de bases *in situ*.

La generación de microambientes favorables, ricos en materia orgánica y nutrientes del suelo estimularían a las especies de *Stevia* a obtener concentraciones altas de nutrientes. Sin embargo, en condiciones de baja concentración de elementos se tienen los mejores resultados, lo cual demuestra que dichas especies para su crecimiento y acumulación de minerales requieren pocos nutrientes.

6.5.2 Contenido nutrimental en especies de *Stevia* cultivadas bajo diferentes soluciones nutritivas en invernadero.

La fuente de variación especie, solución nutritiva y la interacción de éstas indica que hubo diferencias entre elementos minerales. El nitrógeno fue altamente significativo para las fuentes de variación. En el factor especie sólo B, Cu y Na tuvieron efectos significativos. Mismo caso sucedió con el factor solución nutritiva, pero sólo algunos elementos fueron significativos (P, K, Ca). La interacción entre especies y sitios de muestreo el N, B y Na fueron altamente significativo (Cuadro 26). La extracción nutrimental por la planta es variable dentro de una misma especie, y esta depende del cultivar, el órgano muestreado, la tecnología de producción y el nutriente (Terbe *et al.*, 2006).

Cuadro 26. Significancia estadística del análisis de varianza de la concentración nutrimental en plantas de *Stevia* en función de la solución nutritiva.

Elementos minerales	Fuente de variación			
	Macronutrientes	Especie	Solución nutritiva	Especie X Solución
N	12.29**	8.46**	2.78**	
P	0.02ns	0.51*	0.054ns	
K	0.858ns	1.289*	0.660ns	
Ca	0.211ns	0.861*	0.304ns	
Mg	0.363ns	0.684ns	0.416ns	
S	0.177ns	0.222ns	0.065ns	
Micronutrientes				
Fe	0.0201ns	0.0319ns	0.0431ns	
Zn	0.0027ns	0.0019ns	0.0039ns	
Mn	0.0029ns	0.0019ns	0.0006ns	
Mo	0.0004ns	0.0004ns	0.00001ns	
B	0.0068**	0.0080**	0.0038**	
Cu	0.0006**	0.0014**	0.0002ns	
Na	0.3112**	0.3428**	0.1973**	
Ni	0.0002ns	0.0004ns	0.0007ns	

** = Altamente significativo; * = Significativo; ns = No significativo.

En el análisis de comparación de medias se encontraron diferencias estadísticas en cada uno de los tratamientos evaluados. El uso de la solución Steiner otorga los elementos minerales para el crecimiento de *S. tomentosa* y se obtienen las mayores concentraciones de macroelementos (Figura 36B). Se puede inferir, que en las soluciones nutritivas a medida que se incrementa el balance iónico se observa una tendencia lineal ascendente sobre la concentración de macroelementos en *S. tomentosa*. Sin embargo, para *S. pilosa* utilizar solución mineral o vermicompost no se obtienen diferencias en las concentraciones minerales (Figura 36A).

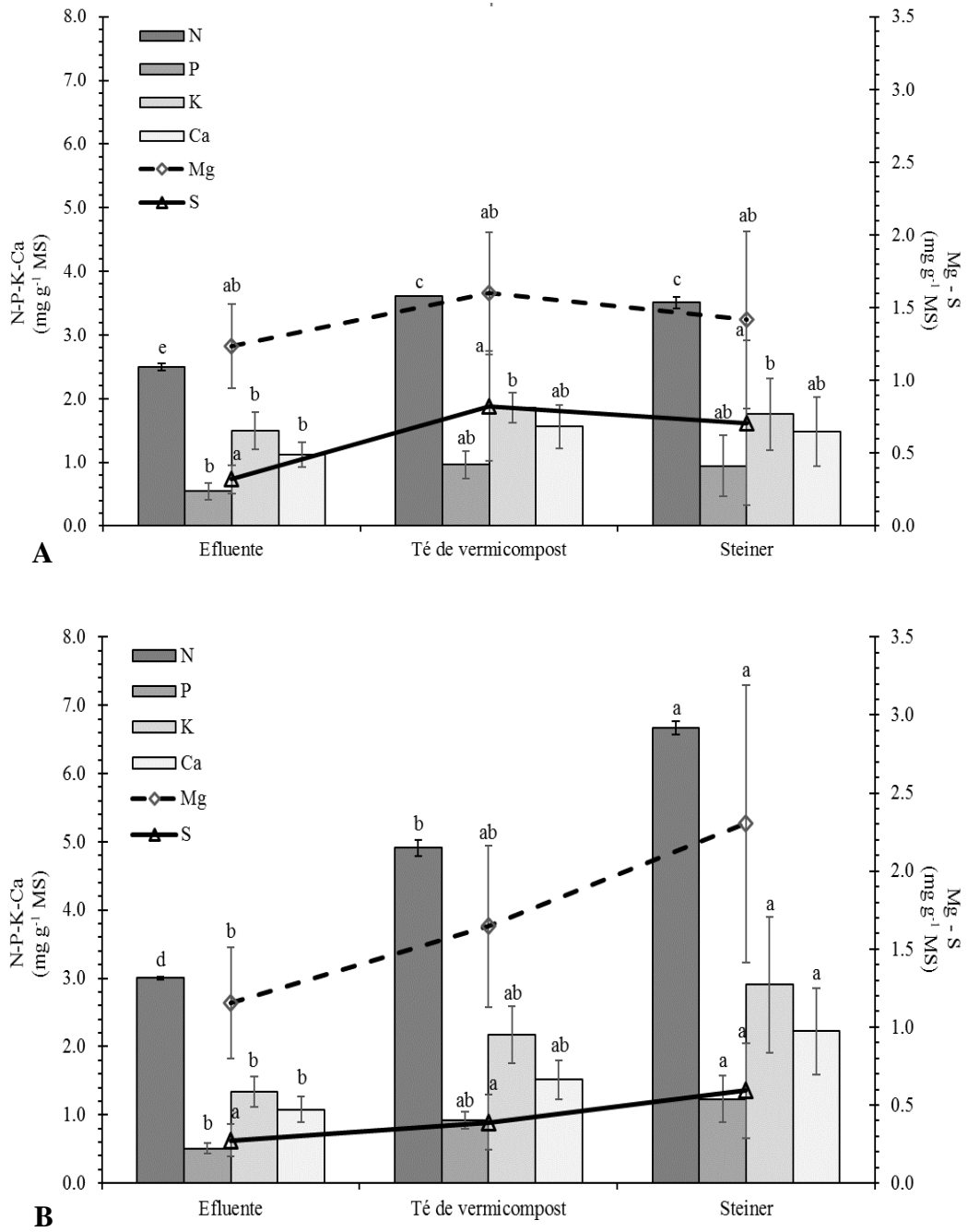


Figura 36. Extracción de macro-nutrientes (N-P-K-Ca-S) en plantas de *S. pilosa* (A) y *S. tomentosa* (B) cultivadas bajo diferentes soluciones nutritivas en invernadero.

Por otra parte no se encontraron diferencias estadísticas en microelementos como Fe, Mn y Mo; mientras que con Zn, la solución Steiner se obtiene la mayor concentración (Figura 37).

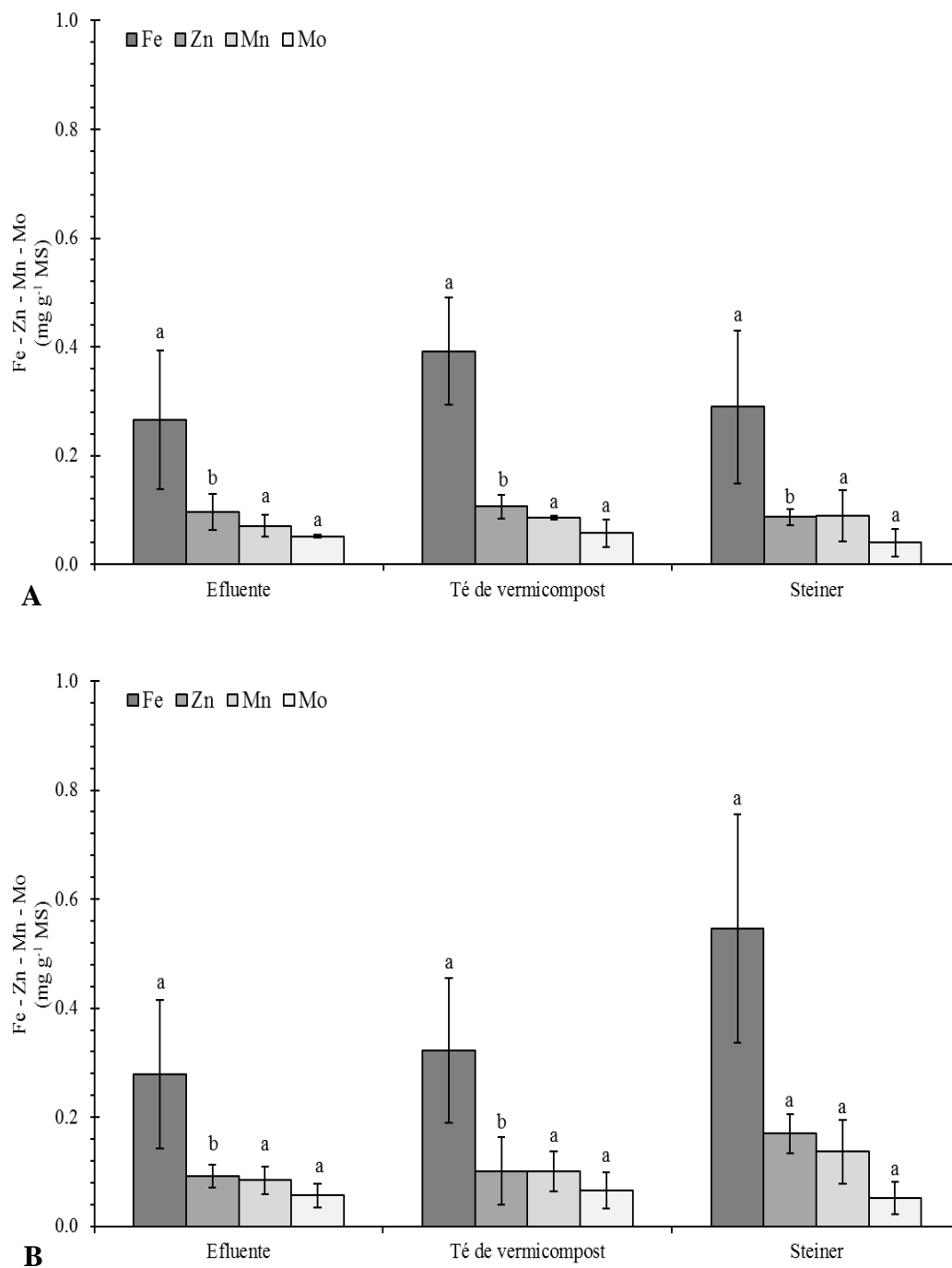


Figura 37. Extracción de micro-nutrientes (Fe-Zn-Mn-Mo) en plantas de *S. pilosa* (A) y *S. tomentosa* (B) cultivadas bajo diferentes soluciones nutritivas en invernadero.

En *S. pilosa* se obtienen bajas concentraciones de los microelementos (B, Na, Cu y Ni) (Figura 38A); sin embargo, con *S. tomentosa* la extracción es alta y es con la solución Steiner que se obtienen mejores resultados (Figura 38B).

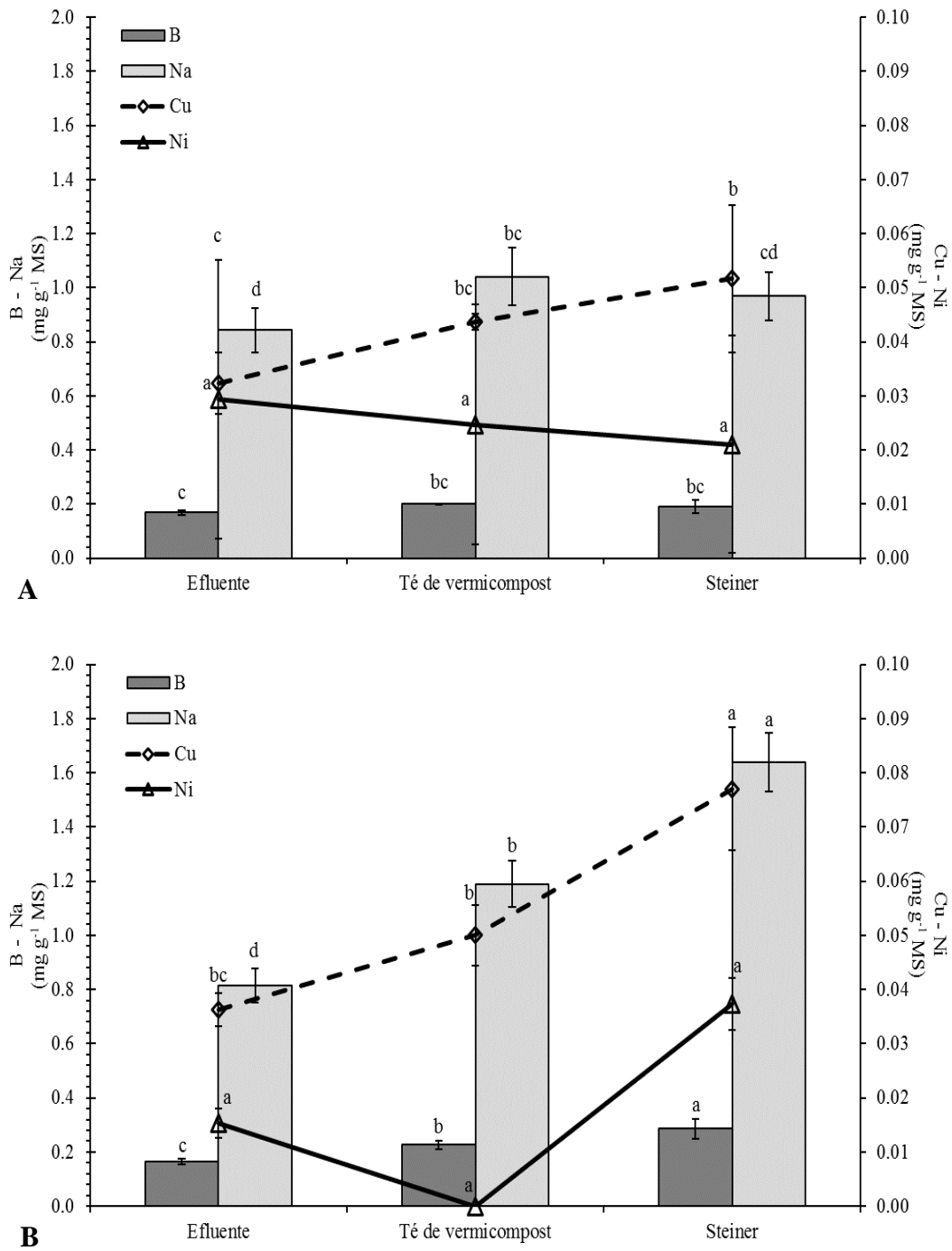


Figura 38. Extracción de micro-nutrientes (B-Na-Cu-Ni) en plantas de *S. pilosa* (A) y *S. tomentosa* (B) cultivadas bajo diferentes soluciones nutritivas en invernadero.

6.5.3 Contenido nutrimental de *Stevia* bajo diferentes porcentajes de vermicompost como sustrato en invernadero.

El efecto significativo en la fuente de variación sustrato indica que las diferentes proporciones de vermicompost influyen sobre la concentración de macros y microelementos en las plantas de *Stevia* (Cuadro 27). El N como elemento esencial fue significativo en las tres fuentes de variación.

Cuadro 27. Significancia estadística del análisis de varianza de la concentración nutrimental en plantas de *Stevia* en función del porcentaje de vermicompost.

Elementos minerales	Fuente de variación			
	Macroelementos	Especie	Sustrato	Especie X Sustrato
N	28.86**	151.55**	5.98**	
P	0.56ns	10.22**	0.73ns	
K	1.86ns	48.22**	2.67ns	
Ca	0.82ns	7.82**	1.25ns	
Mg	0.69ns	9.13**	1.17ns	
S	0.21ns	2.78**	0.22ns	
Microelementos				
Fe	0.038ns	0.950**	0.145ns	
Zn	0.002ns	0.108**	0.011ns	
Mn	0.026ns	0.121ns	0.016ns	
Mo	0.0008ns	0.009*	0.0037ns	
B	0.016ns	0.171**	0.016ns	
Cu	0.0007ns	0.021**	0.0013ns	
Na	0.72ns	4.90**	0.43ns	
Ni	0.00002ns	0.00148ns	0.00179ns	

** = Altamente significativo; * = Significativo; ns = No significativo.

En la Figura 39 se muestra la extracción total de macronutrientes. El N y K fueron los elementos más demandados por las plantas de *Stevia* en las diferentes proporciones de vermicompost. La extracción total por ambas especies de *Stevia* tuvo el orden siguiente: N > K > Mg > Ca > P > S. En contraste, Tadhani y Subhash (2006) obtuvieron concentraciones altas en el orden siguiente; K > Ca > Mg > P > Na en hojas de *S. rebaudiana*. La concentración de N estuvo en función de la concentración de vermicompost para ambas especies, pero, *S. pilosa* fue más eficiente en la asimilación de nitrógeno independientemente del porcentaje de vermicompost (Figura 39A). El K fue el elemento de mayor absorción después del N, probablemente por su importancia como agente osmótico en la planta (Epstein y Bloom, 2005; Hawkesford *et al.*, 2012).

Se encontraron diferencias estadísticas en la extracción de P en función del porcentaje de vermicompost, siendo los sustratos más sobresalientes 50, 75 y 100 % de vermicompost en *S. pilosa*. Sin embargo, con *S. tomentosa* sólo fueron las dos primeras proporciones. Mismo caso sucedió para las extracciones de Ca (Figura 39). La extracción de P disminuyó con respecto a los demás elementos minerales debido a la disminución en los procesos de fosforilación (fotosíntesis, glucólisis, ciclo de Krebs, entre otros) conforme al envejecimiento de la planta (Khandan y Schenk, 2009; Hawkesford *et al.*, 2012). Los datos obtenidos de la extracción en *S. tomentosa* muestra la mayor concentración en Mg con el 100 % de vermicompost en comparación con *S. pilosa*. No se estimaron diferencias ($p \leq 0.05$) entre sustratos con 75 y 100 % sobre la concentración de S en ambas especies.

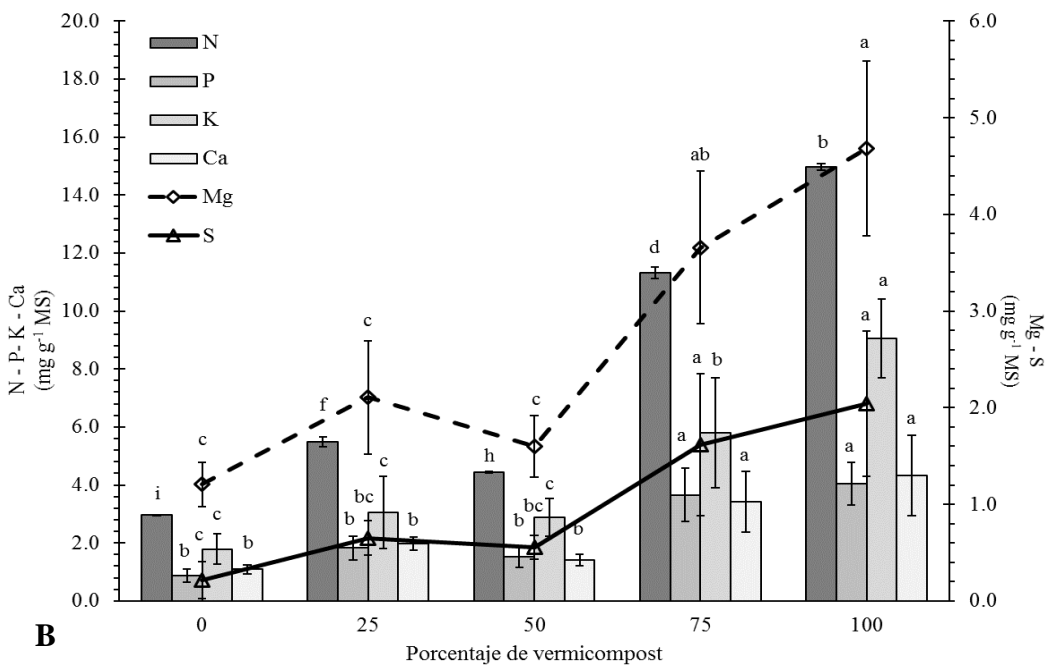
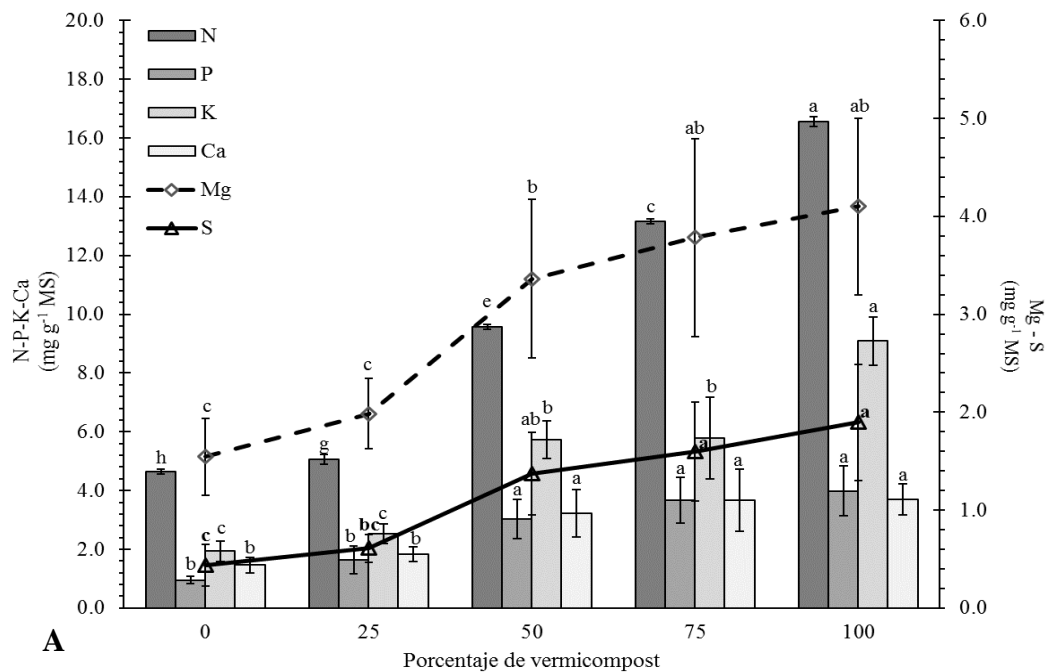


Figura 39. Extracción de macro-nutrientes (N-P-K-Ca-Mg-S) en plantas de *S. pilosa* (A) y *S. tomentosa* (B) cultivadas bajo diferentes porcentajes de vermicompost como sustrato en invernadero.

El Fe es un componente de las metalo-proteínas y asume la función de catalizador de procesos respiratorios y formación de clorofila (Broadley *et al.*, 2012a). La extracción de Fe por las especies de *Stevia* estuvo uniforme en todos los tratamientos, por lo que no se encontraron diferencias estadísticas (Figura 40). El Zn actúa en la síntesis de auxinas, es activador enzimático e influye en la permeabilidad de membranas (Broadley *et al.*, 2012a). Numéricamente, *S. tomentosa* y *S. pilosa* fueron similares sobre la extracción de Zn con el 75 y 100 % de vermicompost. Mismo caso sucedió con el Mn.

El Mo, constituyente de enzimas (reductase del nitrato, nitrogenase), es necesario en el proceso de fijación biológica y metabolismo del nitrógeno (Broadley *et al.*, 2012a). La mayor extracción de Mo se encontró con *S. pilosa* desarrollada sobre el 100 % de vermicompost (Figura 40). La extracción total por ambas especies de *Stevia* tuvo el siguiente orden: Fe > Mn > Zn > Mo, resultados similares se reportan en Tadhani y Subhash (2006).

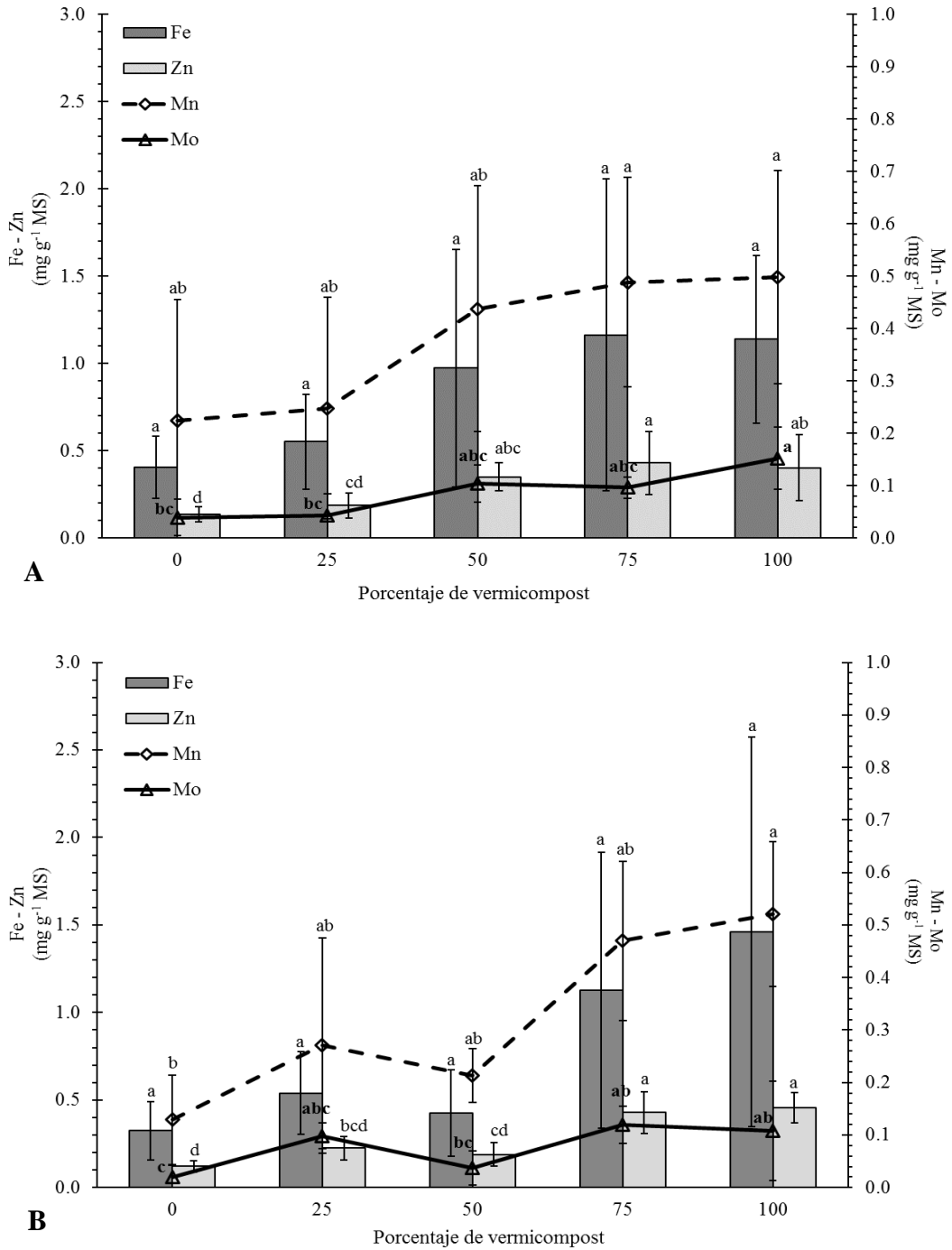
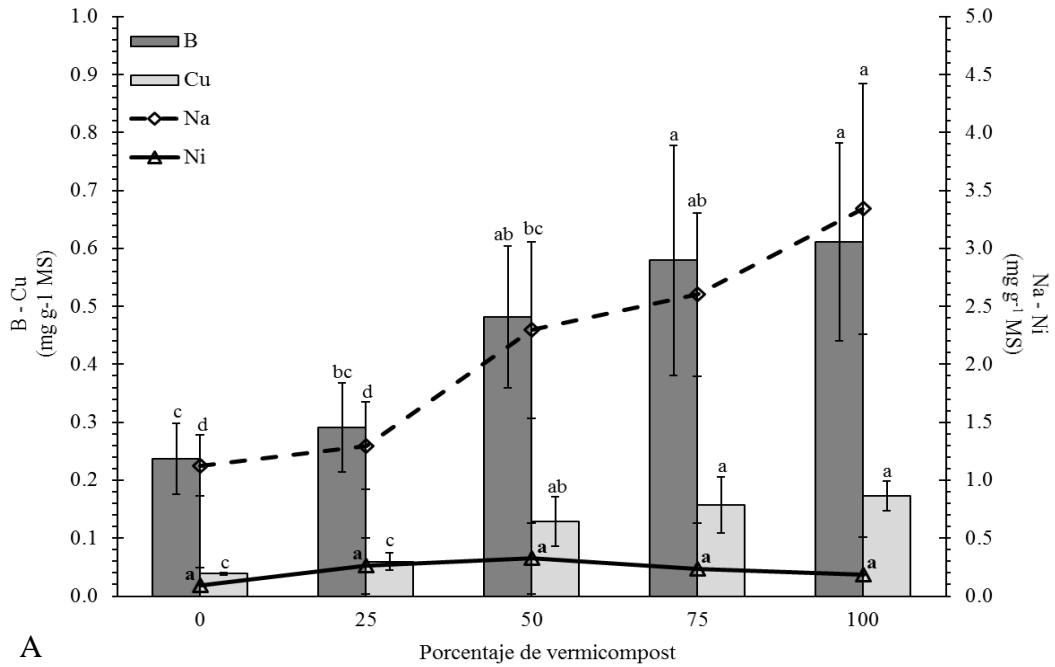


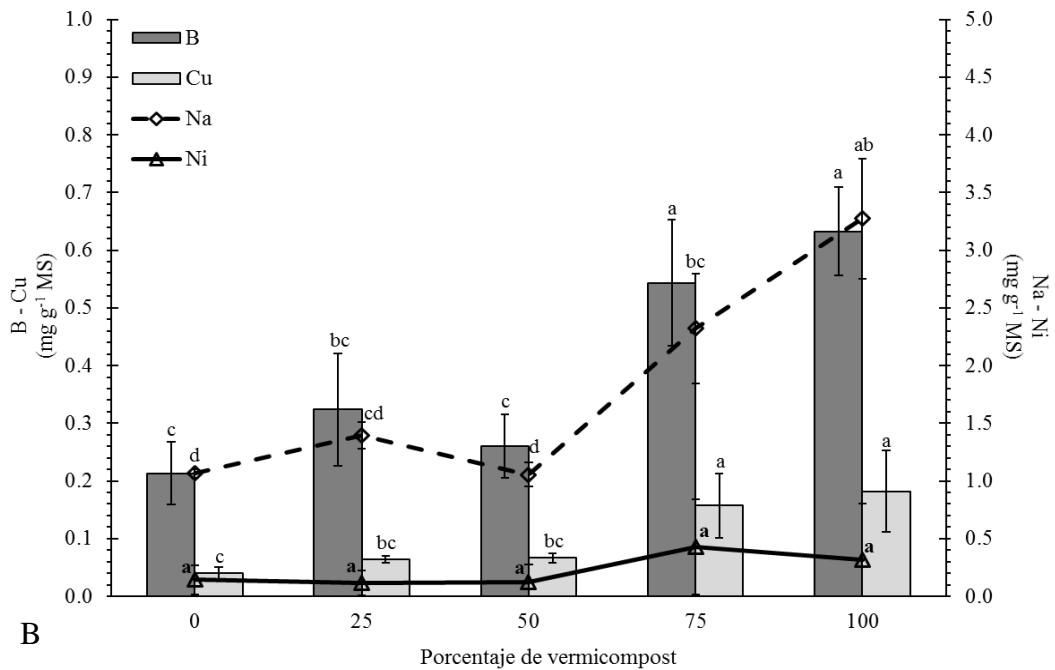
Figura 40. Extracción de micro-nutrientes (Fe-Zn-Mn-Mo) en plantas de *S. pilosa* (A) y *S. tomentosa* (B) cultivadas bajo diferentes porcentajes de vermicompost como sustrato en invernadero.

El Boro tiene un efecto estabilizante en los complejos de calcio de la lamela media y es capaz de influenciar en algunos procesos fisiológicos que se encuentran bajo el control hormonal (Broadley *et al.*, 2012a). Las mayores extracciones de B se obtuvieron con el 75 y 100 % de vermicompost en ambas especies; sin embargo, no hubo diferencias estadísticas. Mismo caso sucedió con el Cu. El Na no es un elemento esencial para las plantas, pero puede ser usado en pequeñas cantidades, como auxiliar para el metabolismo y la síntesis de clorofila. En las plantas puede ser empleado como sustituto parcial de K (útil en la apertura y el cierre de estomas), ayuda a regular el equilibrio interno de agua (Broadley *et al.*, 2012b). La extracción de Na estuvo en función del porcentaje de vermicompost, pero numéricamente, *S. pilosa* fue mejor que *S. tomentosa* en cuanto a extracción de este elemento (Figura 41A y B). Por otro lado, no se encontraron diferencias estadísticas sobre extracción de Ni. La extracción total por ambas especies fue en el orden siguiente: Na > B > Cu > Ni.

La proporción de vermicompost con mayor disponibilidad de nutrimentos fue 75 y 100 %, sin embargo, cuando comparamos con el 50 %, *S. pilosa* es más eficiente en la absorción de elementos minerales con respecto a *S. tomentosa*.



A



B

Figura 41. Extracción de micro-nutrientes (B-Cu-Na-Ni) en plantas de *S. pilosa* (A) y *S. tomentosa* (B) cultivadas bajo diferentes porcentajes de vermicompost como sustrato en invernadero.

VII. CONCLUSIONES

- En campo, el clima templado húmedo y condiciones edáficas de manejo permiten crecimiento y frondosidad mayores en ambas especies, pero con clima cálido y suelo con bajo porcentaje de saturación de bases aumenta la concentración nutrimental y de terpenos totales.
- Las diferencias entre las especies indicaron que el clima semi-frío en un suelo Luvisol favorecen el crecimiento de *S. pilosa*. El crecimiento de *S. tomentosa* fue menos dependiente del clima y el tipo de suelo, pues las diferencias no fueron significativas entre los sitios.
- La solución universal Steiner favorece el crecimiento de ambas especies y en *S. tomentosa*, además incrementa el contenido de fenoles, flavonoides y nutrimentos.
- El crecimiento y la concentración nutrimental de *S. pilosa* se favorece poco con el té de vermicompost y la solución Steiner, pero con el efluente de vermicompost se incrementa el contenido de terpenos.
- A mayor proporción de vermicompost mayor y mejor crecimiento, acumulación de nutrientes y metabolitos secundarios en ambas especies.
- Las concentraciones de vermicompost 75 y 100 % favorecen el crecimiento de *S. pilosa* por la disponibilidad nutrimental alta; sin embargo, *S. tomentosa* requiere menor cantidad de nutrimentos (25 % de vermicompost) lo que indica que esta especie demanda menos nutrimentos.

VIII. LITERATURA CITADA

- Adhikary S. 2012. Vermicompost, the story of organic gold: A review. *Agricultural Sciences* 3: 905-917.
- Afifi A., S. May and V. A. Clark. 2012. *Practical multivariate analysis*. Fifth edition. CRC Press, Taylor and Francis Group. Boca Raton. 517 p.
- Ahmad N., A. Rab and N. Ahmad. 2016. Light-induced biochemical variations in secondary metabolite production and antioxidant activity in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert). *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 154: 51–56.
- Ahmad A. S., X. Xie, L. Wang, M. Farrukh S., Ch. Man and W. Lei 2011. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research* 6 (9): 2026 – 2032.
- Álvarez, G. R. 2005. Estudio estereoquímico y conformacional de algunos metabolitos secundarios aislados de *Stevia pilosa* y *Stevia tomentosa*. Tesis Doctorado en Ciencias. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 187 p.
- Álvarez-García R., J. Torres-Valencia, L. Román, J. Hernández, C. Cerda-García-Rojas and P. Joseph-Nathan. 2005. Absolute Configuration of the α -methylbutyryl residue in longipinene derivatives from *Stevia pilosa*. *Phytochemistry* 66: 639-642.
- Amaro, J. M., Adrifin, M., Cerda, C. M. and Joseph-Nathan P. 1988. Longipinene derivatives from *Stevia lucida* and *S. triflora*. *Phytochemistry*: 27.
- Andrioli, R. J., R. A. Distel, and N. G. Didoné. 2010. Influence of cattle grazing on nitrogen cycling in soils beneath *Stipa tenuis*, native to central Argentina. *Journal Arid Environments* 74: 419 – 422.

- Arancon N. Q., C. A. Edwards, P. Bierman, J. D. Metzger, and C. Lucht. 2005. Effects of vermicomposts produced from cattle manure, food waste and paper waste on the growth and yield of peppers in the field. *Pedobiologia* 49: 297–306.
- Arancon N., C. A. Edwards, K. A. Webster and J. C. Buckerfield. 2010. The potential of vermicomposts as plant growth media for greenhouse crop production. *In*: C. A. Edwards, N. Q. Arancon and R. L. Sherman (Eds.) *Vermiculture Technology: Earthworms, organic wastes and environmental Management*. CRC press. pp 103 – 124.
- Atiyeh R. M., C. A. Edwards, J. D. Metzger, S. Lee and N. Q. Arancon. 2002a. The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. *Bioresource Technology* 84:7–14.
- Atiyeh R. M., N. Q. Arancon, C. A. Edwards, and J. D. Metzger. 2002b. The influence of earthworm- processed pig manure on the growth and productivity of marigolds. *Bioresource Technology* 81: 103-108.
- Atzoria G., A. C. De Vos, M. V. Rijsselbergheb, P. Vignolini, J. Rozema, S. Mancuso, and P. M. V. Bodegomf. 2017. Effects of increased seawater salinity irrigation on growth and quality of the edible halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. under field conditions. *Agricultural Water Management* 187: 37–46.
- Avalos A. y Pérez E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145.
- Balleza J. y L. Villaseñor J. 2002. La familia Asteraceae en el estado de Zacatecas. *Acta Botanica Mexicana* 59: 5–69.

- Barraza F. V., G. Fischer y C. E. Cardona. 2004. Estudio del proceso de crecimiento del cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el valle del Sinú medio, Colombia. *Agronomía Colombiana* 22: 81–90.
- Barquera Lozada J. E. and G. Cuevas. 2009. Biogenesis of Sesquiterpene Lactones Pseudoguaianolides from Germacranolides: Theoretical Study on the Reaction Mechanism of terminal Biogenesis of 8-Epiconferin. *J. Org. Chem.* 74(2): 874–883.
- Bassman J. H. 2004. Ecosystem consequences of enhanced solar ultraviolet radiation: secondary plant metabolites as mediators of multiple trophic interactions in terrestrial plant communities. *Photochemistry and Photobiology* 79 (5): 382–398.
- Basílio Z. D. and J. Galba B. 2012. Vermicompost humic substances: technology for converting pollution into plant growth regulators. *International Journal of Environmental Science and Engineering Research* 3(2): 73–84.
- Ben Haj Salah, H. y F. Tardieu. 1995. Temperature affects leaf expansion rate of maize without change in spatial distribution of cell length. Analysis of the coordination between cell division and cell expansion. *Plant Physiology* 109: 861–870.
- Blackmer, A.M., y A.P. Mallarino. 1996. Cornstalk testing to evaluate nitrogen management. Publ. PM-1584. Department of Agronomy, Iowa State University, Ames, Iowa, USA.
- Broadley M., P. Brown, I. Cakmak, Z. Rengel and F. Zhao. 2012a. Function of nutrients: micronutrients. In: Marschner P. (Ed.) *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. Third Edition. Academic Press. London. pp 191–248.
- Broadley M., P. Brown, I. Cakmak, J. Fend M., Z. Rengel and F. Zhao. 2012b. Beneficial elements. In: Marschner P. (Ed.) *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. Third Edition. Academic Press. London. pp 249–257.

- Brearen, L. M. and C. S. Mulvaney. 1982. Nitrogen-total. *In*: A. L. Page, R. H. Miller and D. R. Keeney (Eds.). Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties (Agronomy 9). Second Edition. American Society of Agronomy. Soil Science Society of America. Madison, WI. pp. 595–634.
- Borda M. D., J. M. Pardo G., J. S. Montaña L. y Ma. M. Martínez S. 2011. Influencia de la materia orgánica y *Azotobacter nigricans* en un cultivo de *Stevia rebaudiana*. *Universitas Scientiarum* 16 (3): 282 – 293.
- Calderón G. y J. Rzedowski. 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a. reimpresión. Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. 1406 p.
- Campbell, C. R. 2000. Reference sufficiency ranges for plant analysis in the southern region of the United States. N.C. Department of Agriculture and Consumer Services.
- Caponio I., S. C. Torres, G. Andersson y Norrmann G. A. 2016. Aspectos de la biología reproductiva de *Stevia rebaudiana* (Asteraceae). *Bonplandia* 25 (1): 59–71.
- Carballo T., M. V. Gil, L. F. Calvo, and A. Morán 2009. The influence of aeration system, temperature and compost origin on the phytotoxicity of compost tea. *Compost Science Utilization* 17: 127–139.
- Cariño–Cortés R., M. Arriaga A., A. Hernández C., R. Álvarez G. and M. González A. 2002. Actividad antimutagénica, antioxidante y antiinflamatoria de *Stevia pilosa* y *S. eupatoria*, una alternativa terapéutica. XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. p 19.
- Carter, M. R, E G. Gregorich, D. W. Anderson, J. W. Doran, H. H. Janzen and Pierce F. J. 1997. Concepts of soil quality and their significance. P 1-19 *In*: E G. Gregorich and

- M. Carter (Eds.) Soil quality for crop production and ecosystem health. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Netherlands.
- Casierra-Posada F., J. E. Peña-Olmos and C. Ulrichs. 2012. Basic growth analysis in strawberry plants (*Fragaria* sp.) exposed to different radiation environments. *Agronomía Colombiana* 30 (1): 1–9.
- Cerda C. M. and Pereda R. 2002. The phytochemistry of Stevia: a general survey. Taylor & Francis: 86-118.
- Ceunen S. and Geuns J. M. C. 2013. Spatio-temporal variation of the diterpene steviol in *Stevia rebaudiana* grown under different photoperiods. *Phytochemistry* 89: 32–38.
- Chacon P, E., J. H. Camacho-Tamayo and Arguello O. 2013. Establishment of DRIS norms for the nutritional diagnosis of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) clone RRIM 600 on the Eastern Plains of Colombia. *Agronomía Colombiana* 31 (2): 215-222.
- Chalapathi M. V., S. Thimmegowda and S. Sridhara. 1998. Correlation studies in stevia. *Indian Agriculturist* 42 (2): 137 – 138.
- Chang C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. 2002. Estimation of total flavonoids content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10 (3), 178–182.
- Chávez-Mendoza C. and Sánchez E. 2017. Bioactive Compounds from Mexican Varieties of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*): Implications for Health. *Molecules* 22 (8): 1 - 32.
- Clavijo J. 1989. Análisis de crecimiento en malezas. *Revista Comalfi* 15: 12–16.
- CONABIO. 2014. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Malezas de México. Obtenido de la red:

- <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/stevia-tomentosa/fichas/ficha.htm>. Consultado 04 – 08 – 2014.
- Cuanalo C., H. 1990. Manual para la descripción de perfiles de suelo en campo. 3ra. Edición. Colegio de Postgraduados.
- Cui N, K Nakamura, S Tian, H Kayahara, and Tian. 2006. Polyphenolic content and physiological activities of chinese hawthorn extracts. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 70: 2948–2956.
- Damgaard, C. and Weiner, J. 2008. Modeling the growth of individuals in crowded plant populations. *Journal of Plant Ecology* (1): 111–116.
- Daughtry C. S. T., K. P. Gallo, M. E. Bauer. 1983. Spectral estimates of solar radiación intercepted by corn canopies. *Agronomy Journal* 72: 527 – 533.
- De la Casa, A.; G. Ovando, L. Bressanini, J. Martínez y A. Rodríguez. 2011. Eficiencia en el uso de la radiación en papa estimada a partir de la cobertura del follaje. *Agriscientia* 28: 21 – 30.
- Del Vitto L. A. and M. Petenatti E. 2009. Astereceae of economic and enviromental importance frist part. Morphologic al and taxonomic sinopsis, enviromental importance and plants of industrial value. *Multequina* 18: 87-115.
- Doran, J. W. A., A. Sarrantonio and Liebig M. A. 1996. Soil health and sustainability. *Advances in Agronomy* 56: 1 – 54.
- Ducruet, J. M., V. Peeva and M. Havaux. 2007. Chlorophyll thermofluorescence and thermoluminescence as complementary tools for the study of temperature stress in plants. *Photosynthesis Research* 93: 159 – 171.

- Edwards C. A. and Arancon N. Q. 2004. Interactions among Organic Matter, Earthworms, and Microorganisms in Promoting Plant Growth. *In*: F. Magdoff and R. R. Weil. (Eds.). Soil Organic Matter in Sustainable Agriculture. CRC press. pp 347 - 353.
- Enriz R. D., Rodriguez A. M. y Jauregui E. A. 1998. Estudio de la relación estructura-Actividad Citoprotectora Gastrica de Lactonas Sesquiterpenicas y Compuestos Estructuralmente Relacionados. *Acta Farm. Bonaerense* 17(1): 41-52.
- Epstein E. and A. J. Bloom. 2005. Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives. Sinauer Associates. Sunderland. Massachusetts, USA. 400 p.
- Ewané, C. A., P. Lepoivre, L. de Lapeyre de Bellaire and L. Lassois. 2012. Involvement of phenolic compounds in the susceptibility of bananas to crown rot. A review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 16 (3): 393 – 404.
- Fanelli G. and M. De Lillis. 2004. Relative growth rate and hemerobiotic state in the assessment of disturbance gradients. *Applied Vegetation Science* 7 (1): 133–140.
- Ferrari, M., H. Castellarín, H.R. Saiz Rozas, H.S. Vivas, R.J.M. Melchiori, y V. Gudelj. 2010. Evaluación de métodos de diagnóstico de fertilidad nitrogenada para el cultivo de trigo en la región pampeana. *Actas XXII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo*. Rosario, Santa Fe, AACS.
- Ferreira A. R., S. Delmar dos Anjos E. and E. Diedrich E. 2011. Análise de crescimento de mamona semeada em diferentes épocas. *Ciência Rural*, Santa Maria 41 (8): 1347-1353.
- Foster, B. R., N. C. Hernández, E., E. K. Kakudidi y R. J. Burnham. 1995. Un método de transectos variables para la evaluación rápida de comunidades de plantas en los trópicos. Manuscrito no publicado. Chicago: Environmental and Conservation

- Programs, Field Museum of Natural History; and Washington, D. C.: Conservation Biology, Conservation International.
- Galmes, J., J. Cifre, H. Medrano, and J. Flexas. 2005. Modulation of relative growth rate and its components by water stress in Mediterranean species with different growth forms. *Oecologia* 145: 21–31.
- García R. C. and Pereda M. R. 2002. The phytochemistry of the Stevia: a general survey. *In Stevia: the Genus Stevia; Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles* (vol. 19), Kinghorn, A. D. Ed. Taylor & Francis: London. pp 86–118.
- García-Sánchez C. A., A. Sánchez-González y Villaseñor J. L. 2014. La familia Asteraceae en el Parque Nacional Los Mármoles, Hidalgo, México. *Acta Botánica Mexicana* 106: 97-116.
- González S. K. D., M. N. Rodríguez M., L. I. Trejo T., J. Sánchez E. y J. L. García C. 2013. Propiedades químicas de tés de vermicompost. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5: 901 – 911.
- Grashoff, J. L. 1972. A systematic a study of the North Central and Souter, American. *Species of Stevia dibbertartion*. University of Texas. Austin 609 pp.
- Grubb, P. J., W. G. Lee, J. Kollmann, and J. B. Wilson. 1996. Interaction of irradiance and soil nutrient supply on growth of seedlings of ten European tall-shrub species and *Fagus sylvatica*. *Journal of Ecology* 84:827–840.
- Gutiérrez C, Ma. Del C., C. A. Ortiz S. y P. Sánchez G. 2003. *Edafología General*. Especialidad de Edafología, Instituto de Recursos Naturales, Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, Texcoco, Estado de México. 74-84 pp.

- Gutiérrez-Miceli F. A., R. C. García-Gómez., R. Rincón R., M. Abud- Archila., M. A. Oliva L., M. J. Guillen C., and L. Dendooven. 2008. Formulation of a liquid fertilizer for sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) using vermicompost leachate. *Bioresource Technology* 99: 6174–6180.
- Harborne, J. B. 1998. *Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Third Edition. Chapman & Hall. London. 288p.
- Hatfield, J. L. and Prueger, J. H. 2015. Temperature extremes: Effect on plant growth and development. *Weather and Climate Extremes* 10, 4–10.
- Hawkesford M., W. Horst, T. Kichey, H. Lambers, J. Schjoerring, I. Skrumsager Moller, and P. White. 2012. Function of macronutrients. *In* Marschner P. (Ed.) *Marschner's mineral nutrition*. Third Edition. Academic Press. London. pp. 135-178.
- Hendawy S. F., A. A. Ezz El-Din, E. E. Aziz, and E. A. Omer. 2010. Productivity and oil quality of *Thymus vulgaris* L. under organic fertilization conditions. *Ozean Journal of Applied Science* 3(2): 203–216.
- Hernández L.R., C. A. N. Catalán and P. Joseph-Nathan. 1998. The Chemistry of the Genus *Stevia* (Asteraceae). *Rev. Acad. Colomb. Cieñe. Ex. Fís. Nat.* 22: 229 – 279.
- Hoffmann W. A. and Poorter H. 2002. Avoiding Bias in Calculations of Relative Growth Rate. *Annals of Botany* 90 (1): 37–42.
- Hohmann M. S. N., D. T. Longhi-Balbinot, C. F. S. Guazelli, S. A. Navarro, A. C. Zarpelon, R. Casagrande, N. S. Arakawa and W. A. Verri Jr. 2016. Sesquiterpene Lactones: structural diversity and perspectives as antiinflammatory molecules. *Studies in Natural Products Chemistry* 49: 243–260.

- Hunt R. 2017. Growth analysis, individual plants. In: Encyclopedia of Applied Plant Sciences. 2nd. ed. B. Thomas, B. G. Murray and D. J. Murphy (Eds.). Academic Press. Oxford, UK. pp: 421–429.
- Iloki-Assanga S. B., A. A. Gil-Salido, L. M. Lewis Luján, A. Rosas-Durazo, A. L. Acosta-Silva, E. G. Rivera-Castañeda and Rubio-Pino J. L. 2013. Cell growth curves for different cell lines and their relationship with biological activities. International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research 4 (4): 60–70.
- Ingham E. 2005. The Compost Tea Brewing Manual; Latest Methods and Research. Soil Food Web Incorporated, Fifth Edition. Corvallis, OR. 79 p.
- ISRIC (Centro Internacional de Referencia e Información en Suelos). 1995. Procedimientos para análisis de suelos. 1 – 145. In: L. P. Van Reeuwijk (Ed.). Procedures for Soil Analysis. Ma. del C. Gutiérrez C., C A. Tavarez E. y C. A. Ortiz S. (Trads.). Colegio de postgraduados. Montecillo, México.
- IUSS Working Group WRB, 2006. World reference base for soil resources. A framework for international classification, correlation and communication. 2nd ed. World Soil Resources Report 103. FAO. Rome, Italy.
- Jarma O. A., C. Carranza G. y J. Clavijo P. 2010. Captación y uso de la radiación en plantas de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) en el Caribe colombiano. Agronomía Colombiana 28 (1): 1 – 11.
- Jarma A., T. Rengifo y H. Araméndiz T. 2005. Aspectos fisiológicos de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en el Caribe colombiano: I. Efecto de la radiación incidente sobre el área foliar y la distribución de biomasa. Agronomía colombiana 23 (2): 207–216.

- Jiménez-Leyva, J. A., A. Gutiérrez, J. A. Orozco, G. Vargas, M. Esqueda, A. Gardea, V. González-Hernández, E. Sánchez and Muñoz E. 2017. Phenological and ecophysiological responses of *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* to native arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus availability. *Environmental and Experimental Botany* 138: 193–202.
- Karimi M., A. Ahmadi, J. Hashemi, A. Abbasi, S. Tavarini, L. Guglielminetti and L. G. Angelini. 2015. The effect of soil moisture depletion on *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni) grown in greenhouse conditions: Growth, steviol glycosides content, soluble sugars and total antioxidant capacity. *Scientia Horticulturae* 183: 93 – 99.
- Khandan M. A. and M. K. Schenk. 2009. Characteristics of phosphorus uptake kinetics of poinsettia and marigold. *Scientia Horticulturae* 122: 251 – 257.
- Kikuzawa K. 2003. Phenological and morphological adaptations to the light environment in two woody and two herbaceous plant species. *Functional Ecology* 17: 29 – 38.
- Kozuka, T.; G. Horiguchi; G.T. Kim; M. Ohgishi T. Sakai y H. Tsukaya. 2005. The different growth responses of the *Arabidopsis thaliana* leaf blade and the petiole during shade avoidance are regulated by photoreceptors and sugar. *Plant Cell Physiology* 46: 213–223.
- Kujur R. S., V. Singh, M. Ram, H. N. Yadava, K. K. Singh, S. Kumari and Roy B. K. 2010. Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of *Stevia rebaudiana* in alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacognosy Research* 2 (4): 258 - 263.
- Kumar P. P., M. Mahajan, R. Prasad, V. Pathania, B. Singh and P. Singh A. 2015. Harvesting regimes to optimize yield and quality in annual and perennial *Stevia rebaudiana* under sub-temperate conditions. *Industrial Crops and Products* 65: 556 – 564.

- Liu X., G. Ren and Shi Y. 2011. The effect of organic manure and chemical fertilizer on growth and development of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Energy Procedia 5: 1200–1204.
- Manitto P. 1981. Biosynthesis of Natural Products. Wiley New York. Cap. 1-8.
- Magangana T. P. and Makunga. N. P. 2016. The effect of various factors on seed germination and the influence of abiotic stresses on growth productivity, physiology and differences in metabolite profiles (diterpene glycosides) of *Stevia rebaudiana* Bertoni. South African Journal of Botany 103: 324 – 325.
- Matsuda R., N. Ozawa and K. Fujiwara. 2014. Leaf photosynthesis, plant growth, and carbohydrate accumulation of tomato under different photoperiods and diurnal temperature differences. Scientia Horticulturae 170 (7): 150-158.
- Matuda, E. 1958. El género *Stevia* en el Valle de México y sus alrededores. Boletín de la Sociedad Botánica de México 23: 55–83.
- Marschner P. 2012. Rhizosphere biology. *In*: Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. P. 3rd edition. Marschner (Ed.). Academic Press. London. pp: 369–388.
- Meziane D. and B. Shipley. 1999. Interacting components of interspecific relative growth rate: constancy and change under differing conditions of light and nutrient supply. Funct Ecol. 13: 611–622.
- Missouri Botanical Garden. 2014. Missouri Botanical Garden's Herbarium, Botanical Research Institute of Texas. Obtenido de la red: <http://www.missouribotanicalgarden.org>. Consultado: 06 – 09 – 2014.
- Montemayor T. J. A., A. Zermeño G., J. Olague R., R. Aldaco N., M. Fortis H., E. Salazar S., J. C. Rodríguez R., y C. Vázquez-Vázquez. 2006. Efecto de la densidad y

- estructura del dosel de maíz en la penetración de la radiación solar. *International Journal of Experimental Botany* 75: 47 – 53.
- Moorby, J. 1970. The production, storage and translocation of carbohydrates in developing potato plants. *Annals Botany* 34: 297–308.
- Mostacedo B. y Fredericksen T. S. 2000. *Manual de Métodos Básicos de Muestreo y Análisis en Ecología Vegetal*. Santa Cruz, Bolivia. p 92.
- Muanda, F. N., R. Soulimani, B. Diop and A. Dicko. 2011. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* leaves. *LWT- Food Science and Technology* 44: 1865–1872.
- Muhammad, A., Kalil, S. K., Zaman, A., Habibullah, A., and Khan, M. S. 2014. Growth analysis of soybean landraces under extended planting dates. *Sarhad Journal Agriculture* 30 (3), 297–304.
- Munson, R. D., y Nelson W. L. 1986. Principles and Practices in Plant Analysis. *In*: Walsh L.M. y J.D. Beaton (Eds.). *Soil Testing and Plant Analysis*. 6th Ed. SSSAJ. Madison, Wisconsin, USA: 223-248.
- Naidu Y., S. Meon, J. Kadir, and Y. Siddiqui. 2010. Microbial Starter for the Enhancement of Biological Activity of Compost Tea. *International Journal of Agriculture and Biology* 12: 51–56.
- Nassi o Di Nasso N., N. Roncucci, F. Triana, C. Tozzini and E. Bonari. 2011. Productivity of giant reed (*Arundo donax* L.) and miscanthus (*Miscanthus × giganteus* Greef et Deuter) as energy crops: growth analysis. *Italian Journal of Agronomy* 6: 141–147.
- Necas, J. 1968. Growth analytical approach to the analysis of yielding capacity of potato varieties. *Photosynthetica* 2(2): 85 – 100.

- Nikbakht A., M. Kafi, M. Babalar, Y. P. Xia, A. Luo, and N. Etemadi. 2008. Effect of Humic Acid on Plant Growth, Nutrient Uptake, and Postharvest Life of Gerbera. *Journal of Plant Nutrition* 31: 2155-2167.
- NOSB. 2004 Compost Tea Task Force Final Report. National Organic Standards Board. April 6, 2004. www.ams.usda.gov/nosb/meetings/Compost_TeaTaskForceFinal_Report.pdf. (Consultado: 25/09/2016).
- Noyes, R. 2007. Apomixis in Asteraceae: Diamonds in the rough. *Functional Plant Science Biotechnology* 1: 207-222.
- Ochoa-Martínez E., U. Figueroa-Viramontes, P. Cano-Ríos, P. Preciado-Rangel, A. Moreno-Reséndez, y N. Rodríguez-Dimas. 2009. Té de Composta como Fertilizante Orgánico en la Producción de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Invernadero. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 15 (3): 245–250.
- Ortega R., and M. Fernández. 2007. Agronomic evaluation of liquid humus derived from earthworm humic substances. *Journal of Plant Nutrition* 30: 2091–2104.
- Ortiz S. C. A. y Ma. C. Gutiérrez C. 1999. Fundamentos de pedología. IRENAT, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. De México. 103 p.
- Padilla, F. M., J. D. Miranda y F. I. Pugnaire. 2007. Early root growth plasticity in seedlings of three Mediterranean woody species. *Plant and Soil* 296 (1–2): 103–113.
- Pal P. K., R. Kumar, V. Guleria, M. Mahajan, R. Prasad, V. Pathania, B. S. Gill, D. Singh, B. Gopichand Singh, R. D. Singh and P. S. Ahuja. 2015. Crop-ecology and nutritional variability influence growth and secondary metabolites of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *BMC Plant Biology* 15:67.
- Pant P. A., T. J. K. Radovich, N. V. Hue, S. T. Talcott, and K. A. Krenek. 2009. Vermicompost extracts influence growth, mineral nutrients, phytonutrients and

- antioxidant activity in pak choi (*Brassica rapa* cv. Bonsai, Chinensis group) grown under vermicompost and chemical fertilizer. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89: 2383–2392.
- Pant P. A., T. J. K. Radovich, N. V. Hue, and R. E. Paull. 2012. Biochemical properties of compost tea associated with compost quality and effects on pak choi growth. *Scientia Horticulturae* 148: 138–146.
- Patil, N. M. 2010. Biofertilizer efecto on growth, protein and carbohydrate content in *Stevia rebaudiana* var Bertonii. *Recent Research in Science and Technology* 2 (10): 42–44.
- Paulo C. C., N. F. Rodríguez L., S. C. V. Martins, M. S. Mattos, L. M. V. P. Sanglard and DaMatta F. M. 2012. Functional analysis of the relative growth rate, chemical composition, construction and maintenance costs, and the payback time of *Coffea arabica* L. leaves in response to light and water availability. *Journal of Experimental Botany* 63 (8): 3071–3082.
- Pereira, C., Storck, L., Lopes, S. J., Martin, T. N., and Bisognin, D. A. 2016. Dry biomass and glycosides yield from *Stevia rebaudiana* leaves under different harvesting times. *Bioscience Journal*, 32 (6), 1462–1471.
- Pérez E., C. González, F. Vaillant and M. Lares. 2016. *Stevia* derivative and its potential uses in diabetic directed foods. Review. *Journal of Nutrients* 3 (1): 1–20.
- Pérez, P. I. 2006. Metabolitos secundarios aislados de las raíces y las hojas de *Stevia jorullensis* H.B.K. Tesis de Licenciatura. Universidad Autonoma del Estado de Hidalgo. 87 p.
- Pommerening A. and A. Muszta. 2016. Relative plant growth revisited: towards a mathematical standardisation of separate approaches. *Ecological Modelling* 320: 383–392.

- Poorter H. and R. De Jong. 1999. A comparison of specific leaf area, chemical composition and leaf construction costs of field plants from 15 habitats differing in productivity. *New Phytologist* 143: 163–176.
- Poorter H., F. Fiorani, M. Stitt, U. Schurr, A. Finck, Y. Gibon, B. Usadel, R. Munns, O. K. Atkin, F. Tardieu and T. L. Pons. 2012a. The art of growing plants for experimental purposes: a practical guide for the plant biologist. *Functional Plant Biology* 39 (11): 821–838.
- Poorter H., K. J. Niklas, P. B. Reich, J. Oleksyn, P. Poot and Mommer L. 2012b. Biomass allocation to leaves, stems and roots: meta-analyses of interspecific variation and environmental control. *New Phytologist* 193 (1): 30–50.
- Quaik S., A. Embrandiri, P. F. Rupani, and M. H. Ibrahim. 2012. Potential of vermicomposting leachate as organic foliar fertilizer and nutrient solution in hydroponic culture: a review. 2nd International Conference on Environment and BioScience 44: 43–47.
- Quero, J. L., R. Villar, T. Marañón, R. Zamora, D. Vega and Sack L. 2008. Relating leaf photosynthetic rate to whole-plant growth: drought and shade effects on seedlings of four *Quercus* species. *Functional Plant Biology* 35 (8): 725–737.
- Rekha G.S., K. Valivittan and P. K. Kaleena. 2013. Studies on the influence of vermicompost and vermishash on the growth and productivity of Black Gram (*Vigna mungo*). *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*. 13 (6): 783 – 790.
- Reyes, J. I. 2014. Una ojeada a la clasificación del suelo. *ContactoS* 91: 30 – 40.
- Rincón G. N., M. A. Olarte Q. y J. C. Pérez N. 2012. Determinación del Área Foliar en Fotografías Tomadas con una Cámara Web, un Teléfono Celular o una Cámara

- Semiprofesional. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín 65 (1): 6399 – 6405.
- Rodríguez, D. N., P. Cano R., U. Figueroa V., E. Favela Ch., A. Moreno R., C. Márquez H., E. Ochoa M. y P. Preciado R. 2009. Uso de abonos orgánicos en la producción de tomate en invernadero. *Terra Latinoamericana* 27 (4): 319 – 327.
- Romero F. J. C., Ma. N. Rodríguez M., Ma. C. Gutiérrez C. y J. Sánchez E. 2013. Vermicompost como sustrato en la producción de menta (*Menta piperita* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. Pub. Esp. Núm. 5*: 889–899.
- Sampaio B. L., R. A. Edrada-Ebel and F. B. Da Costa. 2016. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. *Nature: Scientific reports*: 1 – 14.
- Sánchez, G. P., C. Molinos Da Silva, G. Alcántar G. y M. Sandoval V. 2016. Diagnóstico nutrimental en plantas. In: *Nutrición Vegetal. Segunda Edición*. Alcántar-González G., L. Trejo-Téllez y F. C. Gómez-Merino (Eds). Editorial Colegio de Postgraduados. pp 202 – 245
- Scheuerell S. J., and W. F. Mahaffee. 2002. Literature review: compost tea principles and prospects for plant disease control. *Compost Science and Utilization* 10: 313–338.
- Serfaty M., M. Ibdah, R. Fischer, D. Chaimovitsh, Y. Saranga and Nativ Dudai. 2013. Dynamics of yield components and stevioside production in *Stevia rebaudiana* grown under different planting times, plant stands and harvest regime. *Industrial Crops and Products* 50: 731– 736.
- Serra A. P., M. E. Marchetti, D. J. Bungenstab, M. A. Gonçalves da Silva, R. P. Serra, F. C. Nunes G., V. D. Amaral C. and H. Soares de Moraes. 2013. Diagnosis and Recommendation Integrated System (DRIS) to Assess the Nutritional State of

- Plants. In: Biomass Now - Sustainable Growth and Use. M. Darko M. (Ed.). InTech, Canada. pp. 129 – 146.
- Shibuya T., K. Kano, R. Endo and Y. Kitaya. 2017. Effects of the interaction between vapor-pressure deficit and salinity on growth and photosynthesis of *Cucumis sativus* seedlings under different CO₂ concentrations. *Photosynthetica* 55 (4) 1–8.
- Shipley, B. 1995. Structured interspecific determinants of specific leaf area in 34 species of herbaceous angiosperms. *Functional Ecology* 9, 312–319.
- Shipley, B. 2002. Trade-offs between net assimilation rate and specific leaf area in determining relative growth rate: relationship with daily irradiance. *Functional Ecology* 16: 682–689.
- Shipley, B. 2006. Net assimilation rate, specific leaf area and leaf mass ratio: which is most closely correlated with relative growth rate? a meta-analysis. *Functional Ecology* 20: 565–574.
- Siswadi, A. Muslim and T. Bakhtiar. 2012. Variable selection using principal component and procrustes analyses and its application in educational data. *Journal of Asian Scientific Research* 2: 856–865.
- Servicio Meteorológico Nacional. 2010. Información climatológica por estado. Consultado 06-02-2017. En: <http://smn.cna.gob.mx/es/informacion-climatologica-ver-estado?estado=hgo>
- Soejima, A., T. Yahara and K. Watanabe. 2001. Thirteen new species and two new combinations of *Stevia* (Asteraceae: Eupatorieae) from Mexico. *Brittonia* 53: 377 – 395.

- Soil Survey Investigations. 1992. Soil Survey Laboratory Methods Manual. Report 42. Unites States Departament of Agriculture. Soil Conservation Service. National Soil Survey Center. Washington, D. C.
- Soufi S., G. D'Urso, C. Pizza, S. Rezgui, T. Bettaieb and Montoro P. 2016. Steviol glycosides targeted analysis in leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) from plants cultivated under chilling stress conditions. *Food Chemistry* 190: 572–580.
- Steiner A. A. 1984. The universal nutrient solution. In: Proceedings of the Sixth International Congress on Soilles Culture. Wageningen, The Netherlands 6: 633–650.
- Steinmaus S. J. and R. F. Norris. 2002. Growth analysis and canopy architecture of velvetleaf grown under light conditions representative of irrigated Mediterranean-type agroecosystems. *Weed Science* 50 (1): 42–53.
- Stirling, C. M., M. Heddell-Cowie, M. L. Jones, T. W. Ashenden, and T. H. Sparks. 1998. Effects of elevated CO₂ and temperature on growth and allometry of five native fast-growing annual species. *New Phytologist* 140:343–354.
- Sun S. G., B. R. Montgomery and Li B. 2013. Contrasting effects of plant invasion on pollination of two native species with similar morphologies. *Biological Invasions* 15 (10) 2165–2177.
- Tadhani, M. and R. Subhash. 2006. Preliminary Studies on *Stevia rebaudiana* Leaves: Proximal Composition, Mineral Analysis and Phytochemical Screening. *Journal of Medical Sciences* 6: 321–326.
- Terbe I., Zs. Szabó and N. Kappel. 2006. Macronutrient accumulation in green pepper (*Capsicum annuum* L.) as affected by different production technologies. *International Journal of Horticultural Science* 12 (1): 13–19.

- Torres M. G. A., Ibarra-Martínez C. M. y M. Díaz-Salas. 1998. Estudio fitoquímico de plantas medicinales propias del estado de Querétaro. Universidad Autónoma de Zacatecas; Universidad Autónoma de Querétaro.
- Turnbull, L. A., C. D. Philipson, D. W. Purves, R. L. Atkinson, J. Cunniff, A. Goodenough, Y. Hautier, J. Houghton, T. R. Marthews, C. P. Osborne, C. Paul-Victor, K. E. Rose, P. Saner, S. H. Taylor, F. I. Woodward, A. Hector and M. Rees. 2012. Plant growth rates and seed size: a re-evaluation. *Ecology* 93 (6): 1283–1289.
- Turner, B. L. 2013. Two new species of *Stevia* (Asteraceae: Eupatorieae) from Oaxaca, Mexico. *Phytologia* 95: 228 – 232.
- Turner, B. L. 2015. Three new species of *Stevia* (Asteraceae: Eupatorieae) from northern Mexico. *Phytologia* 97 (1): 25 – 31.
- Urrestarazu, M., C. Salas M., I. Padilla M., E. Moreno J. and A. Carrasco G. 2001. Evaluation of different composts from horticultural crop residues and their uses in greenhouse soil-less cropping. *Acta Horticulturae* 549: 147 – 152.
- Valladares, F. and Brittes D. 2004. Leaf phyllotaxis: does it really affect light capture? *Plant Ecology* 174: 11 – 17.
- Valdez-Calderón A., J. M. Torres-Valencia, J. J. Manríquez-Torres, R. Velázquez-Jiménez, M. A. Gómez-Hurtado, L. U. Román-Marín, J. D. Hernández-Hernández, C. M. Cerda-García-Rojas and P. Joseph-Nathan. 2011. A new bisabolene from *Stevia tomentosa*. *Natural Products Communications* 6 (9):1225-8.
- Vinocur B. and Altman A. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology* 16: 123 – 132.

- Villar R., T. Marañón, J. L. Quero, P. Panadero, F. Arenas, H. Lambers. 2005. Variation in relative growth rate of 20 *Aegilops* species (Poaceae) in the field: The importance of net assimilation rate or specific leaf area depends on the time scale. *Plant and Soil* 272 (1–2): 11–27.
- Wahid A., M. Farooq, I. Hussain, R. Rasheed, and S. Galani. 2012. Responses and management of heat stress in plants. In: P. Ahmad and Prasad M. N. V. (Eds.). *Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change*. New York. Springer. pp 135–157.
- Waterman P. G. and S. Mole. 1994. Analysis of phenolic plant metabolites. *Methods in Ecology*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK. 238 p.
- Watanabe, K., T. Yahara, A. soejima and M. Itos. 2001. Mexican species of the genus *Stevia* (Eupatorieae, Asteraceae): Chromosome numbers and geographical distribution. *Pl. Species Biol.* 16: 49-68.
- White P. J. and P. H. Brown. 2010. Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany* 105: 1073–1080.
- Wright, I. J., Reich, P. B., and Westoby, M. 2001. Strategy shifts in leaf physiology, structure and nutrient content between species of high and low rainfall and high and low-nutrient habitats. *Functional Ecology*, 15, 423–434.
- Xu D., W. Raza, G. Yu, Q. Zhao, Q. Shen, Q. Huang. 2012. Phytotoxicity analysis of extracts from compost and their ability to inhibit soil-borne pathogenic fungi and reduce root-knot nematodes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28: 1193–1201.

- Xu F., W. Guo, W. Xu, Y. Wei and R. Wang. 2009. Leaf morphology correlates with water and light availability: What consequences for simple and compound leaves?. *Progress in Natural Science* 19 (12): 1789 – 1798.
- Yano, S. y I. Terashima. 2004. Developmental process of sun and shade leaves in *Chenopodium album* L. *Plant Cell Environmental* 27: 781–793.
- Zavala C. F., R. García M., M. Soto H. and G. Kite. 2006. Phytochemical differences between *Calia secundiflora* (Ort.) growing at two sites in Mexico. *Zeitschrift für Naturforschung* 61:155–159.
- Zhao Y. H., X. Jia, W. K.Wang, T. Liu, S. P. Huang and M. Y. Yang. 2016. Growth under elevated air temperature alters secondary metabolites in *Robinia pseudoacacia* L. seedlings in Cd- and Pb-contaminated soils. *Science of the Total Environment* 565: 586 – 594.
- Zhigzhitzhapova S. V., L. D. Radnaeva, S. L.Chen, P. C.Fu and F. Q.Zhang. 2014. Chemical composition of the essential oil of *Artemisia hedinii* Ostenf. et Pauls. from the Qinghai-Tibetan Plateau. *Industrial Crops and Products* 62: 293–298.