



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

---

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS VERACRUZ**

POSTGRADO EN AGROECOSISTEMAS TROPICALES

**MORFOLOGÍA Y CONTENIDO DE GLUCÓSIDOS DE *Stevia rebaudiana* Bertoni Y SU RELACIÓN CON LAS CONDICIONES EDAFO-CLIMÁTICAS Y DE MANEJO DEL CULTIVO**

**Araceli Flores González**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

TEPETATES, MANLIO FABIO ALTAMIRANO, VERACRUZ. 2019

La presente tesis titulada: **Morfología y contenido de glucósidos de *Stevia rebaudiana* Bertoni y su relación con las condiciones edafo-climáticas y de manejo del cultivo** realizada por la alumna: **Araceli Flores González**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

AGROECOSISTEMAS TROPICALES

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: \_\_\_\_\_



DR. ELISEO GARCÍA PERÉZ

ASESOR: \_\_\_\_\_



DR. FREDY MORALES TREJO

ASESOR: \_\_\_\_\_



DR. JOSÉ LÓPEZ COLLADO

ASESOR: \_\_\_\_\_



DR. ROBERTO GREGORIO CHIQUITO CONTRERAS

Tepetates, Manlio Fabio Altamirano, Veracruz, México, 08 de junio de 2019

# MORFOLOGÍA Y CONTENIDO DE GLUCÓSIDOS DE *Stevia rebaudiana* Bertoni Y SU RELACIÓN CON LAS CONDICIONES EDAFO-CLIMÁTICAS Y DE MANEJO DEL CULTIVO

Araceli Flores González, M.C.

Colegio de Postgraduados 2019

La *Stevia rebaudiana* Bertoni es una planta con gran capacidad edulcorante, debido a su alto contenido de glucósidos, principalmente esteviósido y rebaudiósido A. Su consumo va en aumento por los beneficios que ofrece a la salud. En México existen condiciones edafo-climáticas para el desarrollo de estevia, pero son pocos los estudios de potencial productivo. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar las características morfológicas de las plantas de estevia y determinar el contenido de esteviósido y rebaudiósido A en hojas, en diferentes condiciones edafo-climáticas y de manejo del cultivo. El muestreo se realizó en Tuzamapan, Veracruz, Venustiano Carranza, Chiapas y Bacalar, Quintana Roo. Se evaluaron variables morfológicas, peso fresco, peso seco y contenido de humedad de las hojas. El contenido de glucósidos en las hojas se determinó a partir de una metodología para cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). El análisis de varianza mostró diferencias significativas entre localidades en la morfología de las plantas, peso fresco y peso seco de hojas, donde sobresalió Venustiano Carranza, Chiapas, estas diferencias impactan el rendimiento de hoja seca que varió de 5.5 a 8.4 t ha<sup>-1</sup>. Se encontraron diferencias significativas en el contenido de esteviósido entre localidades, estas se asociaron a mayor luminosidad y contenido de potasio en el suelo, el mayor contenido fue de 3.19 % y corresponde a Bacalar, Quintana Roo. Para rebaudiósido A los contenidos variaron de 11.5 a 12.21 % sin diferencia significativa entre localidades. Se concluye que la influencia de las condiciones edafo-climáticas junto con las prácticas de manejo del cultivo de estevia, dan como resultado variabilidad en la morfología de las plantas y el contenido de esteviósido.

**Palabras clave:** Esteviósido, rebaudiósido A, glucósidos, manejo de cultivo, variabilidad.

# MORPHOLOGY AND CONTENT OF GLUCOSIDES OF *Stevia rebaudiana* Bertoni AND ITS RELATIONSHIP WITH EDAPHOCLIMATIC CONDITIONS AND CROP MANAGEMENT

Araceli Flores González, M.C.

Colegio de Postgraduados 2019

The *Stevia rebaudiana* Bertoni is a plant with great sweetening capacity due to its high glycoside content, mainly stevioside and rebaudioside A. Its consumption is increasing because of the benefits it offers to health. In Mexico there are edaphoclimatic conditions for the development of stevia, but there are few studies of productive potential. The objective of this work was to evaluate the morphological characteristics of stevia plants and determine the content of stevioside and rebaudioside A in leaves, in different edaphoclimatic conditions and crop management. The sampling was done in Tuzamapan, Veracruz, Venustiano Carranza, Chiapas and Bacalar, Quintana Roo. Morphological variables, fresh weight, dry weight and moisture content of the leaves were evaluated. The content of glycosides in the leaves was determined from a methodology for high efficiency chromatography liquid (HPLC). The analysis of variance showed significant differences between localities in the morphology of the plants, fresh weight and dry weight, where Venustiano Carranza, Chiapas excelled. These differences impact the dry leaf performance that varied from 5.5 % to 8.4 t ha<sup>-1</sup>. Differences were found in the content of stevioside between localities, these were associated with greater luminosity and potassium content in the soil. The highest content was 3.19 % and corresponds to Bacalar, Quintana Roo. For rebaudioside A, the contents ranged from 11.5 to 12.21 % without significant difference between localities. It is concluded that the influence of the edaphoclimatic conditions together with the management practices of the stevia crop, result in variability in the morphology of the plants and the content of stevioside.

**Key words:** Stevioside, rebaudioside A, glucosides, crop management, variation.

## **DEDICATORIA**

A mi madre Julia González Abad, a quien le debo la fuerza para seguir siempre adelante.

A mi hermana Paola Flores González, por estar conmigo siempre y a mis sobrinos Carmelita y Erick, esperando que esto sea un buen ejemplo para que lleguen a cumplir las metas que se propongan en la vida.

A mis amigos que forman parte de una pequeña familia, Daniel, Daniela, Tavo, Rosalba, Irma, Abi y Karen, gracias por los ánimos.

Y a Briza, por darme paz y mucho amor.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca que me permitió realizar los estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados Campus Veracruz; profesores, investigadores, administrativos y compañeros estudiantes, que contribuyeron directa o indirectamente a mi formación académica.

Al Doctor Eliseo García Pérez, por ser mi consejo y guiarme durante mi estancia en el postgrado.

A los Doctores, José López Collado, Fredy Morales Trejo y Roberto Chiquito Contreras por formar parte de mi consejo particular.

Al Instituto de Diseño e Innovación Tecnológica (IDIT) de la Universidad Iberoamericana, Puebla, por permitirme el acceso a sus instalaciones para realizar análisis de vital importancia para mi trabajo de investigación.

Al Doctor Gregorio Romero de la Vega, por apoyarme en el manejo del equipo de Cromatografía líquida para la realización de los análisis de mi trabajo de investigación.

A Stevia Maya y al Ing. Jorge Martínez Peralta, por el apoyo para los muestreos de estevia en Quintana Roo. A la Ing. Zoila del Carmen y al Ing. Carlos Alcázar por el apoyo para los muestreos en Chiapas y al Señor Ney Domínguez por el apoyo para los muestreos en Tuzamapan.

A Martín por apoyarme en los muestreos de campo, por tu compañía, tu paciencia y cariño.

A Escarlet, Noemí, Miguel, Iván, Osmar, Ale, Emmanuel y Pepe, por su valiosa amistad, por compartir nuevos conocimientos y experiencias de vida.

## CONTENIDO

	Página
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>3</b>
2.1 Teoría general de sistemas.....	3
2.2 Agroecosistema .....	3
2.3 Modelo de agroecosistema con estevia.....	3
2.4 Cultivo innovado .....	4
2.5 Edulcorante.....	4
2.6 Glucósidos de esteviol .....	5
2.7 Origen y distribución .....	5
2.8 Clasificación taxonómica.....	6
2.9 Descripción botánica.....	6
2.10 Fisiología de la planta .....	7
2.11 Consumo y usos de estevia .....	7
2.12 Importancia económica del cultivo .....	7
2.13 Producción mundial .....	8
2.14 Producción y precios nacional y estatal .....	8
2.15 Requerimientos edafo-climáticos para el cultivo de estevia.....	9
2.15.1 Clima.....	9
2.15.2 Altitud.....	10
2.15.3 Temperatura .....	10
2.15.4 Precipitación pluvial .....	10
2.15.5 Humedad relativa.....	10
2.15.6 Luminosidad .....	10
2.15.7 Suelos.....	10
2.16 Variedades de estevia.....	11
2.16.1 Estevia criolla.....	11
2.16.2 Katupyry.....	12
2.16.3 Eirete (IAN/VC-142).....	12
2.16.4 Morita II.....	13
2.17 Tipos de propagación de la planta de estevia.....	14
2.17.1 Propagación sexual .....	14

2.17.2 Propagación asexual .....	14
2.17.3 Micropropagación (cultivo <i>in vitro</i> ) .....	14
2.18 Manejo del cultivo de estevia .....	14
2.18.1 Preparación de camas .....	14
2.18.2 Densidad de siembra .....	15
2.18.3 Época del trasplante .....	15
2.18.4 Riego .....	15
2.18.5 Fertilización.....	15
2.18.6 Abonado orgánico.....	16
2.18.7 Control de malezas .....	16
2.18.8 Poda de formación.....	16
2.18.9 Poda sanitaria.....	17
2.18.10 Poda de renovación.....	17
2.18.11 Control de plagas.....	17
2.18.12 Control de enfermedades .....	17
2.19 Corte de estevia y manejo postcosecha .....	18
2.20 Composición de la estevia .....	19
2.21 Metabolismo de la estevia.....	19
2.22 Ruta de síntesis de esteviósidos.....	19
2.23 Ingesta diaria admisible .....	20
2.24 Técnicas de extracción de glucósidos .....	20
2.24.1 Extracción con fluidos supercríticos.....	20
2.24.2 Extracción de compuestos por Soxhlet.....	21
2.25 Cromatografía de capa fina.....	21
2.26 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	21
2.27 Trabajos reportados de extracción de glucósidos.....	22
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>24</b>
3.1 Hipótesis General .....	24
3.2 Hipótesis Particulares .....	24
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
4.1 Objetivo General .....	24
4.2 Objetivos Específicos.....	24

<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
5.1 Localidades de estudio .....	25
5.2 Material vegetal y tamaño de muestra .....	25
5.3 Diseño experimental .....	26
5.4 Información climática, muestreo de suelos y muestreo de hojas .....	26
5.5 Variables evaluadas.....	26
5.6 Manejo del cultivo .....	27
5.7 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	27
5.7.1 Preparación de las muestras .....	27
5.7.2 Cromatografía líquida (HPLC) para medir contenido de glucósidos .....	27
5.7.3. Cuantificación de glucósidos .....	28
5.7.4 Análisis de datos.....	28
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>29</b>
6.1. Descripción climática de las localidades de muestreo .....	29
6.1.1 Tuzamapan, Veracruz .....	29
6.1.2 Venustiano Carranza, Chiapas.....	29
6.1.3 Bacalar, Quintana Roo .....	30
6.2 Propiedades físicas y químicas del suelo .....	32
6.3 Manejo del cultivo .....	33
6.4 Características morfológicas de las plantas de estevia .....	35
6.5 Correlaciones de variables morfológicas con altitud y variables climáticas .....	37
6.6 Correlaciones de variables morfológicas con variables edafológicas .....	38
6.7 Contenido de esteviósidos y rebaudiósidos A.....	40
6.8 Correlación entre contenido de glucósidos, altitud y variables climáticas.....	45
6.9 Correlación entre contenido de glucósidos y variables edafológicas .....	46
<b>7. CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS.....</b>	<b>48</b>
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>49</b>
<b>9. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>49</b>
<b>10. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>50</b>
<b>11. ANEXOS.....</b>	<b>61</b>

## LISTA DE CUADROS

## Página

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni .....	6
Cuadro 2. Producción nacional de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni. ....	9
Cuadro 3. Altitudes y condiciones climáticas de las localidades de estudio.....	31
Cuadro 4. Propiedades físicas y químicas de suelo en el cultivo de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni. ....	32
Cuadro 5. Clasificación de textura del suelo de las localidades de estudio. ....	33
Cuadro 6. Principales prácticas de manejo del cultivo de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni en las localidades de estudio. ....	33
Cuadro 7. Medias de las variables morfológicas de las plantas de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni en los diferentes localidades de estudio. ....	35
Cuadro 8. Análisis del peso fresco, peso seco y contenido de humedad de las hojas de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni en diferentes localidades de estudio .....	36
Cuadro 9. Coeficiente de correlación (n 30) y niveles de significancia, entre variables morfológicas, altitud y variables climáticas.....	37
Cuadro 10. Coeficiente de correlación (n 30) y niveles de significancia de las variables morfológicas y variables edafológicas.....	38
Cuadro 11. Contenido de esteviósido y rebaudiósido A en hojas de estevia en diferentes localidades de estudio.....	43
Cuadro 12. Coeficiente de correlación (n 30) y niveles de significancia, entre el contenido de esteviósido y rebaudiósido A, altitud y variables climáticas.....	46
Cuadro 13. Coeficiente de correlación (n 30) y niveles de significancia, entre el contenido de esteviósido y rebaudiósido A y condiciones edafológicas. ....	46

## LISTA DE FIGURAS

## Página

Figura 1. Esquema del modelo de agroecosistema con <i>Stevia rebaudiana</i> en México. .	4
Figura 2. Precio medio rural de hoja seca MX\$ t <sup>-1</sup> de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni. ....	9
Figura 3. Población de plantas de estevia criolla. ....	11
Figura 4. Planta de estevia variedad Katupyry.....	12
Figura 5. Planta de estevia variedad Eirete IAN / VC – 142.....	13
Figura 6. Planta de estevia variedad Morita II. ....	13
Figura 7. Ubicación geoespacial de las localidades de estudio de plantas de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni. ....	25
Figura 8. Preparación de extractos de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni .....	27
Figura 9. Climatograma de las condiciones de Tuzamapan, Veracruz . ....	29
Figura 10. Climatograma de las condiciones de Venustiano Carranza, Chiapas .....	30
Figura 11. Climatograma de las condiciones de Bacalar, Quintana Roo. ....	30
Figura 12. Plantas de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni en diferentes localidades de estudio. a) Tuzamapan, Veracruz. b) Venustiano Carranza, Chiapas. c) Bacalar, Quintana Roo. ....	34
Figura 13. Cromatogramas de los estándares de esteviósido y rebaudiosido A. ....	40
Figura 14. Regresión lineal de curvas estándares en condiciones de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para esteviosido y rebaudiósido A. ....	41
Figura 15. Cromatogramas de los contenidos de esteviósido y rebaudiósido A, de las hojas de estevia en las tres localidades de estudio bajo condiciones de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). ....	42

## 1. INTRODUCCIÓN

La *Stevia rebaudiana* Bertoni (estevia) es una planta originaria de Paraguay, con reciente suscitándose un reciente auge en México en cuanto a su producción. En sus hojas posee glucósidos de esteviol cuyo contenido puede variar entre un 4 y 20 %, dependiendo del genotipo y de las condiciones ambientales y de cultivo (Geuns, 2003; Brandle y Telmer, 2007; Gardana *et al.*, 2010). Los glucósidos de mayor importancia en la estevia son los esteviósidos y los rebaudiósidos A (Brandle y Telmer, 2007), captando, actualmente la atención del sector salud y de la industria alimentaria por ser un edulcorante natural (Vélez e Hincapié, 2005; Huang *et al.*, 2009). El edulcorante obtenido de las hojas posee un poder endulzante no calórico 300 veces más dulce que la sacarosa (Madan *et al.*, 2010).

Ya que la estevia es un aditivo alimentario bajo en calorías su consumo en pacientes diabéticos se considera adecuado (Yong-Heng *et al.*, 2014). Así mismo, esta planta puede ser una alternativa natural que puede sustituir a los edulcorantes sintéticos comerciales ya conocidos, como el aspartame, la sacarina, la sucralosa y ciclamatos, entre otros. La industria de los edulcorantes naturales tiene gran relevancia mundial, ya sea como aditivos en alimentos o como suplementos dietéticos para ayudar en el control de la diabetes y la obesidad. El edulcorante de estevia constituye una alternativa prometedora entre los edulcorantes naturales ya que los endulzantes sintéticos están seriamente cuestionados por los efectos de su consumo a corto y largo plazo (Marín, 2004).

En la actualidad, la estevia es cultivada comercialmente en Japón, China, Taiwán, Tailandia, Indonesia y Filipinas, siendo Japón el líder mundial de su industrialización, pues representa el 41% de los endulzantes consumidos (Midmore y Rank, 2002). En México se introdujo en el año 2010 a través del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y fue promovido por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) con el fin de conocer si este cultivo se podía adaptar a las condiciones climáticas del país (Jarma-Orozco, 2010; Das *et al.*, 2011; Ramírez-Jaramillo, 2011; Pande y Gupta, 2013; CEDRSSA, 2018). Actualmente, el cultivo de estevia resulta innovador y rentable para

los productores en México ya que existen condiciones promisorias tanto en el mercado nacional como en el internacional.

Las zonas con mayor potencial productivo para el cultivo de estevia en México se distribuyen principalmente en los estados del Pacífico tales como: Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas. No obstante, existen algunas áreas importantes en la región del golfo de México, especialmente en los estados de Tamaulipas, Veracruz y en menor medida en Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo (Ramírez-Jaramillo y Lozano-Contreras, 2016). Los estados en donde se cultiva la estevia presentan variaciones de los valores de la radiación solar, temperatura y factores edáficos, que afectan el inicio de la floración. Estas variaciones, a su vez, inciden sobre los contenidos de glucósidos, ya que en este punto se da la máxima acumulación de estas moléculas en las hojas, además de causar cambios en las expresiones fenotípicas y fisiológicas de la planta (Ramesh *et al.*, 2006; Jarma-Orozco, 2008; Ceunen y Geuns, 2013). Las cantidades de esteviósido y rebaudiósido A, dependen en gran medida del genotipo y las condiciones ambientales (Gardana *et al.*, 2010).

Ya que la estevia se desarrolla en diferentes condiciones edafo-climáticas, los factores antes mencionados hacen que la concentración del principio activo en las hojas varíe, sobre todo del rebaudiósido A, que es el producto más buscado comercialmente y con mayor aplicación en la industria alimenticia como endulzante.

Actualmente, existen pocos estudios de la zonificación de las áreas potenciales para el cultivo de estevia en México. Por ello, el cultivo es establecido en regiones para su desarrollo presentándose variaciones en la fenología y fisiología de la planta, particularmente, del contenido de esteviósido y rebaudiósido A. Considerando lo anteriormente expuesto, el presente trabajo de investigación tuvo la finalidad de determinar los contenidos de esteviósido y rebaudiósido A, para establecer la relación que existe con las condiciones edafo-climáticas en donde se cultiva la estevia y responder a la siguiente pregunta de investigación:

¿Cómo influyen las condiciones edafo-climáticas prevalecientes en las zonas de cultivo de estevia sobre la morfología de la planta y en el contenido de esteviósido y rebaudiósido A?

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Teoría general de sistemas**

La teoría general de sistemas es una forma sistemática y científica de investigar un fenómeno de la realidad de manera transdisciplinaria (Arnold y Osorio, 1998). Ferrater (1979) menciona que el sistema es un conjunto de elementos relacionados entre sí, es decir, que cada elemento está en función de otro. Para Johansen (1993), un sistema es un grupo de partes y objetos que interactúan y que forman un todo o que se encuentran bajo la influencia de fuerzas con alguna relación definida.

### **2.2 Agroecosistema**

El estudio de los agroecosistemas requiere un enfoque sistémico. Deben visualizarse dimensiones ecológicas, socioeconómicas, culturales y políticas (Sarandón, 2002).

Ruiz (2006) indica que un agroecosistema es la unidad física donde se desarrolla indistintamente la actividad agrícola, pecuaria, forestal, acuícola o su combinación, e inciden los factores económicos, sociales, ecológicos y climatológicos para la producción de alimentos y otros satisfactores que la sociedad demanda a través del tiempo; se acepta que cada agroecosistema tiene cierto nivel de sostenibilidad con alta, intermedia o baja dependencia de insumos externos. Además de un modelo conceptual, se debe considerar al agroecosistema como una estructura física para su análisis, diseño, manejo y evaluación, y el cual esta a su vez histórica y socialmente determinado. El enfoque de sistemas aborda el problema de la complejidad a través de una forma de pensamiento basada en la totalidad y sus propiedades.

### **2.3 Modelo de agroecosistema con estevia**

Desde este enfoque sistémico, los flujos de conocimiento se dan de una manera más interactiva y holística entre los actores, a diferencia del tradicional modelo lineal. Comprende el conjunto de organizaciones, empresas e individuos (públicos y privados) que demandan y ofrecen conocimientos (codificados - tácitos) y competencias técnicas, comerciales y financieras, así como las normas y los mecanismos por los cuales estos diferentes actores interactúan y se interrelacionan dentro de contextos sociales, políticos, económicos, institucionales, entre otros (Figura 1) (Banco Mundial, 2007).

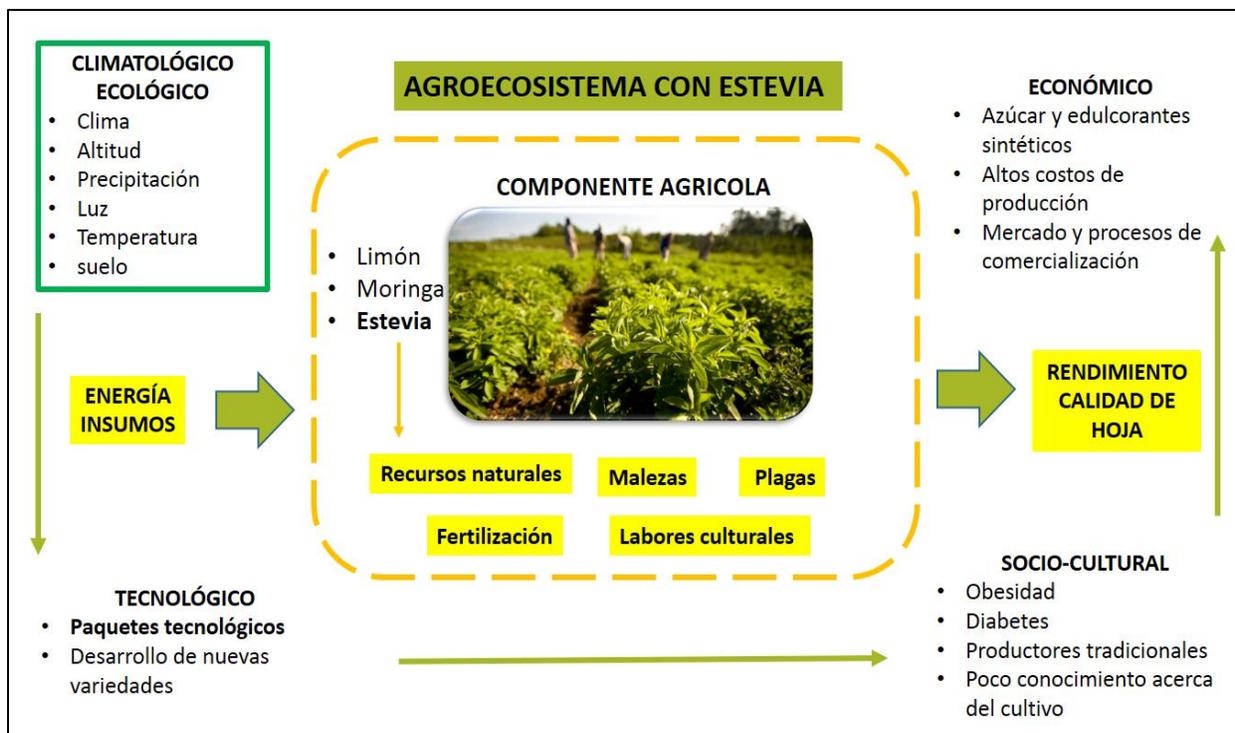


Figura 1. Esquema del modelo de agroecosistema con *Stevia rebaudiana* en México.

## 2.4 Cultivo innovado

El cultivo que se implementa debe ser nuevo para ese contexto y no necesariamente para el mundo. Se dice que un cultivo es innovador cuando presenta condiciones promisorias en los mercados nacionales e internacionales (Ramírez-Jaramillo, 2011). Además, desempeña un rol crítico para lograr una agricultura competitiva y sustentable.

En general, tiene que ser un cultivo novedoso para un contexto determinado, que es apropiado socialmente y que genera beneficios para las partes implicadas. Actúa como un impulsor del crecimiento económico y la competitividad en los países (IICA, 2014).

## 2.5 Edulcorante

El término edulcorante equivale a endulzante, “lo que endulza”. Se le da el nombre de edulcorantes a las sustancias que son capaces de despertar la sensación que la mente califica como “dulce”, permitiendo su uso a los consumidores que disfrutan de este sabor con poca o ninguna ingesta de energía o respuesta glucémica (Socolovsky, 2007).

## 2.6 Glucósidos de esteviol

La importancia comercial de la planta se debe primordialmente al descubrimiento de los glucósidos de esteviol presentes de manera mayoritaria en las hojas de la planta, ya que estos son los responsables del efecto edulcorante. En un estudio realizado por Bondarev *et al.* (2003) se analizó el contenido de glucósidos de esteviol en varios órganos de la planta y se determinó que el mayor contenido de los mismos está en las hojas, mientras que los tallos presentan un contenido entre 12 y 13 veces menor. Algunos de los glucósidos más conocidos son: esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido F, dulcosido A, rubusósido y esteviolbiósido (Pieri *et al.*, 2011).

El esteviósido y rebaudiósido A son los glucósidos más abundantes en la planta, y son los de mayor valor comercial; los otros se encuentran en porcentajes bastante pequeños (Woelwer-Rieck *et al.*, 2010). El esteviósido es el glucósido de mayor abundancia, su contenido varía entre 4 y 20 % del peso total de las hojas secas (Kovylyayeva *et al.*, 2007). El rebaudiósido A es el segundo más abundante y es el que presenta mayor dulzor, su contenido es de aproximadamente un 3 % del peso total de las hojas secas (Kenelly, 2001; Pieri *et al.*, 2011).

## 2.7 Origen y distribución

*Stevia rebaudiana* Bertoni es una planta originaria del Sudeste de Paraguay, esta planta fue usada ancestralmente por los aborígenes, como edulcorante y medicina. Sin embargo, el género *Stevia* consta de más de 240 especies de plantas nativas de Sudamérica, Centroamérica y México, con muchas especies encontradas en lugares tan lejanos como Arizona, Nuevo México y Texas. Por siglos las tribus guaraníes de Paraguay y Brasil usaron especies diferentes de *Stevia* y, principalmente, *Stevia rebaudiana*; ellos la llamaron ka'a he'ê o yerba dulce (Guerrero, 2005).

La distribución del género estevia va desde Paraguay hasta el sur de México, aunque en este último no se han registrado plantaciones en gran escala. En Sudamérica es donde se encuentran las principales plantaciones, principalmente en Paraguay. Existen plantaciones en menor escala, en países como Ecuador, Colombia y Uruguay (Plan Nacional de Stevia en Paraguay, 2000).

## 2.8 Clasificación taxonómica

En el Cuadro 1 se describe la clasificación taxonómica de *Stevia rebaudiana* Bertoni, según Martínez, (2002).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Stevia rebaudiana* Bertoni

Reino	Vegetal
Subreino	Tracheobinta
División	Magnoliopyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Genero	<i>Stevia</i>
Especie	<i>S.rebaudiana</i> Bertoni

## 2.9 Descripción botánica

Las hojas de estevia son elípticas, ovales o lanceoladas, pequeñas, simples y con borde dentado; a veces en verticilos, algo pubescentes. El tamaño medio de una hoja es de 5 cm de longitud y 2 cm de ancho. El tallo es anual, sub-leñoso, pubescente; durante su desarrollo inicial no posee ramificaciones, tornándose multicaule después del primer ciclo vegetativo. En condiciones óptimas, el tallo puede llegar hasta un metro y medio de altura. También esta parte de la planta se caracteriza por su contenido de esteviósido, que es menor al 3 % del peso seco. La raíz es fibrosa, filiforme, perenne y no profundiza, distribuyéndose cerca de la superficie del suelo. Es el único órgano de la planta que no contiene glucósidos. La duración del cultivo depende del manejo y de las buenas prácticas. La planta es semiperenne y rebrota después de cada cosecha o poda. La flor es hermafrodita pequeña y blanquecina, en capítulos pequeños terminales o axilares, agrupadas en panículas corimbosas. La flor es autoincompatible (protandria) por lo que la polinización es entomófila, se dice que es de tipo esporofítico y clasificada como apomíctica obligatoria. El fruto es un aquenio que puede ser claro (estéril) u oscuro (fértil) y es diseminado principalmente por el viento (Goyal *et al.*, 2010; Britos y Park, 2016).

## **2.10 Fisiología de la planta**

La estevia es una planta herbácea que se reproduce en forma sexual, la semilla se obtiene por medio de polinización cruzada (alogamia) y tiene bajo porcentaje de germinación que oscila entre el 10% y el 38%, caracterizada por dar origen a descendientes con gran variabilidad fenotípica, y por tanto variación en el contenido de los principios activos dulces en las hojas. La madurez fisiológica de la planta se da aproximadamente en tres meses, dependiendo de la zona, temperatura y variedades, a partir de ahí se inicia la madurez organoléptica; hojas con mayor dulzor, debido a la aparición de esteviósido en alta concentración, el color verde se ve acentuado y aparece el aroma y olor. El inicio de la floración ocasiona disminución en las concentraciones de esteviósidos en la planta (Jarma *et al.*, 2006; Britos y Park, 2016).

## **2.11 Consumo y usos de estevia**

Las hojas de esta planta pueden prepararse como una infusión y beberla, o puede ser procesada y obtener su extracto con el fin de endulzar otras bebidas o alimentos (Yantis, 2011). Los diferentes usos y aplicaciones de la estevia, dependen del nivel de dulzor que se quiere incluir en un producto (González-Moralejo, 2011).

La estevia es apta para diabéticos, es hipotensora (recomendada para personas con tensión alta, pues la reduce), sirve para el cuidado facial, para problemas de acidez de estómago, es adecuada para bajar el nivel de acidez de la sangre y de la orina, ayuda a bajar de peso porque no tiene calorías. Es soluble en agua fría o caliente, sin nutrientes, sin calorías, se puede hornear (es estable a los 200 °C), no se fermenta, no crea placa dental y no tiene efectos tóxicos (Brandle *et al.*, 2005).

## **2.12 Importancia económica del cultivo**

El rápido desarrollo de la industria de los edulcorantes y la búsqueda de alternativas menos riesgosas que los edulcorantes artificiales, ha permitido que el cultivo de *S. rebaudiana* prospere en países como Brasil, China, Japón, Corea, Tailandia e Israel. China actualmente cultiva el 90 % de la producción global de esta planta. El consumo internacional se concentra en la Unión Europea, EE.UU., China, Australia y especialmente Japón, en este último se tiene el mayor número de fábricas para la extracción de los esteviósidos, aunque no es suficiente para satisfacer su mercado

interno (se estima que el consumo anual de esteviósidos en Japón es de 50 toneladas al año con un valor de \$240 millones de dólares americanos). Brasil cuenta con la mayor planta de tratamiento de hoja seca para la extracción de esteviósidos. Actualmente, se producen y consumen 3000 toneladas de cristal de esteviósidos en el mundo Rusia y varios países latinoamericanos han incorporado este nuevo edulcorante a su dieta (Eafit, 2004).

### **2.13 Producción mundial**

El 70 % de la producción mundial de estevia es destinada para procesar cristales de esteviósido, el otro 30 % se destina para hoja seca. La producción mundial de esta planta varía de 100,000 a 200,000 toneladas, el principal productor es China, con aproximadamente el 90 %, Paraguay el 8 %. Otros países productores son Brasil, Argentina, Bolivia, Colombia, Perú, Tailandia, Corea, Rusia, Indonesia, India, Australia, España, Canadá, Costa Rica, Kenia y Estados Unidos; Actualmente se ha difundido en otros países, entre los que se incluyen México y Vietnam. Los principales países compradores son: Japón, China, Malasia, Israel, Corea del Sur y Brasil (Adorno, 2016).

### **2.14 Producción y precios nacional y estatal**

El registro que se tiene hasta el año 2017 indica que Nayarit fue el estado con mayor número de hectáreas sembradas y cosechadas, al igual que la mayor producción y rendimiento (Cuadro 2) (SIACON, 2017). El estado de Veracruz no se encuentra entre los registros de siembra para ese año, sin embargo, en el año 2015 se tuvo el registro de una hectárea sembrada y cosechada (SIAP, 2015).

Existe variación en el precio medio rural por tonelada, en los estados en donde se registró producción durante el año 2017 (Cuadro 2). Los precios de los productos derivados de la estevia varían por la demanda de estos, por lo que no hay registros específicos.

En cuanto al precio medio rural de la tonelada de hoja seca de estevia, éste registró un ligero aumento pasando de \$13,117.5 MX en el 2016 a \$17,306.5 MX en 2017. El precio no se ha podido recuperar desde 2012 cuando registró un precio medio rural de \$ 25,541.7, sin embargo, aumentó a comparación del año anterior (CEDRSSA, 2018). (Figura 2).

Cuadro 2. Producción nacional de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Estado	Superficie (ha)		Producción (t)	Rendimiento obtenido (t ha <sup>-1</sup> )	Precio medio rural (MX\$ t <sup>-1</sup> )	Valor de la producción (Miles de pesos)
	Sembrada	Cosechada				
Nayarit	27	27	324	12	12,981.48	4,206.00
Quintana Roo	10	5	103.5	20.7	26,810.63	2,774.90
Michoacán	8	8	30.4	3.8	28,222.22	857.96
Campeche	5	0	0	0	0	0
Oaxaca	4	4	19.2	4.8	28,000.00	537.6
Chiapas	1.85	1.85	23.13	12.5	12,140.03	280.8
Total	55.85	45.85	500.23	53.8	108,154.36	8,657.26

Fuente: Elaborado por el Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta (SIACON, 2017).

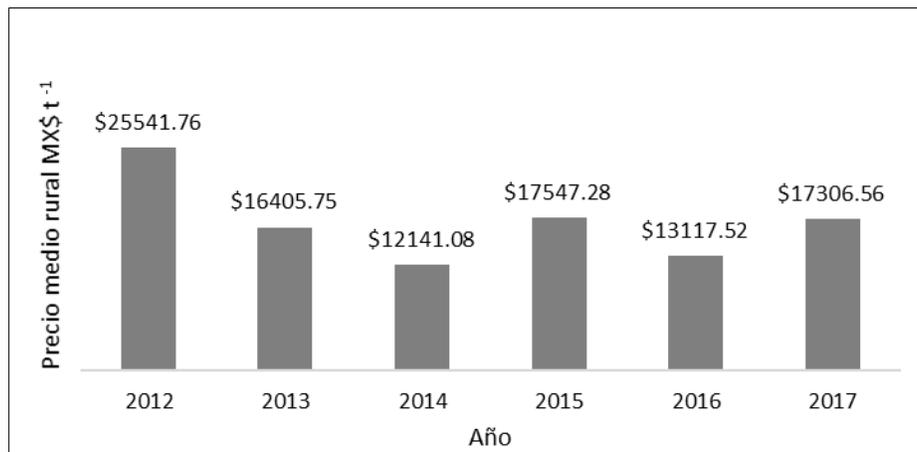


Figura 2. Precio medio rural de hoja seca MX\$ t<sup>-1</sup> de *Stevia rebaudiana* Bertoni (SIACON 2017).

## 2.15 Requerimientos edafo-climáticos para el cultivo de estevia

### 2.15.1 Clima

Los climas en los que el desarrollo del cultivo de estevia es óptimo son los tropicales y subtropicales, y como sub-óptimo en los templados (Ramírez-Jaramillo y Lozano-Contreras, 2016).

### **2.15.2 Altitud**

El rango óptimo en el cual se adapta y desarrolla la estevia está entre los 0 a los 600 msnm y como sub-óptimo de 500 a 1200 msnm (Ramírez-Jaramillo y Lozano Contreras, 2016). Crece en altitudes que van de 200 a 500 msnm (Yaday *et al.*, 2011). Sin embargo, FUNCFOS (2000) señala que en los 800 msnm es donde se han registrado las mejores producciones de follaje (Plan Nacional de Stevia en Paraguay, 2000; Ramia, 2002).

### **2.15.3 Temperatura**

La temperatura ideal para el desarrollo de estevia es de 24 °C, y las temperaturas extremas están entre los -6 a 43 °C (Plan Nacional de Stevia en Paraguay, 2000). No obstante, se reporta que prospera muy bien entre los 24 y 28°C (Ramia, 2002; Landázuri y Tigrero, 2009; Ramírez, 2011). Sin embargo, Villa y Chifa (2006) indican que la temperatura óptima para el crecimiento de estevia es de 15 °C a 30 °C.

### **2.15.4 Precipitación pluvial**

Crece con precipitaciones pluviales que oscilan entre 1400 a 1800 mm (Ramia, 2002; Ijaz *et al.*, 2015). El cultivo no tolera periodos largos de sequía, por lo que es necesario la utilización de sistemas de irrigación (Casaccia y Álvarez, 2006).

### **2.15.5 Humedad relativa**

El porcentaje de humedad relativa debe ser menor de 85 % para evitar la incidencia de enfermedades (Ramírez *et al.*, 2011; Ramírez, 2011).

### **2.15.6 Luminosidad**

Esta planta requiere días largos y alta intensidad solar (heliofanía). Jarra *et al.* (2006) indican que los niveles de radiación solar favorables para la producción de materia seca de hojas en la variedad Morita II son de 13 horas. Los fotoperíodos largos aumentan la longitud de los entrenudos, el área foliar, el peso seco y acelera la producción de hojas (Ramia, 2002; Villa y Chifa, 2006; Landázuri y Tigrero, 2009).

### **2.15.7 Suelos**

Los suelos óptimos son aquellos con pH de 5.5 a 7, sub-óptimos de 7.1 a 7.5 y no aptos menor de 4 y mayor de 7.5. Con mediano contenido de materia orgánica, de textura franco-arenosa, y con buena permeabilidad y drenaje (Vergara *et al.*, 2003; Ramírez-

Jaramillo y Lozano-Contreras, 2016). Para México se están considerando como óptimos los suelos Luvisoles, Nitisoles, Fluvisoles y los Regosoles; sub-óptimos los Leptosoles (anteriormente Rendzinas) y Cambisoles con buen drenaje; no aptos los Gleysoles, los Vertisoles, Solonchaks y Litosoles (Ramírez, 2011).

## **2.16 Variedades de estevia**

En estevia existen materiales criollos principalmente provenientes de Paraguay; cuando las siembras se realizan con estos materiales se tienen plantas que presentan diferencias morfológicas y fenológicas, por lo tanto, existe variabilidad en sus componentes de rendimiento como son tamaño de planta, longitud y ancho de hoja, así como época de floración y cosecha. Pero actualmente se pueden obtener variedades mejoradas en el mercado (Ramírez, 2011).

### **2.16.1 Estevia criolla**

Es la más utilizada en el mundo. Es producto de la polinización cruzada que ha permitido a los productores realizar una selección empírica, llegando a presentar ciertas características propias (Figura 3). Esta variedad presenta un porte bajo, llegando a alcanzar un promedio de altura de 60 cm; es de ciclo precoz, en 2.0 a 2.5 meses ya es posible cosechar con contenidos de hasta 7 % de esteviósido (glucósido que da el sabor amargo), y hasta 3 % de rebaudiósido A (glucósido que favorece el sabor dulce de la estevia). Tiene rendimientos de 1,000 a 1,200 kg ha<sup>-1</sup> por año bajo condiciones de temporal, y de 3,000 a 4,000 kg ha<sup>-1</sup> por año bajo condiciones de riego (Daza *et al.*, 2015; Ramírez, 2011).



Figura 3. Población de plantas de estevia criolla.

### 2.16.2 Katupyry

Denominada Katupyry (Figura 4) por su alta rusticidad, especialmente en lo que se refiere a tolerancia a periodos de estrés hídrico y buen comportamiento en suelos de mediana y baja fertilidad. La altura media de la planta durante el periodo estival es de 90 a 110 cm, posee un tallo principal con dominancia de brotes axilares y buen desarrollo de ramas laterales. Es moderadamente resistente a enfermedades producidas por hongos como *Sclerotium* y *Septoria*. El rendimiento del material es 97 % superior al material criollo, con un promedio de 3,500 a 4,000 kg ha<sup>-1</sup> de hojas secas, en tres cortes por año. En promedio, la variedad Katupyry posee 7 % de esteviósido y 8 % de rebaudiósido A, totalizando 15 % de steviolglicosidos totales. El 53 % del glucósido total corresponde al rebaudiósido A (Britos y Park, 2016).



Figura 4. Planta de estevia variedad Katupyry.

### 2.16.3 Eirete (IAN/VC-142)

Es considerada un cultivo homogéneo, florece uniforme, lo cual facilita la realización del corte en el momento más oportuno; esto ocurre cuando aparecen los primeros botones florales; es de porte alto, puede alcanzar 1.00 a 1.20 m de altura (Figura 5). Posee hojas grandes, abundantes y tiene un tallo poco ramificado, permite alta densidad en el cultivo. Debido a que es una variedad clonal esta debe ser multiplicada por métodos vegetativos. El rendimiento a nivel comercial es de 3,500 kg ha<sup>-1</sup>; en forma experimental, en el IAN Caacupé, se obtuvieron rendimientos que varían de 4990 a 5560 kg ha<sup>-1</sup> con una densidad de 100,000 plantas ha<sup>-1</sup>. En cuanto a la calidad industrial, en cultivos comerciales llegan al 22 % de steviolglicosidos totales (Britos y Park, 2016).



Figura 5. Planta de estevia variedad Eirete IAN / VC – 142.

#### 2.16.4 Morita II

Fue generada por Toyosigue Morita, agrónomo y fitomejorador japonés. Esta variedad presenta mayor rendimiento y mejor calidad del producto final que los materiales criollos. Es de porte más alto que el material criollo, con altura de planta de hasta 90 cm; con ciclo más largo, de 3 a 3.5 meses; con tolerancia a Septoria, enfermedad fungosa de la hoja; y con contenidos de hasta 3 % de esteviósido y hasta 12 % de rebaudiósido A (Figura 6). Presenta rendimientos de 1,000 a 1,500 kg ha<sup>-1</sup> por año bajo condiciones de temporal y de 4,000 a 8,000 kg ha<sup>-1</sup> año bajo condiciones de riego (Espitia *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2016). Por su mayor contenido de rebaudiósido A y menor sabor amargo, es más demandada la variedad Morita II por la agroindustria y los consumidores.



Figura 6. Planta de estevia variedad Morita II.

## **2.17 Tipos de propagación de la planta de estevia**

### **2.17.1 Propagación sexual**

La propagación sexual en *S. rebaudiana* implica intercambio de caracteres importantes, como los niveles edulcorantes y de composición. El porcentaje de germinación de sus semillas es de 10 a 38 % (Puri *et al.*, 2011). Por lo que este método no es recomendado para utilización a nivel comercial.

### **2.17.2 Propagación asexual**

Con este método se conservan todas las características fenotípicas y genotípicas de la planta progenitora y se asegura una homogeneidad en las plantas y mejora el rendimiento de esteviósidos, lo cual es importante en la reproducción a nivel comercial (Tamura *et al.*, 1984). En *S. rebaudiana* un esqueje debe presentar cuatro hojas maduras y dos primordios foliares, con un grosor en la base del tallo de aproximadamente 0.3 mm (Evangelista y Rodríguez, 2014). La propagación de *S. rebaudiana* por esquejes es el método más conveniente para ser usado a escala comercial, para esto es importante tener una plantación madre que va a proveer del material vegetativo además de contar con las condiciones para el enraizamiento de los esquejes (Oliva *et al.*, 2009).

### **2.17.3 Micropropagación (cultivo *in vitro*)**

La micro propagación en estevia permite el incremento acelerado del número de plantas derivadas de un genotipo seleccionado, la reducción del tiempo de multiplicación, la disponibilidad de obtener grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempos económicamente costeados, mayor control sobre sanidad del material que se propaga, facilidad para transportar el material *in vitro* de un país a otro, con menos restricciones (Orozco, 2004; Levitus, 2010).

## **2.18 Manejo del cultivo de estevia**

### **2.18.1 Preparación de camas**

La preparación de las camas puede hacerse de forma manual o mecánica, en esta última se utilizan surcadoras o bordeadoras. La era debe tener un metro de ancho y de una altura entre 30 y 40 cm y el largo no mayor a 50 metros para facilitar las labores del cultivo. En su construcción se debe incorporar abono orgánico y cal cuando las condiciones químicas y de fertilidad del suelo así lo exijan (Ramírez, 2011).

### **2.18.2 Densidad de siembra**

Existe una diversidad de recomendaciones con respecto a la densidad adecuada, las cuales fluctúan entre 50,000 y 120,000 plantas ha<sup>-1</sup>. Midmore y Rank (2002) mencionan que generalmente se recomiendan densidades de 80,000 a 100,000 plantas ha<sup>-1</sup> con espaciamientos entre líneas de 45 a 65 cm y 16 cm entre plantas. Para altos rendimientos se sugiere 160,000 plantas ha<sup>-1</sup> (Ramírez, 2011).

### **2.18.3 Época del trasplante**

Es importante definir la época adecuada para realizar el trasplante, diversos autores consideran las temperaturas adecuadas para el trasplante entre 15 y 30 °C, por lo cual será necesario determinar en cada zona, la época en que se presenta este intervalo de temperaturas para elegir el momento más adecuado, por lo general es en estación de primavera (Ramia, 2002; Villa y Chifa, 2006; Landázuri y Tigrero, 2009).

### **2.18.4 Riego**

Requiere de riego superficial frecuente, ya que la planta tiene poca tolerancia al estrés hídrico. Generalmente se asume que el riego complementario es esencial para evitar cualquier estrés hídrico, a menos que la zona tenga un régimen constante de precipitación pluvial a lo largo del año. Se ha sugerido el riego por aspersión, aunque esto podría favorecer enfermedades en las hojas. Cualquier estrés de humedad puede reducir la producción de hoja. Es más recomendable utilizar riego por goteo, el cual puede aprovecharse para la aplicación de algunos fertilizantes (Midmore y Rank, 2002).

### **2.18.5 Fertilización**

Casaccia y Álvarez (2006) indican que todo programa de fertilización deberá partir en principio, del análisis de suelo correspondiente, realizado con la debida antelación. Estudios realizados en este sentido indican que, por cada tonelada de hoja seca, la planta extrae 65 kg de N, 8 de P, 56 de K, 16 de Ca y 4 de Mg; por tanto, para una producción de 2.5 t<sup>-1</sup> de hoja seca se requieren 162 kg N, 19 de P, 140 de K, 40 de Ca y 9 de Mg. Una recomendación posible para llegar a estos requerimientos es la aplicación de la siguiente mezcla por hectárea después de cada corte: 100 kg de la formulación 15-15-15 + 50 kg de cloruro de potasio + 50 kg de urea.

### **2.18.6 Abonado orgánico**

Principalmente en invierno, lupino blanco amargo (*Lupinus albus* L.), 70 kg ha<sup>-1</sup>, en las melgas del cultivo de estevia 20 días después del último corte de marzo-abril, el manejo del mismo se realiza 15 a 20 días antes de la fecha prevista para la poda de uniformización con machete (5 jornales ha<sup>-1</sup>). La utilización del abono verde, puede reducir el número de operaciones de deshierbe de tres a una operación en el periodo invernal, con respecto a un cultivo de estevia producido en forma convencional sin abono verde. El aporte de materia orgánica (rastros) al sistema de producción de estevia está en torno de 3,200 a 3,700 kg ha<sup>-1</sup> (Duarte, 2008).

### **2.18.7 Control de malezas**

Estevia es una planta con poca capacidad de competencia con la maleza por lo cual el cultivo debe permanecer libre de malezas en los primeros 30 días de su crecimiento. El control eficiente de la maleza, es una de las operaciones que determinan el éxito en la producción del cultivo. Se recomiendan diversas estrategias para su control, como la remoción manual, el control mecánico, químico y el uso de coberturas muertas (Casaccia y Álvarez, 2006).

### **2.18.8 Poda de formación**

La poda de formación se realiza a los ocho días después de la plantación en campo. Esta poda consiste en cortar el ápice o yema terminal de la plántula, dejando como mínimo tres o cuatro pares de hoja con el propósito de estimular la brotación de las ramas laterales. Veinte días después de la primera poda, se realiza la segunda poda, que consiste en la poda de las ramas secundarias, de la misma forma en que se realizó la primera. De aquí en adelante se realizan las podas de las ramas terciarias y cuaternarias que sean necesarias y eliminar los botones florales, hasta que la planta haya macollado y tenga unos 25 cm de alto (Ramírez, 2011). Después de cada poda es recomendable aplicar un fungicida y un fertilizante foliar. El fungicida, con el fin de proteger la herida causada, de la entrada de patógenos y el fertilizante foliar, para estimular la brotación de las yemas laterales o rebrotes (Ramírez, 2011; Ramírez-Jaramillo y Lozano-Contreras, 2016).

### **2.18.9 Poda sanitaria**

Se realiza para eliminar ramas que han sufrido daño mecánico, o que estén afectadas principalmente por *Septoria*; en algunas ocasiones cuando las plantas presentan mucha floración, es conveniente podar toda la planta a unos 25 cm del suelo, con el fin de estimular el crecimiento vegetativo (Ramírez, 2011).

### **2.18.10 Poda de renovación**

Se realiza un corte uniforme a toda la planta a unos 25 cm del suelo, con el propósito de renovar el área productiva. Esta poda se realiza cuando la productividad de la planta está en descenso o hay daño por *Septoria*, que se observa cuando la enfermedad ha avanzado al tercio medio y superior de la planta (Ramírez, 2011; Lemus-Moncada *et al.*, 2012).

### **2.18.11 Control de plagas**

Los daños ocasionados por insectos del orden Coleoptera, Lepidoptera y Orthoptera influyen directamente en el rendimiento del cultivo, pues consumen las hojas, con lo cual el área foliar se reduce notoriamente, traduciéndose en una menor cosecha de hojas comerciales. Las plagas chupadoras y raspadoras (Hemiptera, Homoptera, Acari y Thysanoptera) causan daño indirecto, pues se alimentan de la savia, disminuyendo el crecimiento de la planta por reducción de fotoasimilados disponibles para los procesos metabólicos. Los insectos masticadores *Diabrotica* sp., *Pseudoplusia includens*, *Spodoptera* sp. y *Schistocerca* sp., son los que ocasionan daños directos en la producción debido a la reducción de área foliar por el consumo de hojas (Ramírez-Jaramillo y Lozano-Contreras, 2016).

### **2.18.12 Control de enfermedades**

Las enfermedades encontradas en estevia son causadas por fitopatógenos que provocan marchitamiento, manchas necróticas y ennegrecimiento y cancro; por hongos como: *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp. y *Sclerotium* sp., que ocasionan muerte de las plantas, reduciendo así la población de estevia por unidad de área. Para el control de enfermedades como manchas foliares de *Septoria* y *Alternaria* se recomienda sulfato de cobre a razón de 3 g L<sup>-1</sup> de agua (Duarte, 2008). Se recomienda realizar un manejo preventivo de las enfermedades, iniciar con el correcto tratamiento del suelo del semillero

y utilización de agua limpia para el riego. Desde el inicio del desarrollo de los plantines se deberán llevar a cabo tratamientos preventivos semanales para preservarlas del ataque de las enfermedades citadas anteriormente, son convenientes las aplicaciones de sulfato de cobre carboxilado, alternado con Carbendazim de acción sistémica (Casaccia y Álvarez, 2006; Ramírez-Jaramillo y Lozano-Contreras, 2016).

### **2.19 Corte de estevia y manejo postcosecha**

El momento ideal del corte es cuando la plantación presenta un máximo de 5% de botones florales o una semana antes de que abran los botones florales, en esta etapa las hojas de *S. rebaudiana* poseen el mayor contenido de edulcorantes, es decir, el pico más alto de glucósidos. Se debe cortar en tiempo seco y después que el rocío se haya disipado (Cassacia y Álvarez, 2006), y tener precaución de no cortar la hoja cuando está muy húmedo el ambiente o con amenaza de lluvia para evitar que se oxide (Ramírez-Jaramillo y Lozano-Contreras, 2017). El número de cortes está en función de las condiciones climáticas y de suelos, por lo general, se realizan hasta cuatro cortes por año, sin embargo, dependiendo del manejo y la variedad se pueden llegar a realizar hasta ocho cortes al año, sobre todo en regiones donde la luminosidad supera las 3000 horas luz al año (Ramírez-Jaramillo y Lozano-Contreras, 2017).

El secado de hoja puede hacerse directamente al sol, las ramas y hojas cortadas deben colocarse en una capa delgada sobre una malla media sombra o plástico, dejar al sol hasta el atardecer y en caso de que el secado no se complete se debe recoger y guardar bajo techo, al día siguiente sacar al sol hasta completar el secado. Una vez secas las hojas deben separarse de los tallos. Otra opción es la implementación de un secador artificial, en el cual se deberá procurar que las hojas no contengan más de un 12 % de humedad, antes de su almacenamiento. Después de seco, el producto guarda sus propiedades por mucho tiempo, sin perder su poder edulcorante (Ramírez-Jaramillo y Lozano-Contreras, 2017). Las hojas secas son almacenadas en bolsas de plástico de 20 kg en los cuales puede cargarse en torno de 10 a 13 kg de hoja seca (Ramírez *et al.*, 2011). Se almacenan en depósitos secos y bien ventilados. Se tienen datos que las propiedades edulcorantes de las hojas correctamente secadas pueden perdurar hasta 25 años (Ramírez *et al.*, 2011).

## **2.20 Composición de la estevia**

Los compuestos responsables del dulzor de la *Stevia rebaudiana* son los glucósidos de esteviol aislados e identificados como: esteviósido, esteviolbiósido, rebaudiósido A, B, C, D, E y F y dulcósido. Éstos se encuentran en las hojas de la planta en porcentajes variables en función de la especie, las condiciones de crecimiento y las técnicas agronómicas, llegando a alcanzar hasta el 15 % de su composición (Gilabert y Encinas, 2014). El esteviósido es el componente principal, constituyendo cerca del 85 % de los edulcorantes totales, mientras que el rebaudiósido A, en menor proporción, es el componente más dulce. Estos dos componentes han sido empleados por el elevado poder edulcorante y la baja toxicidad (Chan *et al.*, 2000). Se ha determinado que el sabor amargo del extracto se debe principalmente al contenido de esteviósidos. Entre mayor sea el porcentaje de rebaudiósido A, en el extracto final, mayor dulzor y mejor sabor tendrá (Rank y Midmore, 2006).

## **2.21 Metabolismo de la estevia**

Los glucósidos de esteviol pasan por el cuerpo sin producir ningún tipo de acumulación o impacto calórico significativos. Éstos no se digieren y pasan a través del sistema digestivo alto completamente intactos. Las bacterias intestinales en el colon (*Bacterioides* spp.) hidrolizan los glucósidos de esteviol al cortar sus unidades de glucosa. Luego, el esteviol es absorbido por la vena porta y, principalmente, es metabolizado por el hígado a glucorónido de esteviol, y finalmente es eliminado a través de la orina (Geuns *et al.*, 2007).

## **2.22 Ruta de síntesis de esteviósidos**

Los compuestos edulcorantes de las hojas de estevia son glucósidos de diperteno sintetizados a partir de la ruta del ácido giberélico. Estos dipertenos se sintetizan a partir de unidades de acetato del acetil-coenzima A en la ruta del ácido mevalónico (MVA). Este último ingresa al cloroplasto y se convierte en pirofosfato de isopentenilo (IPP) que es considerado el isopreno activo, luego, se convierte en pirofosfato de geranylgeranilo, un compuesto de 20 carbonos que sirve como donador de todos los átomos de carbono de las giberelinas, más tarde, en pirofosfato de copadillo, con dos sistemas de anillos y, por último, en Kaureno, un compuesto que tiene cuatro sistemas de anillos. El Kaureno

es el compuesto donde divergen los glucósidos de esteviol y las giberelinas. En estevia, el Kaureno es convertido a esteviol, estructura básica de los glucósidos de diperteno en el retículo endoplásmico, este esteviol puede ser glucosilado en el aparato de Golgi, para formar los principales edulcorantes, como el esteviósido, los rebaudiósidos A y C y el dulcosido A, que van finalmente a las vacuolas (Kasahara *et al.*, 2002; Jarma *et al.*, 2005; Hsieh y Goodman, 2005; Guevara *et al.*, 2005).

## **2.23 Ingesta diaria admisible**

La FDA, OMS y la FAO (Admiración de Drogas y Alimentos, Organización Mundial de la Salud y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) han aprobado el uso de la estevia como “aditivo alimentario” para ser consumida por personas de todas las edades. En diciembre de 2008, la FDA autorizó el uso del rebaudiósido A como edulcorante en bebidas y alimentos, clasificándolo como GRAS (generalmente reconocido como seguro). La última revisión de la FDA fue en 2013, en la que siguió clasificado como GRAS (Food and Drug Administration, 2013). El comité JECFA ha revisado varias veces la IDA (ingesta diaria admisible) de la estevia desde el año 2000 hasta el 2010, estableciendo en la última revisión una IDA de 4 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal/día (JECFA, 2005).

## **2.24 Técnicas de extracción de glucósidos**

### **2.24.1 Extracción con fluidos supercríticos**

Un fluido supercrítico es cualquier sustancia a una temperatura y presión por encima de su punto crítico termodinámico. Tiene la propiedad de difundirse a través de los sólidos como un gas, y de disolver los materiales como un líquido. Adicionalmente, puede cambiar rápidamente la densidad con pequeños cambios en la temperatura o presión. Estas propiedades lo hacen conveniente como un sustituto de los solventes orgánicos en los procesos de extracción. Los fluidos supercríticos (FSC) tienen la capacidad de extraer ciertos compuestos químicos con el uso de determinados solventes específicos bajo la combinación de temperatura y presión (Brunner, 2005; Rozzi y Singh, 2002).

### **2.24.2 Extracción de compuestos por Soxhlet**

La extracción sólido-líquido es muy antigua, a mediados del siglo XIX se describieron diversas versiones de este proceso (maceración, infusión, decocción, lixiviación y el desplazamiento), cuyos dos últimas fases descritas en 1849 por Morfit, son el embalaje de la materia orgánica extraída en un percolador, que se llena con un disolvente caliente que se deja percolar lentamente a través de la materia orgánica y una abertura en la parte inferior para el drenaje cuyo producto se colecta en un recipiente. El proceso se repite varias veces y por último los disolventes se evaporan para recuperar la materia extraída (Jensen, 2007).

### **2.25 Cromatografía de capa fina**

Para la identificación y análisis semicuantitativo de los compuestos rebaudiósido A y esteviosido de la planta *Stevia rebaudiana*, se realiza una cromatografía en capa fina, que consiste en una serie de inyecciones de extracto crudo sobre una placa de sílica gel en fase normal, cuya polaridad es mayor que la fase móvil (seleccionada así debido a la estructura de los glucósidos de la planta), junto con inyecciones de estándares purificados de dichos compuestos. Una vez revelada la placa mediante compuestos cromógenos se logran evidenciar y distinguir bandas, que al compararse con las bandas de los estándares indican la presencia de las mismas estructuras en el extracto de las muestras inyectadas. Al analizar las bandas, una que aparece a la misma distancia del estándar de rebaudiósido A, otra a la distancia del estándar de esteviósido, u otras más a diferentes distancias, sugieren la presencia de otros glucósidos en la muestra. Según la intensidad de las bandas las muestras deberán presentar mayor concentración relativa de glucósidos (Vázquez *et al.*, 2014).

### **2.26 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)**

La cromatografía líquida de alta eficacia es una técnica analítica de separación que se utiliza con gran frecuencia debido a su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, a su alta sensibilidad e idoneidad para la separación de especies y a su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, la ciencia y la sociedad. Este método físico de separación es basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra

móvil. En la cromatografía, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija. Los componentes atraviesan dicha fase a distintas velocidades y se van separando, luego pasan por un detector que genera una señal que puede depender de la concentración y el tipo de compuesto (Scott, 2003).

La respuesta del detector en función del tiempo se recoge en una gráfica denominada cromatograma, el eje horizontal corresponde al volumen o al tiempo equivalente; normalmente se mantiene constante la velocidad de flujo (volumen/tiempo) para que el tiempo pueda ser siempre representado en el eje horizontal. El eje vertical es proporcional a la respuesta que se produce en el detector a medida que el líquido efluente del soporte cromatográfico pasa a través de él. La separación de los componentes depende del ancho de los picos y del espacio de tiempo entre los picos (Scott, 2003).

Este método es el más utilizado en investigaciones actuales y se considera como uno de los métodos más confiables para esa determinación (Kovylyaeava *et al.*, 2007). Organizaciones internacionales, como el Comité Mixto de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA por sus siglas en inglés), tienen validado un método de HPLC para la detección de glucósidos en *Stevia rebaudiana* (JECFA, 2010).

## **2.27 Trabajos reportados de extracción de glucósidos**

Jaitak *et al.* (2008) encontraron valores para esteviósidos de (3.3 - 6.7 %) y de (1.2 % - 2.3 %) para rebaudiósido A, en su investigación para conocer la estabilidad fenotípica y densidades de plantas de diferentes genotipos de estevia, atribuyendo esto a las condiciones climáticas en las que se desarrolla el cultivo.

Jiménez *et al.* (2010) encontraron en cultivos de estevia establecidos en Paraguay valores altos en el contenido de esteviósidos (21 %) y rebaudiósidos A (12 %). Sin embargo, aunque ellos lo relacionan directamente con las condiciones agroclimáticas, solo las mencionaron de manera general, pero no las evaluaron.

Moguel *et al.* (2011) en su trabajo de investigación determinaron la concentración de esteviósido para los materiales criollo 1, criollo 2, SM1 y Morita II, obtenido estos resultados en esteviósidos respectivamente (7.1, 5.1, 5.3 y 2.1 %) y las concentraciones de rebaudiósido A fueron de (2.9, 2.4, 1.7 y 9.1 %) de hoja respectivamente. Ellos

relacionaron las diferentes concentraciones a la temporada de cosecha, que va relacionada con la radiación solar y precipitación pluvial.

Jarma *et al.* (2012) evaluaron solamente rebaudiósido A reportando contenidos de (9.3, 10.1, 11.6 %) bajo un método de HPLC con una columna NH<sub>2</sub>, estas concentraciones las relacionaron al efecto de la temperatura y radiación en las plantas de estevia.

González *et al.* (2014) caracterizaron cultivares de estevia de diferentes procedencias, los cuales reportaron valores para esteviósidos de (1.9, 2.4, 4.3 %) y para rebaudiósido A de (7.4, 6.9, 17.7 %) esto mediante el método de HPLC utilizando una columna NH<sub>2</sub>, atribuyendo la variación de las concentraciones al genotipo y región en donde es cultivada.

Aranda *et al.* (2014) en su investigación al evaluar la inocuidad de estevia como edulcorante de alimentos, reportó contenidos de esteviósidos de (3.97 %) y para rebaudiósidos A de (15.15 %). En este trabajo de investigación le atribuyen a la variedad de la planta, la cantidad de radiación solar y la densidad de cultivo el diferente contenido de glucósidos.

Hernández *et al.* (2016) evaluando el rendimiento y la calidad de las hojas de estevia en diferentes regiones, encontraron concentraciones de esteviósidos del (2 ,1.3, 3.9, 1.6, 1.4, %) y para rebaudiósido A de (13.2,13.7, 8.6, 9.9, 9.4 %), atribuyeron estos contenidos a la influencia edafo-climática de cada región.

### **3. HIPÓTESIS**

#### **3.1 Hipótesis General**

Las características morfológicas de la planta y la concentración de esteviosido y rebaudiosido A en hoja dependen de las condiciones edafo-climáticas y de manejo del cultivo.

#### **3.2 Hipótesis Particulares**

La morfología de la planta de estevia, depende del manejo del cultivo y de las condiciones edafo-climáticas de las localidades en donde se encuentra cultivada.

Existen diferentes concentraciones de esteviósido y rebaudiosidos A, en función de las condiciones edafo-climáticas y de manejo del cultivo.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo General**

Evaluar las características morfológicas de las plantas de estevia y determinar el contenido de esteviósido y rebaudiósido A en hojas, en diferentes condiciones edafo-climáticas y de manejo del cultivo.

#### **4.2 Objetivos Específicos**

Evaluar la morfología de plantas de estevia, cultivadas en parcelas con diferentes condiciones edafo-climáticas y de manejo.

Determinar el contenido de esteviósido y rebaudiósido A en hojas de estevia en plantas bajo diferentes condiciones edafo-climáticas y de manejo.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Con la finalidad de cumplir con los objetivos planteados para esta investigación, a continuación, se describen las fases de trabajo.

### 5.1 Localidades de estudio

1) Tuzamapan, se localiza en el municipio de Coatepec en el estado de Veracruz y se encuentra en las coordenadas geográficas, 19° 23' 21.85'' N, 96°52' 23.37'' O. 2) Venustiano Carranza, se localiza en el estado de Chiapas, ubicado en las coordenadas geográficas 16° 22' 16.74''N, 92° 32' 49.19'' O. 3) Bacalar, se ubica en el municipio de Othón P. Blanco en el estado de Quintana Roo, en las coordenadas geográficas 18° 43'01.62''N, 88° 24'08.98''O (Figura 7) (Meteoblue,2018).

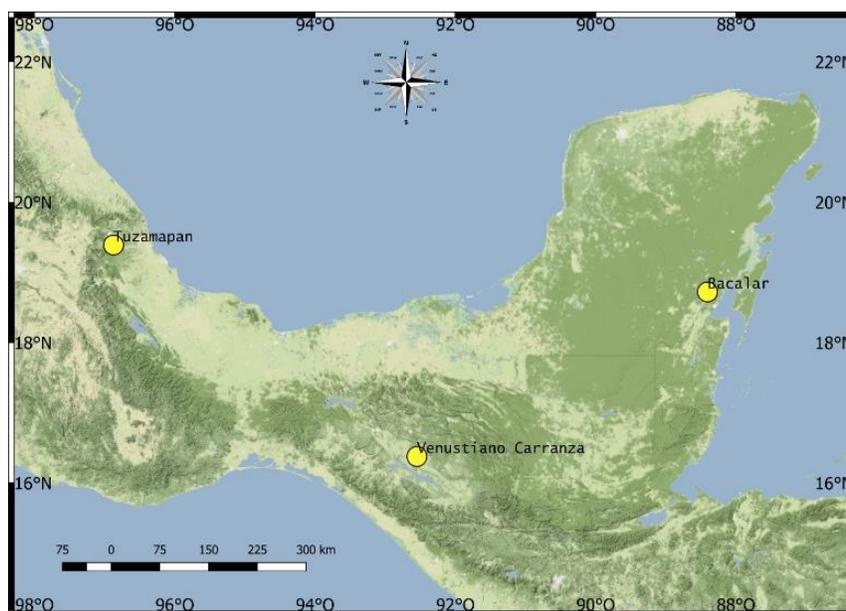


Figura 7. Ubicación geoespacial de las localidades de estudio de plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

### 5.2 Material vegetal y tamaño de muestra

Las plantas de estevia fueron de la variedad Morita II, recolectadas en las tres localidades en donde se realizaron los muestreos. De cada parcela se tomaron 10 plantas de forma aleatoria, cortando todos los brotes a partir de 5 cm de la base de la raíz.

### **5.3 Diseño experimental**

El estudio fue realizado como un pseudo-experimento, bajo un diseño completamente al azar, donde se consideró cada localidad como un tratamiento, con 10 repeticiones y una planta como unidad experimental.

### **5.4 Información climática, muestreo de suelos y muestreo de hojas**

Los datos de clima, altitud, precipitación pluvial, temperatura y luminosidad se tomaron de bases de datos meteorológicos de estaciones establecidas cerca de los sitios de muestreo reportados en la página climatológica Meteoblue. En el muestreo foliar se tomaron 10 plantas de modo aleatorio, cortando los brotes a partir de 5 cm de la base de la raíz. Los brotes se guardaron en bolsas de papel con sus respectivas etiquetas para el traslado al laboratorio y ser procesadas para los análisis correspondientes (Anexo 1).

El muestreo de suelo se realizó en forma de zigzag. Se tomaron 5 submuestras de aproximadamente 200 g cada una. Las muestras fueron guardadas en bolsas de polietileno, se etiquetaron y fueron trasladadas al laboratorio para sus respectivos análisis. Los análisis se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000 (Anexo 1).

En Tuzamapan, Ver. el muestreo se realizó el día 11 de abril del 2018, en Venustiano Carranza, Chis. el día 2 de junio del 2018 y en Bacalar, Q. Roo el día 27 de junio de 2018.

### **5.5 Variables evaluadas**

Se tomaron datos de altura de la planta, número de hojas, número de brotes, diámetro del tallo. Además, se registró el peso fresco, peso seco y contenido de humedad de las hojas. En el análisis de suelo se determinó textura, pH, Conductividad Eléctrica (CE), contenido de materia orgánica (MO), Nitrógeno (N), Potasio (K), Sodio (Na), Calcio (Ca), Magnesio (Mg), y capacidad de intercambio catiónico (CIC). Para la fase del análisis de los glucósidos se determinó el contenido de esteviósido y rebaudiósido A reportados en % en base a hoja seca.

## 5.6 Manejo del cultivo

Para conocer el manejo de cultivo en las parcelas muestreadas, se aplicó un cuestionario con preguntas abiertas a los productores. Considerando aspectos importantes como las prácticas de manejo del cultivo, el manejo de cosecha y postcosecha, así como el rendimiento (Anexo 2).

## 5.7 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

### 5.7.1 Preparación de las muestras

Se molieron las hojas secas de cada muestra. Se tomaron 500 mg de polvo de estevia de cada muestra. En tubos Falcon de 15 mL se agregaron 5 mL de agua grado HPLC y se agregó el polvo de las hojas de cada muestra para ponerse a baño María durante 30 minutos a una temperatura de 100 °C. Este paso se repitió dos veces. El extracto resultante se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos. La fase acuosa se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL y fue aforado a su capacidad con agua HPLC. Por último, esta solución se filtró a través de filtros de membrana de 0.45 µm para ser depositado en viales de HPLC de 2 mL para hacer las lecturas correspondientes en el equipo de cromatografía líquida (HPLC) (Figura 8) (Aranda *et al.*, 2015) (Anexo 3).



Figura 8. Preparación de extractos de *Stevia rebaudiana* Bertoni para lectura en HPLC.

### 5.7.2 Cromatografía líquida (HPLC) para medir contenido de glucósidos

Se realizó un método de cromatografía líquida de alto rendimiento, con un sistema de HPLC Agilent Technologies 1260 Infinity (Quaternary LC). Para el procedimiento

cromatográfico se utilizó una columna C18 (longitud: 250 mm; diámetro interior: 4.6 mm, tamaño de partícula: 5 micras) (columna Phenomenex Co., Ltd., CA, EE.UU.), sin control de temperatura con detector UV- vis que se ajustó a una longitud de onda de 210 nm. La fase móvil fue 32:68 (v / v) mezcla de acetonitrilo y tampón de fosfato de sodio 10 mmol / L (pH 2.6) a un caudal de 0.8 mL /min. El volumen de inyección de muestra fue de 20  $\mu$ L y el análisis se realizó con el software Claridad 2.7.3.498 versión 2009 (Aranda *et al.*, 2015).

### **5.7.3. Cuantificación de glucósidos**

Se realizaron las curvas de estándares para cada glucósido, a 100, 200, 300, y 400  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Con los resultados obtenidos se determinó la regresión lineal para la cuantificación de los glucósidos. Con el área reportada en los picos de los cromatogramas de cada localidad, se determinaron los contenidos de esteviósidos y rebaudiósidos A. Los contenidos se reportaron en % de peso seco de la hoja.

### **5.7.4 Análisis de datos**

Los datos de las características morfológicas y los contenidos de esteviósido y rebaudiósido A, se integraron a una hoja de cálculo de Excel Versión 2010. Mediante el programa estadístico SAS 9.4, se realizó un ANOVA y una prueba de medias LS-means con  $p \leq 0.05$ , además se realizó una correlación de Pearson para las variables edafo-climáticas, variables morfológicas y contenido de glucósidos.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Descripción climática de las localidades de muestreo

Como se describió en la sección de materiales y métodos, la recolección de estevia se realizó en tres localidades, a continuación, se presentan las descripciones climáticas de cada localidad.

#### 6.1.1 Tuzamapan, Veracruz

La localidad de Tuzamapan, Veracruz, se encuentra a una altura promedio de 874 msnm y presenta un clima subtropical húmedo (Cfa), una precipitación pluvial anual de 1351 mm, una temperatura máxima media anual de 25.83 °C, temperatura media anual de 20.44 °C, temperatura mínima anual de 15.08° C y una luminosidad promedio anual de 12.38 horas (Figura 9).

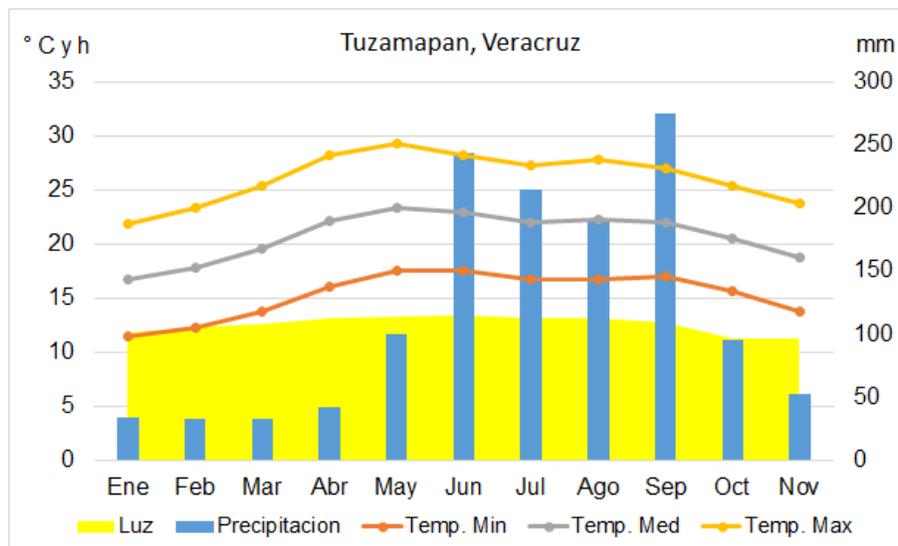


Figura 9. Climatograma de las condiciones de Tuzamapan, Veracruz durante el año 2018. (Elaboración con datos de Meteoblue.com).

#### 6.1.2 Venustiano Carranza, Chiapas

El municipio de Venustiano Carranza, Chiapas presenta un clima templado con invierno seco (Cwb) a una altitud de 1516 msnm. Se reporta una precipitación pluvial media anual de 982 mm, temperatura máxima anual de 25.05 °C, temperatura media anual de 18.09 °C, temperatura mínima anual de 11.19 °C y luminosidad promedio anual de 12.65 horas (Figura 10).

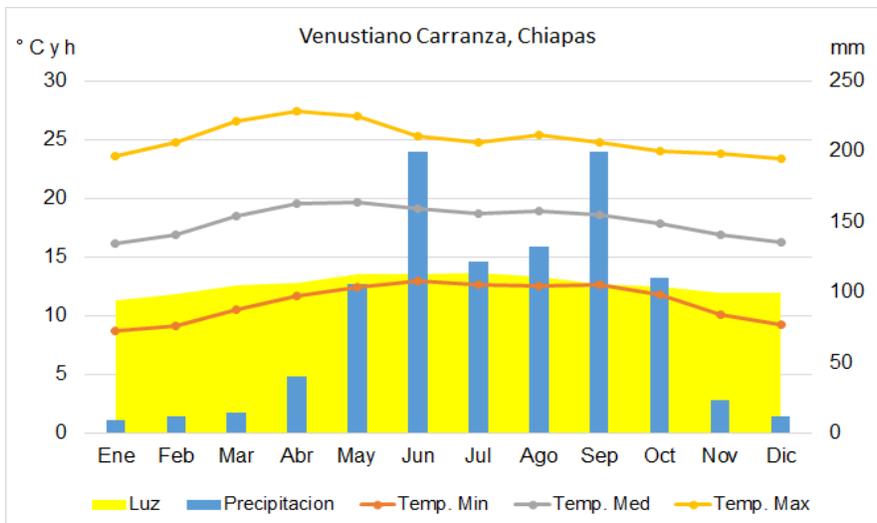


Figura 10. Climatograma de las condiciones de Venustiano Carranza, Chiapas durante el año 2018. (Elaboración con datos de Meteoblue.com).

### 6.1.3 Bacalar, Quintana Roo

El municipio de Bacalar, Quintana Roo se ubica a una altitud de 17 msnm y presenta un clima tropical (Aw). De acuerdo a los datos meteorológicos consultados, se registra una precipitación pluvial media anual de 1091 mm, temperatura máxima anual de 30.5 °C, temperatura media anual de 25.8 °C, temperatura mínima anual de 21.1 °C y una luminosidad media anual de 12.45 horas (Figura 11).

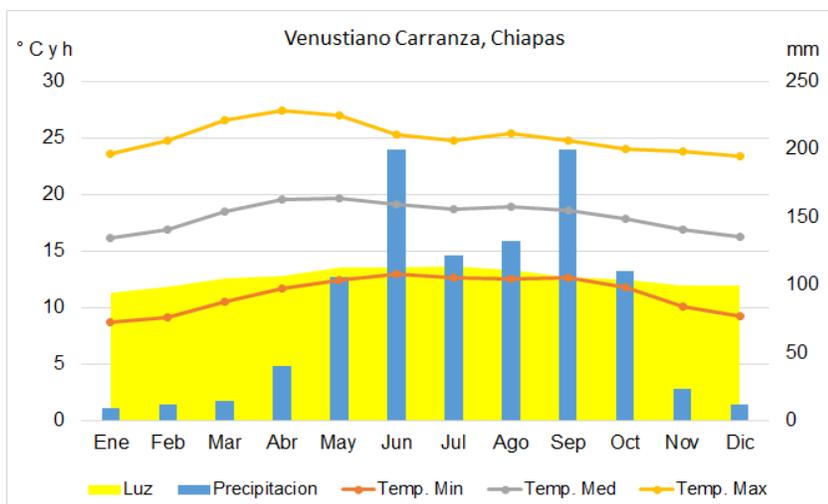


Figura 11. Climatograma de las condiciones de Bacalar, Quintana Roo durante el año 2018. (Elaboración con datos de Meteoblue.com).

El Cuadro 3, resume las altitudes y condiciones climáticas de las localidades de estudio. La altitud de Venustiano Carranza, Chis. y Tuzamapan, Ver. están dentro del intervalo de adaptación que va de 300 a 1200 msnm (Yaday *et al.*, 2011). Aunque la altitud de Bacalar está fuera del intervalo reportado, no impide el desarrollo de la planta.

El clima en Tuzamapan, Ver. y Bacalar, Q. Roo., están dentro de los reportados como óptimos y el clima de Venustiano Carranza, Chis como sub-óptimo para el desarrollo de la planta (Ramírez-Jaramillo y Lozano-Contreras, 2016). Las temperaturas máxima, mínima y media en Tuzamapan, Ver. y Bacalar, Q. Roo. están dentro del intervalo establecido como favorable para el desarrollo del cultivo (15 °C a 30°C) (Villa y Chifa, 2006). En Venustiano Carranza, la temperatura mínima está por debajo del intervalo antes mencionado, sin embargo, al parecer no afecta el desarrollo de la planta. Las horas de luz promedio reportadas en las tres localidades son ligeramente menores las 13 h diarias establecidas para el cultivo. En lo que respecta a la precipitación pluvial se considera baja en las tres localidades pues según, Ramia (2002), registrándose valores que van desde los 1400 a los 1800 mm al año. Sin embargo, en las tres localidades se emplea el sistema de riego por goteo ya que la estevia no puede exponerse a un periodo seco prolongado.

Cuadro 3. Altitudes y condiciones climáticas de las localidades de estudio.

Localidad	CLIMA	ALT (msnm)	PP (mm)	TMAX (°C)	TMED (°C)	TMIN (°C)	LUZ (h)
TUZ	Subtropical húmedo (Cfa)	874	1351	25.8	20.4	15	12.3
VCAR	Templado con invierno seco (Cwb)	1516	982	25	18	11.1	12.6
BAC	Tropical (Aw)	17	1091	30.5	25.8	21.1	12.4

TUZ= Tuzamapan, VCAR=Venustiano Carranza, BAC=Bacalar, ALT=altitud, PP=precipitación pluvial, TMAX=temperatura máxima, TMED= temperatura media, TMIN=temperatura mínima, LUZ= luminosidad

## 6.2 Propiedades físicas y químicas del suelo

De acuerdo con los análisis fisicoquímicos del suelo en las localidades de muestreo (Cuadro 4), los valores de pH en los suelos de Tuzamapan, Ver. y Bacalar, Q. Roo, están dentro del intervalo considerado como óptimo para el desarrollo de estevia (5.5 a 6.5). Al observar el Cuadro 4, se nota que el pH del suelo de Venustiano Carranza, Chis., es ligeramente inferior al intervalo establecido, sin embargo, no afecta el desarrollo de la planta (Ramírez-Jaramillo y Lozano-Contreras, 2016).

El porcentaje de materia orgánica mostró diferencias numéricas entre las localidades, Venustiano Carranza, Chis. reportó un bajo porcentaje, Tuzamapan, Ver. alto y Bacalar muy alto. Los porcentajes encontrados en Tuzamapan, Ver. y Bacalar, Q. Roo. están dentro de lo reportado como favorable para las plantas de estevia, pues según Ramírez-Jaramillo y Lozano-Contreras (2016) el cultivo necesita de regular a alta proporción de materia orgánica. Puede observarse que los macros y micronutrientes mostraron diferencias numéricas entre las localidades, siendo Venustiano Carranza, el que presento las menores cantidades.

Cuadro 4. Propiedades físicas y químicas de suelo en el cultivo de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

LOCALIDAD	pH (H <sub>2</sub> O) rel 1:2	C E μS cm <sup>-1</sup>	MO %	Nt	P mg kg <sup>-1</sup>	K	Ca cmol kg <sup>-1</sup>	Mg	Na
TUZ	5.95	50.1	3.41	0.14	15.52	0.35	6.8433	1.32	0.17
VCAR	5.33	93.4	1.59	0.09	3.65	0.31	4.1687	2.16	0.08
BAC	7.5	275.95	7.76	0.39	16.59	1.9	56.43	3.29	0.23

TUZ=Tuzamapan, VCAR=Venustiano Carranza, BAC=Bacalar, pH=potencial de hidrogeno, CE= conductividad eléctrica, Nt=nitrógeno total, P =fosforo, K=potasio, Ca=calcio, Mg= magnesio, Na= sodio.

En cuanto a textura del suelo estudiado (Cuadro 5), se determinó que, en Venustiano Carranza, Chis. hay una textura franco-arenosa-arcillosa, mientras que en Tuzamapan, Ver. y Bacalar, Q. Roo. el suelo presenta una textura Arcillosa. Se conoce que el cultivo de estevia es poco exigente a la textura, adaptándose a diferentes tipos de suelos, con texturas desde franco-arenosas a franco- arcillosas (Ramírez-Jaramillo, 2011).

Cuadro 5. Clasificación de textura del suelo de las localidades de estudio.

LOCALIDAD	CIC cmol kg <sup>-1</sup>	Arcilla	Limo %	Arena	Clasificación Textural
TUZ	17.87	43	15	41	Arcilloso
VCAR	7.94	36	11	53	Franco-arenoso-arcilloso
BAC	29.79	46	14	40	Arcilloso

TUZ= Tuzamapan, VCAR= Venustiano Carranza, BAC=Bacalar, CIC= capacidad de intercambio catiónico.

### 6.3 Manejo del cultivo

En el Cuadro 6, se presentan concentradas las principales prácticas del manejo de los cultivos de estevia, en las localidades de Tuzamapan, Ver., Venustiano Carranza, Chis., y Bacalar, Q. Roo., todos plantados con la variedad es Morita II.

Cuadro 6. Principales prácticas de manejo del cultivo de *Stevia rebaudiana* Bertoni en las localidades de estudio.

Prácticas de manejo	Tuzamapan	V. Carranza	Bacalar
Superficie sembrada (ha)	3	2	2.5
Variedad	Morita II	Morita II	Morita II
Plantas ha <sup>-1</sup>	88 000	240 000	55 000
Acolchado	Si	No	Si
Riego	Si	Si	Si
Abonos orgánicos	Si	Si	Si
Fertilización química	Si	Si	No
Poda	Si	Si	Si
Número de cortes por año	4	6 o 7	3 o 4
Control de maleza	Si	Si	Si
Control de plagas	Si	Si	Si
Control de enfermedades	Si	Si	Si
Rendimiento de hoja seca (t ha <sup>-1</sup> )	7	8.4	5.5

Al observar el Cuadro 6 es posible notar que existe una diferencia importante en la densidad de plantación en Venustiano Carranza, Chis. (240,000 plantas) y en Bacalar, Q. Roo. (55,000 plantas). Al respecto, la literatura señala que, con densidades por arriba de 160,000 plantas  $\text{ha}^{-1}$  se pueden obtener mayores rendimientos (Ramírez, 2011). Otra diferencia entre localidades es la presencia de acolchado plástico en Tuzamapan, Ver. y Bacalar, Q. Roo., y la ausencia de este en Venustiano Carranza, Chis. Las imágenes mostradas en la Figura 12 permiten apreciar una diferencia marcada en el crecimiento de las plantas en favor de la parcela sin acolchado, en donde, además, el productor indicó que realiza de 6 a 7 cortes y reporta el rendimiento más alto de hoja seca registrado: 8.4 t  $\text{ha}^{-1}$  (Cuadro 6).

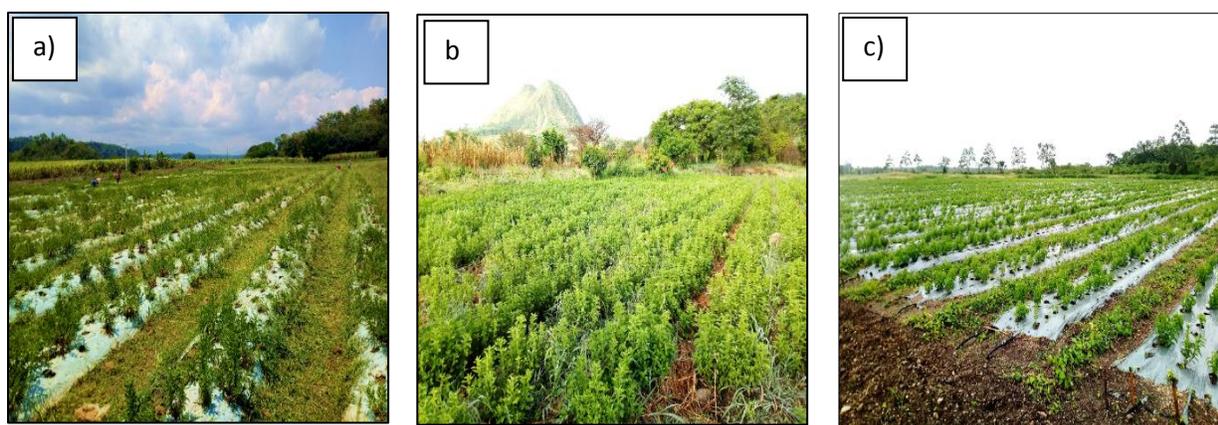


Figura 12. Plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni en diferentes localidades de estudio. a) Tuzamapan, Veracruz. b) Venustiano Carranza, Chiapas. c) Bacalar, Quintana Roo.

La diferencia en rendimiento entre parcelas tiene relación con la densidad de plantación y posiblemente con la nutrición. En Venustiano Carranza, Chis., se aplican fertilizantes químicos líquidos por medio del sistema de riego por goteo, foliares y abonos orgánicos; en Bacalar, Q. Roo., el cultivo está certificado como orgánico, por lo cual integran abonos verdes y lombricomposta. En Tuzamapan, Ver. se está buscando la certificación por lo que están incluyendo abonos orgánicos, sin embargo, eventualmente utilizan fertilizantes químicos.

Algunos autores han reportado rendimientos de estevia en hoja seca de 1.4 t  $\text{ha}^{-1}$  con 125,000 plantas  $\text{ha}^{-1}$  y 3.5 t  $\text{ha}^{-1}$  con 62,000 plantas por  $\text{ha}^{-1}$  año<sup>-1</sup> (Espitia *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2016). En otros países, como Paraguay, se reportan rendimientos de

4.3 t ha<sup>-1</sup>, y en Japón y Canadá de 4 a 6 t ha<sup>-1</sup> y 3 t ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, respectivamente, con diferentes densidades de siembra no especificadas (Ramesh *et al.*, 2006). Al respecto, Hernández *et al.* (2016), mencionan que los contrastes en rendimientos entre localidades se pueden entender por la interacción de las diferentes condiciones ambientales propias de cada localidad y del manejo del cultivo.

#### 6.4 Características morfológicas de las plantas de estevia

De acuerdo con el análisis de varianza, se encontraron diferencias estadísticas significativas para altura de planta (P=0.0001), diámetro de tallo (P=0.0001), número de hojas (P=0.0002), número de brotes (P=0.0011), peso fresco de hojas (P=0.0006), peso seco de hojas (P=0.0316) y contenido de humedad de hojas (P=0.0001) (Cuadros 7 y 8).

Para altura de planta, la prueba de medias (LS-means) separó las medias de las tres localidades hallando una superioridad en las plantas cultivadas en Venustiano Carranza, Chis. El diámetro de tallo fue similar en las plantas de Venustiano Carranza, Chis. y Tuzamapan, Ver., y superiores al diámetro de las plantas de Bacalar, Q. Roo. El número de hojas de las plantas de Venustiano Carranza, Chis., fue mayor al de las demás localidades, al igual que para el número de brotes.

Cuadro 7. Medias de las variables morfológicas de las plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni en los diferentes localidades de estudio.

LOCALIDAD	AP (cm)	DT (mm)	NH	NB
VCAR	45.08±1.92 <b>a</b>	2.97±0.17 <b>a</b>	3353.00±284.54 <b>a</b>	54.20±2.97 <b>a</b>
TUZ	35.81±1.92 <b>b</b>	2.84±0.17 <b>a</b>	1633.20±248.54 <b>c</b>	36.40±2.97 <b>c</b>
BAC	27.60±1.92 <b>c</b>	1.46±0.17 <b>b</b>	2498.90±284.54 <b>b</b>	45.50±2.97 <b>b</b>

Los valores representan la media ± ES (Error Estándar). Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (p≤0.05) TUZ=Tuzamapan, VCAR=Venustiano Carranza, BAC=Bacalar, AP=altura de la planta, DT= diámetro del tallo, NH= número de hojas, NB= número de brotes.

El peso fresco de las plantas de las hojas fue similar entre las plantas de Tuzamapan, Ver. y Bacalar, Q. Roo., siendo las plantas de Venustiano Carranza, Chis., las que

presentaron el mayor peso fresco. El peso seco de las hojas fue similar entre las plantas de Venustiano Carranza, Chis. y Tuzamapan, Ver, siendo superiores al peso seco de las plantas de Bacalar. El contenido de humedad de las hojas en las plantas de Venustiano Carranza, Chis. y Bacalar, Q. Roo fueron similares, y superiores a las de Tuzamapan.

Cuadro 8. Análisis del peso fresco, peso seco y contenido de humedad de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni en diferentes localidades de estudio

LOCALIDADES	PF (g)	PS (g)	CHH (%)
VCAR	396.17±25.15 <b>a</b>	118.73±11.19 <b>a</b>	69.96±1.53 <b>a</b>
BAC	271.92±25.15 <b>b</b>	76.18±11.19 <b>b</b>	72.18±1.53 <b>a</b>
TUZ	250.49±25.15 <b>b</b>	108.25±11.19 <b>a</b>	58.61±1.53 <b>b</b>

Los valores representan la media ± ES (Error Estándar). Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) PF= peso fresco, PS= peso seco, CHH= contenido de humedad en la hoja.

De acuerdo con los resultados mencionados anteriormente, en general, las plantas de Venustiano Carranza, Chis., presentaron los valores más altos para las variables morfológicas, peso fresco y peso seco de hojas. Es posible que las diferencias en el manejo del cultivo, con mayor densidad de plantación, sin acolchado y junto con una fertilización integrada (fertilizantes químicos y abonos orgánicos), estimularan un mayor crecimiento y desarrollo del follaje de las plantas, es decir, follaje de las plantas ya que el suelo en esta localidad presentó menor porcentaje de materia orgánica y concentración de macro y micronutrientes, con una textura franco-arenosa-arcillosa. Estas condiciones favorecieron una mejor respuesta de las plantas a la fertilización y riego, aunado a la precipitación pluvial, lo que favorece la movilidad de los nutrientes y el mejor aprovechamiento de estos por las plantas.

Así como el manejo del cultivo de estevia en Venustiano Carranza fue distinto al de las otras localidades evaluadas, también lo fue la media de horas luz, siendo esta mayor al de los otros municipios estudiados. Según Ramírez (2011), los fotoperiodos largos aumentan la longitud de los entrenudos, el área foliar y aceleran la aparición de las hojas

en las plantas. Jarma *et al.* (2006) mencionan que Morita II presenta un mejor desarrollo y una mayor área foliar cuando crece bajo niveles altos de radiación.

### **6.5 Correlaciones de variables morfológicas con altitud y variables climáticas**

En el Cuadro 9 se presentan las correlaciones entre las variables morfológicas de las plantas de estevia, la altitud y las principales variables climáticas de las localidades de estudio.

La altura de la planta y el diámetro del tallo presentaron correlación positiva y significativa con la altitud en las localidades de muestreo. Desde el punto de vista biológico, la altitud incide sobre el crecimiento de las plantas, la longitud de los entrenudos y el tamaño de las hojas (Ramírez *et al.*, 2011). Lo que concuerda con los valores reportados en altura y diámetro del tallo de las plantas en Venustiano Carranza, Chis., que se encuentra a una altitud de 1516 msnm. Sin embargo, el peso fresco y peso seco presentaron una correlación regular con la altitud.

El número de hojas, número de brotes, peso fresco y contenido de humedad de las hojas son inversamente proporcionales con la precipitación pluvial. Es decir, a mayor precipitación estas variables fueron menores. Lo cual se ve reflejado en las plantas de Tuzamapan, Ver., ya que reportaron los menores valores para estas variables y es la localidad en donde la precipitación pluvial es mayor (1351 mm).

La altura de planta y diámetro del tallo presentaron correlación negativa significativa, lo que indica que existe una relación inversa con las temperaturas mínimas y máximas, es decir a mayores o menores temperaturas la planta tendrá menor altura y diámetro del tallo. En Bacalar, Q. Roo., en donde existen las máximas temperaturas se observaron las plantas con menor altura y diámetro de tallo. Venustiano Carranza, Chis., con las menores temperaturas, se obtuvieron los más altos valores para altura de planta y diámetro de tallo. Existe una correlación positiva y significativa entre el número de hojas, número de brotes, peso fresco con la luminosidad. Esto concuerda con lo reportado en Venustiano Carranza, Chis., donde existe la mayor cantidad de luminosidad (12.6 h) y las variables morfológicas fueron mayores en relación a las de Tuzamapan, Ver. y Bacalar Q. Roo. Al respecto Ramia, (2002) menciona que la estevia requiere días largos y alta intensidad solar, ya que los fotoperíodos largos aumentan la longitud de los

entrenados, el área foliar y acelera la producción de hojas. Por otro lado, Ramesh *et al.* (2006) afirman que el crecimiento vegetativo, área foliar y peso seco de las hojas variaron de acuerdo a la duración del día, y que estos parámetros fueron mayores en días largos que en días cortos.

Cuadro 9. Coeficiente de correlación (n 30) y niveles de significancia, entre variables morfológicas, altitud y variables climáticas.

	AP	DT	NH	NB	PF	PS	CHH	ALT	PP	TMAX	TMIN	LUZ
AP	1	.88**	.68**	.69**	.83**	.87**	-0.34	<b>.77**</b>	-0.25	<b>-.70**</b>	<b>-.76**</b>	<b>.57**</b>
DT		1	.42*	.44*	.64**	.81**	-0.53**	<b>.73**</b>	0.12	<b>-.79**</b>	<b>-.75**</b>	0.27
NH			1	.98**	.95**	.64**	0.21	0.31	<b>-.66**</b>	-0.08	-0.26	<b>.66**</b>
NB				1	.96**	.68**	0.15	0.28	<b>-.61**</b>	-0.07	-0.23	<b>.60**</b>
PF					1	.77**	0.03	<b>.49**</b>	<b>-.52**</b>	-0.32	-.45*	<b>.64**</b>
PS						1	-0.59**	<b>.46*</b>	-0.00	-.47**	-.46**	0.23
CHH							1	-0.14	<b>-.71**</b>	.41*	0.21	.46*
ALT								1	-0.25	-.93**	-.99**	.68**
PP									1	-0.10	0.16	-.87**
TMAX										1	.96**	-.39*
TMIN											1	-.62**
LUZ												1

AP = altura de la planta, DT= diámetro de tallo, NH= número de hojas, NB= número de brotes, PF= peso fresco, PS= peso seco, CHH= contenido de humedad en la hoja, ALT= altitud, PP= precipitación pluvial, TMIN= temperatura mínima, TMED= temperatura media, TMAX= temperatura máxima, LUZ=luminosidad. \*\* Significancia del 1 %, \* Significancia al 5 %. Los valores en negritas se tomaron como correlaciones relevantes.

## 6.6 Correlaciones de variables morfológicas con variables edafológicas

Las correlaciones entre las variables morfológicas evaluadas en las plantas de estevia y algunas variables edafológicas, fueron negativas y altamente significativas (Cuadro 10). La altura de planta tiene una relación inversamente proporcional con el pH, la materia orgánica, el contenido de nitrógeno, fósforo y potasio, es decir, a mayor pH, contenido de materia orgánica y contenido de macronutrientes habrá una menor altura en las

plantas. Lo que coincide con los valores encontrados en altura de planta en Bacalar, Q. Roo.

Otra correlación alta e inversamente proporcional se encontró entre el diámetro del tallo con el pH, la materia orgánica, el contenido de nitrógeno y potasio, lo cual se vio reflejado en el menor diámetro de tallo en las plantas de Bacalar, Q. Roo. El número de hojas, número de brotes y peso fresco presento una correlación regular e inversamente proporcional con el fosforo, es decir, a mayor concentración de fosforo en el suelo menor número de hojas, número de brotes y peso fresco. Esto se pudo observar en las plantas de Bacalar, Q. Roo., donde se encontraron estas variables con lo más bajos valores.

El peso seco presentó una correlación regular inversamente proporcional con el contenido de potasio, esto se encontró en las plantas de Bacalar, Q. Roo., donde se presentó el menor peso seco y el mayor contenido de potasio.

Cuadro 10. Coeficiente de correlación (n 30) y niveles de significancia de las variables morfológicas y variables edafológicas.

	AP	DT	NH	NB	PF	PS	CHH	pH	MO	N	P	K
AP	1	.88**	.68**	.69**	.83**	.87**	-0.34	<b>-0.74**</b>	<b>-0.75**</b>	<b>-0.71**</b>	<b>-0.71**</b>	<b>-0.66**</b>
DT		1	.42*	.44*	.64**	.81**	<b>-0.53**</b>	<b>-0.78**</b>	<b>-0.78**</b>	<b>-0.79**</b>	<b>-0.49**</b>	<b>-0.80**</b>
NH			1	.98**	.95**	.64**	0.21	-0.18	-0.19	-0.10	<b>-0.56**</b>	-0.01
NB				1	.96**	.68**	0.15	-0.16	-0.17	-0.09	<b>-0.51**</b>	-0.00
PF					1	.77**	0.03	-0.39*	-0.40*	-0.33	<b>-0.63**</b>	-0.25
PS						1	<b>-0.59**</b>	<b>-0.47**</b>	<b>-0.47**</b>	<b>-0.47**</b>	-0.35	<b>-0.46**</b>
CHH							1	0.31	0.29	.39*	-0.23	.48**
pH								1	1.00**	.99**	.76**	.96**
MO									1	.99**	.77**	.96**
N										1	.68**	.99**
P											1	.58**
K												1

AP = altura de la planta, DT= diámetro de tallo, NH= número de hojas, NB= número de brotes, PF= peso fresco, PS= peso seco, CHH= contenido de humedad en la hoja, pH=potencial de hidrogeno, MO= materia orgánica, N=nitrógeno, P=fosforo, K=potasio\*\* Significancia del 1 %, \* Significancia al 5 %. Los valores en negritas se tomaron como correlaciones relevantes.

## 6.7 Contenido de esteviósidos y rebaudiósidos A

Una vez identificados los tiempos de retención de cada estándar (Figura 13), el primer glucósido en aparecer es el rebaudiósido A, en promedio en el minuto 2.21 y el esteviósido en promedio al minuto 2.35. Se tomaron los valores de las áreas de los picos de ambos glucósidos, para determinar la fórmula para la cuantificación mediante una regresión lineal (Figura 14).

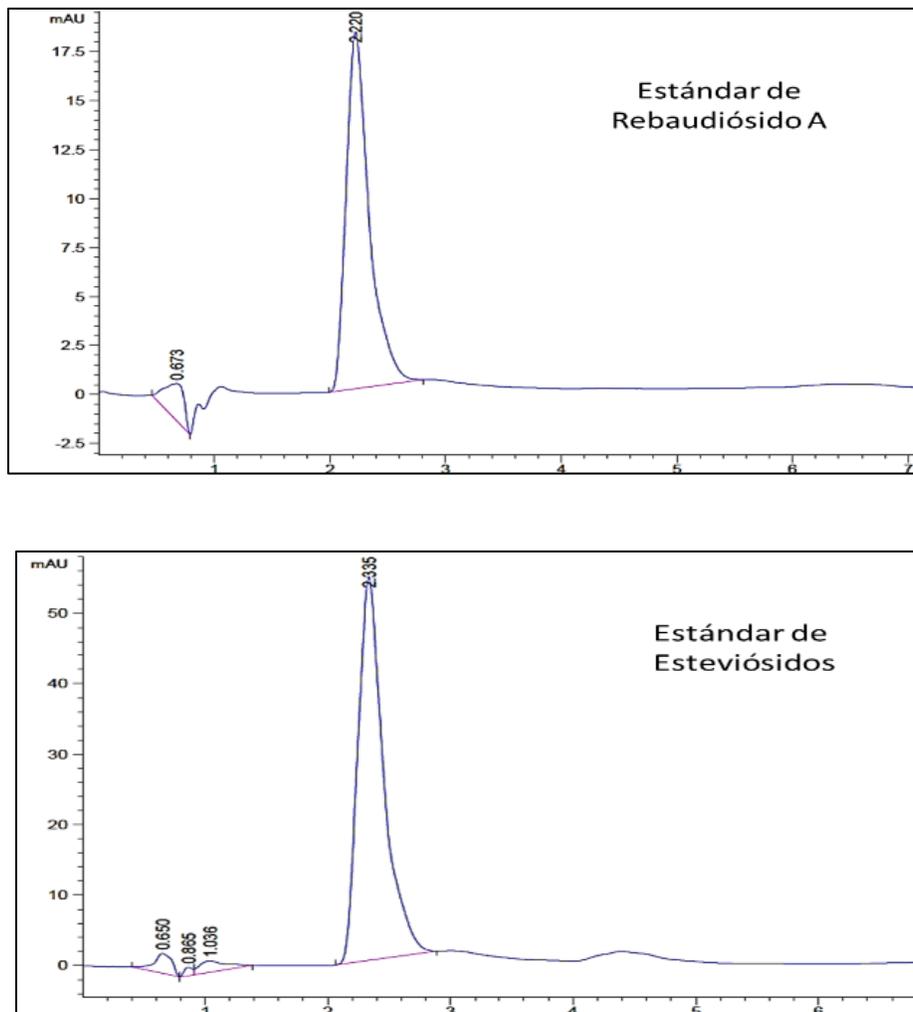


Figura 13. Cromatogramas de los estándares de esteviósido y rebaudiosido A, bajo condiciones de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con sus minutos de retención.

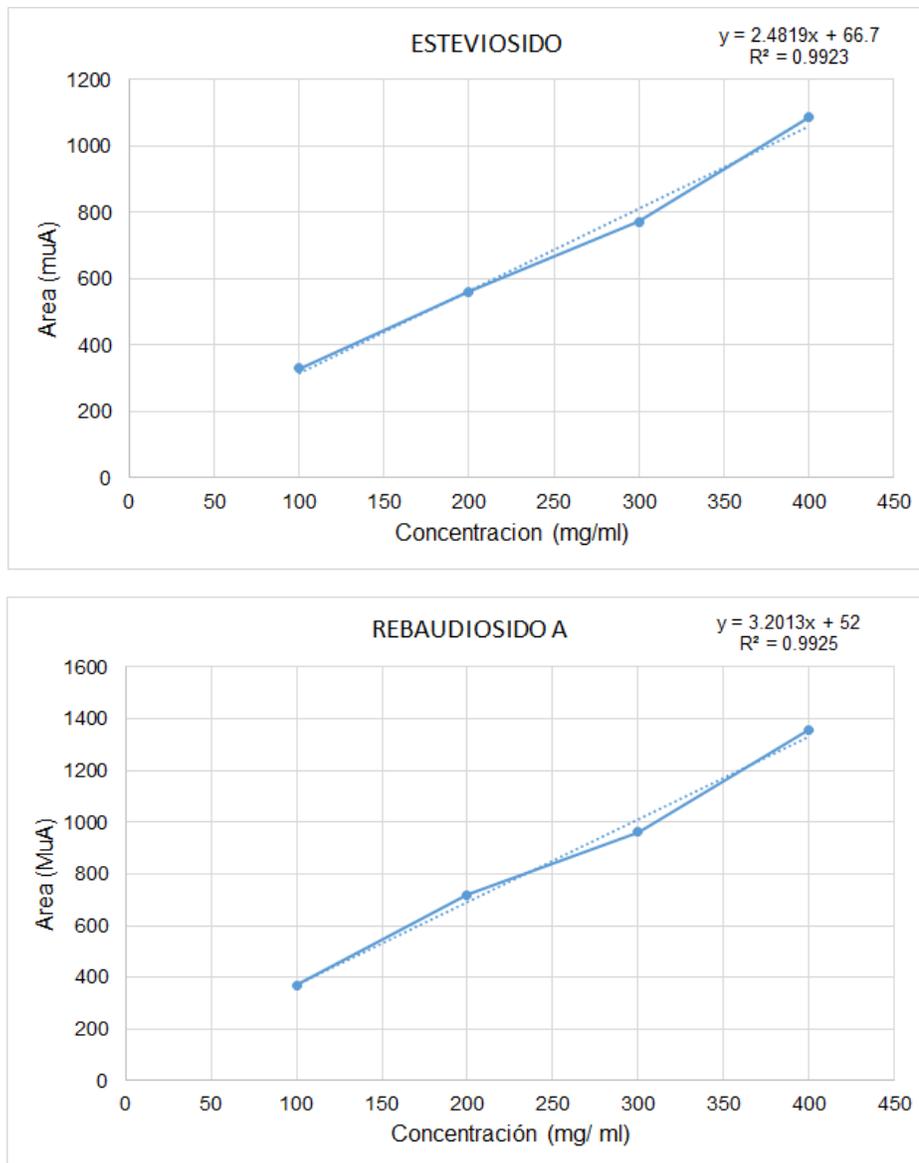


Figura 14. Regresión lineal de curvas estándares en condiciones de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para esteviosido y rebaudiósido A.

Después de obtener los cromatogramas por triplicado de los extractos de cada muestra de estevia, se determinó el área del pico de cada glucósido (Figura 15). A partir de esto se realizaron los cálculos con las formulas correspondientes, esteviósido ( $y = 2.4819x + 66.7$ ) y rebaudiósido A ( $y = 3.2013x + 52$ ), para saber el contenido de cada glucósido.

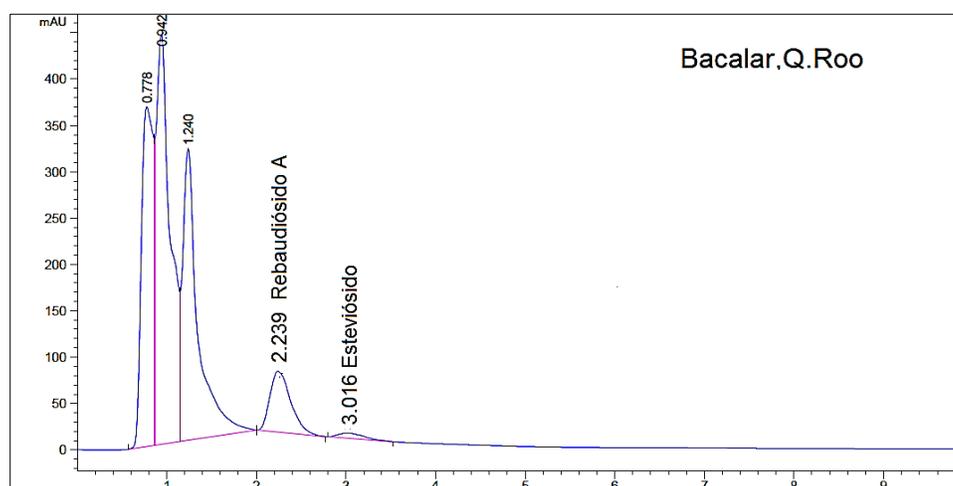
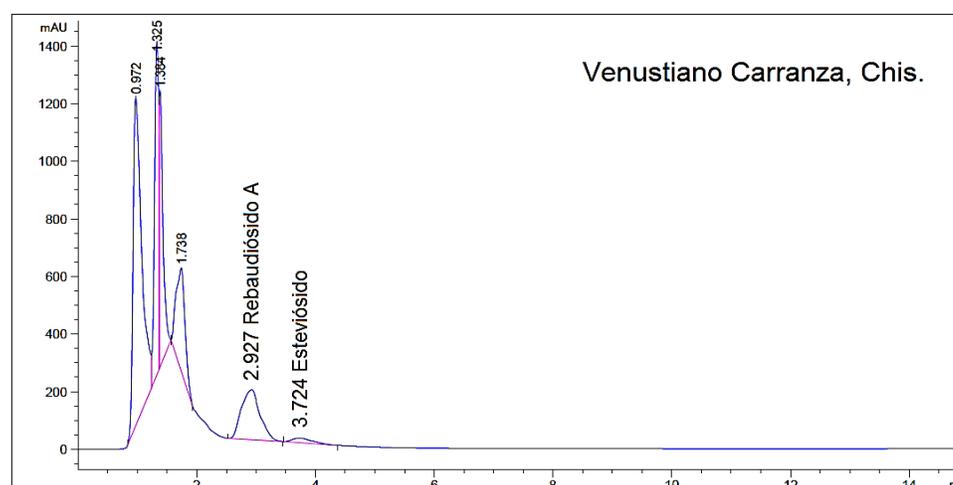
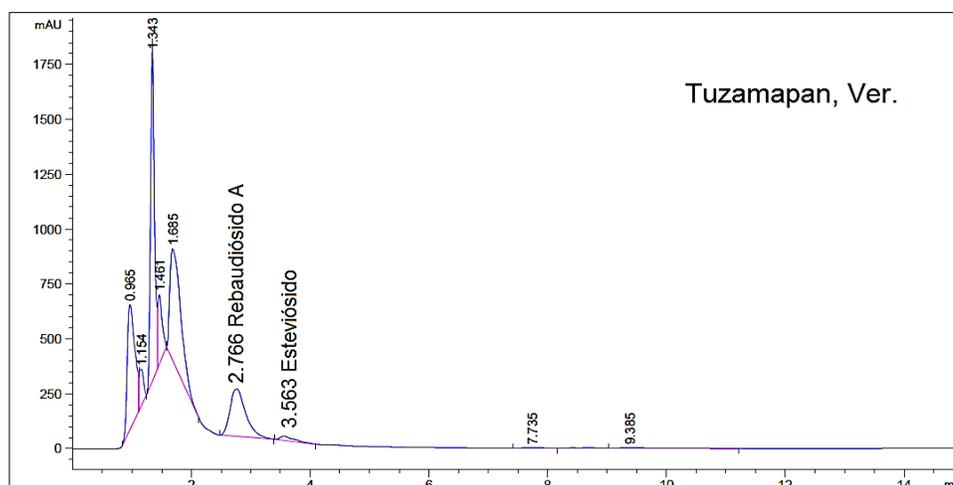


Figura 15. Cromatogramas de los contenidos de estevióside y rebaudiósido A, de las hojas de estevia en las tres localidades de estudio bajo condiciones de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

De acuerdo al análisis de varianza, en el contenido de esteviósido se encontraron diferencias estadísticas significativas entre localidades ( $P=0.0001$ ). Para el contenido de rebaudiósido A no hubo diferencia estadística entre localidades ( $P=0.7781$ ) (Cuadro 11). La prueba de medias (LS-means) para el contenido de esteviósido, ubica en el mismo nivel a Bacalar, Q. Roo. y Venustiano Carranza, Chis. y estas son superiores al contenido reportado en Tuzamapan, Ver. Para el rebaudiósido A los contenidos fueron similares entre las tres localidades.

Cuadro 11. Contenido de esteviósido y rebaudiósido A en hojas de estevia en diferentes localidades de estudio.

Localidades	Esteviósido %	Rebaudiósido A %
Bacalar	3.19±0.20 <b>a</b>	12.10±0.74 <b>a</b>
Venustiano Carranza	3.01±0.20 <b>a</b>	11.52±0.74 <b>a</b>
Tuzamapan	1.63±0.20 <b>b</b>	12.21±0.74 <b>a</b>

Los valores representan la media ± ES (Error Estándar). Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes ( $p\leq 0.05$ )

Las plantas de Bacalar, Q. Roo. y Venustiano Carranza, Chis., presentaron valores similares en el contenido de esteviósidos en comparación con lo reportado en Tuzamapan, Ver., donde se encontraron los contenidos más bajos de este glucósido; una posible explicación a estas diferencias puede tener relación con las horas luz, ya que Tuzamapan es la localidad con la menor luminosidad diaria (12.3 h). Al respecto, Jarma *et al.* (2012), mencionan que la luminosidad es el factor más importante para la síntesis de glucósidos de esteviol en la variedad Morita II. Los mismos autores reportaron aumentos de esteviósidos como una respuesta positiva de la especie a la luz. Este comportamiento podría corroborar lo reportado por Jarma, *et al.* (2008), respecto a las tasas de crecimiento y de concentración de edulcorantes que se registraron en la variedad Morita II, al cultivarse en diversidad de condiciones y de ambientes, principalmente del factor de luz solar. Resultados similares han sido reportados por Lemus-Mondaca *et al.* (2012), quienes informaron un aumento en la síntesis de esteviósidos, al aumentar la oferta de luz.

En México existen pocos trabajos donde se determinó el contenido de glucósidos de estevia., Moguel *et al.* (2011) encontraron concentraciones de esteviósido de 2.18 % y rebaudiósido A de 9.12 % en Morita II. Aranda *et al.* (2015) reportaron contenidos de 15.15 % para rebaudiósido A, y 3.97 % para esteviósidos en Morita II. Estos autores mencionan que el alto contenido de glucósidos puede tener relación con la temporada de cosecha, la radiación solar y la precipitación, sin embargo, no analizaron estas variables. González *et al.* (2014) señalaron que la variedad Morita II, cultivada en Venezuela reporto 1.91 % de esteviósido y 7.47 % rebaudiósido A; la misma variedad Morita II cultivada en Colombia tuvo 2.24 % de esteviósido y 6.95 % de rebaudiósido A. Estas variaciones en las concentraciones de los glucósidos fueron atribuidas a las condiciones edafo-ambientales de las localidades, sin embargo, no fueron analizadas.

En diez ambientes contrastantes de la India, Jaitak *et al.* (2008) encontraron que los edulcorantes de estevia presentaban valores entre 3.3 % y 6.7 % para esteviósidos y entre 1.2 % y 2.3 % para rebaudiósido A. La mayor variación en los contenidos de esteviósido, confirman el efecto del ambiente sobre la síntesis de este glucósido. Con base en estos antecedentes, se puede explicar porque se encontraron diferencias en el contenido de esteviósido en las localidades estudiadas en el presente trabajo, y similitud en el contenido de rebaudiósido A., ya que el primero es más susceptible a las variaciones de las condiciones edafo-climáticas.

Al contrastar los valores medios del contenido de glucósidos encontrados en las tres localidades, con lo que reportan otros autores, el contenido de esteviósido es de bajo a medio y en cambio el contenido de rebaudiósido A en las tres localidades fue alto. Es importante recalcar que uno de los criterios mundiales para determinar la calidad de la hoja, está dado por la cantidad de rebaudiósido A presente en esta parte de la planta, ya que los extractos considerados como más valiosos, son aquellos que tienen rebaudiósido A como el principal componente (Dacome *et al.*, 2005).

Este criterio se basa en las características organolépticas y fisicoquímicas aportadas por el rebaudiósido A ya que además de que los medios con un mayor contenido de este

glucósido presentan un mejor sabor son también más solubles en agua, lo que permite una mayor variedad de formulaciones (Brandle *et al.*,2002).

Al respecto Serfaty *et al.* (2013) explican que el contenido de glucósidos de esteviol se determina en función de su concentración en las diferentes partes de la planta y la acumulación de biomasa; sin embargo, el desarrollo fenológico, la acumulación y la distribución de biomasa son notablemente afectadas por variaciones en las condiciones ambientales.

### **6.8 Correlación entre contenido de glucósidos, altitud y variables climáticas**

El contenido de esteviósido presentó correlación significativa e inversa con la precipitación pluvial, a mayor precipitación pluvial, menor contenido de esteviósidos. Esta relación se observó en las plantas de Tuzamapan, Ver., en donde se reportó la mayor precipitación pluvial y el menor contenido de esteviósido.

Además, este mismo glucósido presento correlación significativa con horas luz, que confirma la mayor sensibilidad de este compuesto a las variaciones en luminosidad, como lo indican Ramesh *et al.* (2006), que el rendimiento de glucósidos varía de acuerdo a la duración del día, y que es mayor en días largos al compararlos con días cortos, principalmente la concentración de esteviósidos. Para el contenido de rebaudiósido A, no se observó ninguna relación con altitud o variables climáticas (Cuadro 12).

En estudios realizados con estevia variedad Morita II, Ceunen *et al.* (2012) sugieren que las condiciones ambientales, sobre todo el fotoperiodo, la radiación y la temperatura influyen considerablemente en el desarrollo fenológico de la planta, incluida la acumulación de las principales moléculas edulcorantes.

Así mismo, la edad fisiológica juega un papel importante, ya que es, en el momento entre la formación de la yema y la iniciación de la floración, donde se da un gran incremento en los contenidos de los glucósidos y esta etapa fenológica podría estar determinada por las unidades calor acumuladas, las cuales, están definidas como la diferencia entre la temperatura ambiente y la temperatura base de crecimiento de la planta (Ruiz *et al.*, 2002).

Cuadro 12. Coeficiente de correlación (n 30) y niveles de significancia, entre el contenido de esteviósido y rebaudiósido A, altitud y variables climáticas.

	STEV	REBA	ALT	PP	TMAX	TMIN	LUZ
STEV	1	-0.12	-0.1	<b>-.69**</b>	0.35	0.16	<b>.46**</b>
REBA		1	-0.1	0.11	0.06	0.09	-0.13
ALT			1	-0.25	<b>-.93**</b>	<b>-.99**</b>	<b>.68**</b>
PP				1	-0.1	0.16	<b>-.87**</b>
TMAX					1	<b>.96**</b>	<b>-.39*</b>
TMIN						1	<b>-.62**</b>
LUZ							1

STEV=esteviósido, REBA=rebaudiósido A, ALT= altitud, PP= precipitación pluvial, TMIN= temperatura mínima, TMED= temperatura media, TMAX= temperatura máxima, LUZ=luminosidad. \*\* Significancia del 1 %, \* Significancia al 5 %. Los valores en negritas se tomaron como correlaciones relevantes.

### 6.9 Correlación entre contenido de glucósidos y variables edafológicas

En el Cuadro 13 se presentan las correlaciones entre los contenidos de esteviósido y rebaudiósido A con las algunas variables físico-químicas del suelo de cada localidad. Para esteviósido se observó una correlación regular significativa, con el contenido de potasio en el suelo.

Esto coincide perfectamente con el mayor contenido de esteviósido en Bacalar, Q. Roo., y donde suelo presentó la mayor concentración de potasio. Para rebaudiósido A no se observó ningún tipo de correlación.

Al respecto, Borda-Molia *et al.* (2011) afirman que la mejor producción de glucósidos de *S. rebaudiana* se obtiene cuando el potasio está en altas concentraciones, entendiendo que este elemento es activador de diferentes procesos fisiológicos en el metabolismo de las plantas.

Cuadro 13. Coeficiente de correlación (n 30) y niveles de significancia, entre el contenido de esteviósido y rebaudiósido A y condiciones edafológicas.

	STEV	REBA	pH	MO	N	P	K
STEV	1	-0.12	0.26	0.24	0.34	-0.25	<b>.42*</b>
REBA		1	0.08	0.08	0.06	0.13	0.05
pH			1	1.00**	.99**	.76**	.96**
CE				.89**	.94**	.40*	.97**
MO				1	.99**	.77**	.96**
N					1	.68**	.99**
P						1	.58**
K							1

STEV= esteviósido, REBA= rebaudiósido A, pH=potencial de hidrogeno, MO=materia orgánica, N=nitrógeno, P=fósforo, K= potasio. \*\* Significancia del 1 %, \* Significancia al 5 %. Los valores en negritas se tomaron como correlaciones relevantes.

## 7. CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

La primera hipótesis específica indica que: La morfología de la planta de estevia, depende del manejo del cultivo y de las condiciones edafo-climáticas de las localidades en donde se encuentra cultivada. Se encontraron diferencias importantes entre localidades para las variables morfológicas, peso fresco y peso seco de hojas y rendimiento del cultivo. Se logró establecer la influencia de las diferentes condiciones climáticas sobre todo luminosidad y temperaturas y conocer las diferencias que existen en el manejo del cultivo, que impactan las variables indicadas. Con base en lo anterior, la primera hipótesis específica no se rechaza.

La segunda hipótesis específica indica que: Existen diferentes concentraciones de esteviósido y rebaudiósido A, en función de las condiciones edafo-climáticas y de manejo del cultivo. Se encontraron diferencias significativas en el contenido de esteviósido entre las localidades incluidas en el estudio, estas diferencias se pudieron asociar principalmente con la luminosidad y contenido de potasio en el suelo. Pero los contenidos estuvieron dentro de los intervalos reportados por otros autores. Para el contenido de rebaudiósido A, no se encontraron diferencias entre localidades, pero los valores están muy cercanos a los máximos reportados por otros autores, lo que indica que las condiciones climáticas y el manejo realizado favorecen la síntesis de este glucósido. Ante esta situación, la segunda hipótesis se rechaza parcialmente.

De acuerdo con la contratación de las hipótesis específicas, en relación a los principales resultados. La hipótesis general se rechaza parcialmente.

## **8. CONCLUSIONES**

Se encontraron diferencias contrastantes entre localidades de muestreo, en las variables morfológicas, por lo que se puede afirmar que las condiciones edafo-climáticas, y de manejo del cultivo, de este último la densidad de siembra, el acolchado y la fertilización, influyen en la morfología e impactan el rendimiento que varió de 5.5 a 8.4 t ha<sup>-1</sup>.

El contenido de esteviósido mostró una fuerte variación entre localidades. Estas se asociaron con mayor luminosidad y contenido de potasio en el suelo, y los mayores contenidos fueron de 3.19% en V. Carranza, Chis., y Bacalar, Q. Roo. En el caso de rebaudiósido A no hubo diferencias entre localidades y los contenidos variaron de 11.54 a 12.59 %, que se consideran altos por lo que la calidad de la hoja es buena.

En conclusión, las condiciones edafo-climáticas y el manejo del cultivo influyen en la morfología de la planta y la concentración de esteviósido, lo que indica que la síntesis de este glucósido es más sensible a la variación climática.

## **9. RECOMENDACIONES**

Se sugiere seguir analizando las zonas que presentan condiciones edafo-climáticas reportadas como favorables para el establecimiento del cultivo de estevia. Analizar el efecto de estas condiciones, junto con el manejo del cultivo, sobre la fenología de la planta, principalmente en la floración que es en donde se presenta la mayor acumulación de glucósidos en las hojas. Evaluar el contenido de glucósidos de acuerdo al número de cortes por año, para determinar en qué número de corte al año se encuentra la mayor concentración de esteviósido y rebaudiósido A.

## 10. LITERATURA CITADA

- Adorno A., M. 2016. Universidad Columbia del Paraguay. <https://www.columbia.edu.py/institucional/investigacion/articulos-de-revision/208-la-stevia-rebaudiana-en-el-comercio-internacional> (Consulta: diciembre 2018).
- Aranda, I., E. Barbosa, R. Toraya, M. Segura-C., Y. Moguel, y D. Betancur. 2014. Evaluación de la inocuidad de *Stevia rebaudiana* Bertoni cultivada en el sureste de México como edulcorante de alimentos. *Nutrición Hospitalaria* 30:594-601.
- Aranda, I., Y. Moguel, and D. Betancour. 2015. Determination of rebaudioside A and stevioside in leaves of *S. rebaudiana* Bertoni grown in México by a validated HPLC method. *American Journal of Analytical Chemistry* 6:878-885.
- Arnold C., M., y F. Osorio. 1998. Introducción a los conceptos básicos de la Teoría General de Sistemas. Departamento de antropología. Universidad de Chile. Cinta de Moebio 3: 40-49.
- Banco Mundial. 2007. World development report: Agriculture for Development. Washington, D.C. <http://siteresources.worldbank.org/> (Consulta: enero 2018).
- Bondarev, N., M. Sukhanova, O. Reshetnyak, and A. Nosov. 2003. Steviol glycosides content in different organs of *Stevia rebaudiana* and its dynamics during ontogeny. *Biology Plantarum* 47:261-264.
- Borda-Molina, D., J. Pardo-García, J. Montaña-Lara, y M. Martínez-Salgado. 2011. Influencia de la materia orgánica y *Azotobacter nigricans* en un cultivo de *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Revista Javeriana* 16: 282-293.
- Brandle, J., A. Richman, A. Swanson, and B. Chapman. 2002. Leaf ESTs from *Stevia rebaudiana*: a resource for gene discovery in diterpene synthesis. *Plant Molecular Biology* 50, 613-622.
- Brandle, J., and P. Telmer. 2007. Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry* 68: 1855-1863.

- Brandle, J., A. Richman, A. Swanson, and B. Chapman. 2005. Leaf ESTs from *Stevia rebaudiana*: a resource for gene discovery in diterpene synthesis. *Plant Molecular Biology* 50:613-622.
- Britos, R., y P. Jongdae. 2016. Ka'a he'e *Stevia rebaudiana* Bertoni: La dulce planta de Paraguay para el mundo, alternativa para la diversificación de la finca. Eds. Caacupé, Py, IPTA, CIHB, KOPIA, 2016. 116 p.
- Brunner, G. 2005. Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering* 67:21-33.
- Cassacia, J., y Z. Álvarez. 2006. Recomendaciones técnicas para una producción sustentable de Ka'a He'e (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en el Paraguay Caacupe Ministerio de Agricultura y Ganadería, Dirección de Investigación Instituto Agronómico Nacional Agrícola. Manual técnico 8. pp:51-68.
- CEDRSSA. 2018. Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. Reporte: Oportunidades para la agricultura en México: la estevia. [http://www.cedrssa.gob.mx/post\\_n-oportunidades-n\\_para\\_la\\_agricultura\\_en\\_mn-xico-la\\_n-estevia-n.htm](http://www.cedrssa.gob.mx/post_n-oportunidades-n_para_la_agricultura_en_mn-xico-la_n-estevia-n.htm) (Consulta: enero 2019).
- Ceunen, S., S. Werbrouck, and J.M. Geuns. 2012. Stimulation of steviol glycoside accumulation in *Stevia rebaudiana* by red LED light. *Journal of Plant Physiology* 169:749-752.
- Ceunen, S., and J.M. Geuns. 2013. Influence of photoperiodism on the spatio-temporal accumulation of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Plant Science* 198:72-82.
- Chan, P., B. Tomlinson, Y. Chen, J. Liu, M. Hsieh, and J. T. Cheng. 2000. A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. *British Journal of Clinical Pharmacology* 3: 215-20.
- Dacome, A., C. Da Silva, C. Da Costa, J. Fontana, J. Adelman, and S. Da Costa. 2005. Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* Bertoni:

- Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods. *Process Biochemistry* 40:3587-3594.
- Das, A., S. Gantait, and N. Mandal. 2011. Micropropagation of an elite medicinal plant: *Stevia rebaudiana* Bert. *International Journal of Agricultural Research* 6: 40-48.
- Daza, M., A. Jurado, y V. Torres. 2015. Efecto de aplicación de diferentes láminas de riego en estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) bajo invernadero. *Temas Agrarios* 20: 81-90.
- Duarte, R. 2008. Análisis de la producción del Ka'a he'ë. Agencia Financiera de Desarrollo (AFD). Asunción, Paraguay.
- Eafit (Escuela de Administración y Finanzas). 2004. Inteligencia de mercados internacionales de *S. rebaudiana*. Departamento de Negocios Internacionales, Medellin, Colombia.
- Espitia, M., R. Montoya T., y B. Atencio S. 2009. Rendimiento de *Stevia rebaudiana* Bert. bajo tres arreglos poblacionales en el Sinú medio. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 12: 151-161.
- Evangelista, L., y M. Rodríguez. 2014. *Stevia rebaudiana*, la hierba dulce de libre consumo. *Revista Hypatia* 36:49-50.
- Ferrater, J. 1979. *Diccionario Filosofía* Alianza Editorial. Madrid.
- Food and Drug Administration, 2013. GRAS Notices: Rebaudioside A purified from the leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. <http://www.accessdata.fda.gov/l> (Consulta: enero 2019).
- FUNCFOS (Fundación Colombiana para el Desarrollo y el Fomento Social). 2000. Manual de la Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) Kaá-hé-é. pp: 18-23.
- Gardana, C., M. Scaglianti, and P. Simonetti. 2010 .Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217: 1463–1470.

- Geuns, J. 2003. Stevioside. *Phytochemistry* 64: 913-921.
- Geuns, J., J. Buyse, A. Vankeirbilck, y E. Temme. 2007. Metabolism of Stevioside by Healthy Subjects. *Experimental Biology and Medicine* 232: 164-173.
- Gilabert, J., y T. Encinas. 2014. De la stevia al E-960: un dulce camino. Serie Congresos Alumnos 6: 305-311.
- González-Moralejo, A. 2011. Aproximación a la comprensión de un endulzante natural alternativo, la *Stevia rebaudiana* Bertoni: producción, consumo y demanda potencial. *Agroalimentaria* 17: 57-69.
- González, C., M. Soledad, E. Pérez, M. Dornier, y G. Morel. 2014. Caracterización de cultivares de *Stevia rebaudiana* Bertoni de diferentes procedencias. *Bioagro* 26: 79-88.
- Goyal, S., C. Samsher, and R. Goyal. 2010. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 61: 1-10.
- Guerrero, R. 2005. "Planta endulzante con mucho futuro". Diario La Prensa, Nicaragua.
- Guerrero, D., A. Bar., M. Kryvenki, y M. Domínguez. 2015. Evaluación morfológica y fenológica de 10 clones de yerba dulce (*Stevia rebaudiana*) según el tiempo térmico. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 41:317-324.
- Guevara, A., C. San Román, A. Arroyo, M. De la Luz Gutiérrez, and P. León. 2005. Characterization of the Arabidopsis clb6 Mutant Illustrates the Importance of Posttranscriptional Regulation of the Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Pathway. *Plant Cell* 17:628-643.
- Hernández, J., M. Combatt E., A. Jarma O., J. Polo S., y L. Rodríguez P. 2016. Rendimiento y calidad de hojas de *Stevia rebaudiana* Bert. bajo la oferta edafológica y dos niveles de radiación en cinco regiones de Colombia. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 19: 77 – 85.
- Herrera, C., R. Gómez, y C. González. 2012. El cultivo de estevia (*Stevia rebaudiana*) Bertoni en condiciones agroambientales de Nayarit, México. Instituto Nacional de

- Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias Centro de Investigación Regional Pacífico Centro Campo Experimental Santiago Ixcuintla. Folleto Técnico número 19, ISBN: 978-607-425-819-6.
- Hsieh, M., and H. Goodman. 2005. The Arabidopsis IspH homolog is involved in the plastid nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Plant Physiology* 138: 641-653.
- Huang, X., J. Fu, and D. Di. 2009. Preparative isolation and purification of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni using high-speed counter-current chromatography. *Separation and Purification Technology* 71: 220-224.
- IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura). 2014. La innovación en la agricultura: un proceso clave para el desarrollo sostenible. Costa Rica. [http://www.redinnovagro.in/documentosinnov/Innovaci%C3%B3n\\_PP\\_es.pdf](http://www.redinnovagro.in/documentosinnov/Innovaci%C3%B3n_PP_es.pdf) (Consulta: febrero 2019).
- Ijaz, M., A. Masood, M. Saqib, and M. Latif. 2015. *Stevia rebaudiana*: an alternative sugar crop in Pakistan- A review. *Journal of Medicinal & Spice Plants* 20: 88-96.
- Jaitak, V., A. Gupta, V. Kaul, and P. Ahuja. 2008. Validated high-performance thin-layer chromatography method for steviol glycosides in *Stevia rebaudiana*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47:790 - 794.
- Jarma, A., T. Rengifo, y H. Araméndiz-Tatis. 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: 207-216.
- Jarma, A., T. Rengifo, y H. Araméndiz-Tatis. 2006. Fisiología de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en función de la radiación en el Caribe colombiano. II. Análisis de crecimiento. *Agronomía Colombiana* 24: 38-47.
- Jarma-Orozco, A. 2008. Estudios de adaptación y manejo integrado de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.): nueva alternativa agroindustrial del Caribe colombiano. Una revisión. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 2:110-121.

- Jarma-Orozco, A. 2010. Adaptación de dos clones de *Stevia rebaudiana* Bert.) en tres ambientes del caribe colombiano. Tesis de doctorado en Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C. pp: 1-92.
- Jarma, A., C. Cardona, y C. Fernández. 2012. Efecto de la temperatura en la producción de glucósidos de esteviol en *Stevia rebaudiana* en el caribe húmedo colombiano. Rev. U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica 15: 339 – 347.
- JECFA, 2005. Esteviol glycosides. 63rd Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series 928, pp. 34-39, <http://whqlibdoc.who.int/trsll> (Consulta: septiembre 2018).
- JECFA. 2010. Compendium of food additive specifications. <http://www.fao.org/docrep/013/i1782e/i1782e.pdf>. (Consulta: febrero 2019).
- Jensen, W. 2007. The origin of the Soxhlet extractor. Journal of Chemical Education 84: 12-13.
- Jiménez, T., G. Cabrera, E. Álvarez, y F. Gómez. 2010. Evaluación del contenido de esteviosidos y rebaudiosidos A en una población de *Stevia rebaudiana* (kaâ heê) cultivada comercialmente. Estudio preliminar. Ciencias de la Salud 8: 49-53 49.
- Johansen B, O. 1993. Introducción a la Teoría General de Sistemas, Editorial Limusa, México, D.F., pp: 160-167.
- Kasahara, H., A. Hanada, T. Kuzuyama, M. Takagi, Y. Kamiya, and S. Yamaguchi. 2002. Contribution of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to the biosynthesis of gibberellins in *Arabidopsis*. Journal of Biology Chemistry 277: 45188-45194.
- Kenelly, E. 2001. Sweet and non-sweet constituents of *Stevia rebaudiana*. In Kinghorn, D. ed. The genus *Stevia*. Taylor & Francis, London. pp. 68-85.
- Kovylyayeva, G., G. Bakaleinik, I. Strobukina, V. Gubskaya, R. Sharipova, V. Alfonsov, V. Kataev, and Tolstikov, A. 2007. Glycosides from *Stevia rebaudiana*. Chemistry of Natural Compounds 43: 81-85.

- Landázuri P, A., y J. O. Tigrero. 2009. Generalidades en *Stevia rebaudiana* Bertoni, una planta medicinal. Boletín Técnico Edición Especial. Sangolquí, Ecuador. 38 p.
- Lemus-Moncada, R., A. Vega-Gálvez, L. Zura-Bravo, and A. Kong. 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Food chemistry 132: 1121-1132.
- Levitus G., V. Echenique, C. Rubintein, E. Hopp, y A. Mroginski. 2010. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Consejo Argentino para la información el Desarrollo de la Biotecnología. Argentina.
- Madan, S., S. Ahmad, G. Singh, K. Kohli, Y. Kumar, R. Singh, and M. Garg. 2010. *Stevia rebaudiana* Bertoni – A review. Indian Journal of Natural Products and Resources 3: 267-286.
- Marín, W. 2004. Sondeo de mercado de la estevia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, Colombia. pp: 15-20.
- Martínez, T. 2002. La Hierba Dulce. Historia, usos y cultivo de la *Stevia rebaudiana* Bertoni. Primera edición. Albacete, España. 2002.
- Meteoblue: Tiempo Princeton. 2018. <https://www.meteoblue.com> (Consulta: abril 2018).
- Midmore, J., and A. Rank. 2002. A new rural industry – Stevia – to replace imported chemical sweeteners. A report for the rural industries research and development corporation. RIRDC Web Publication 2:1-22.
- Moguel, O., R. Ruiz, J. Ramírez, B. Avilés, y A. García. Contenido de glucósidos en hojas de cuatro materiales de *Stevia rebaudiana* Bertoni en plantaciones establecidas en Quintana roo, México. VI Reunión Nacional de Innovación Agrícola León, Guanajuato 2011.
- Montemayor, J., J. Zermeño, J. Olague, R. Aldaco, M. Fortis, E. Salazar, J. Cruz, y C. Vásquez. 2006. Efecto de la densidad y estructura del dosel en la penetración de la radiación solar. Rev. Internacional de Botánica Experimental 75:47-53.

- Oliva, Y., A. Oleas. y J. Tigrero. 2009. *Stevia rebaudiana* Bertoni, una planta medicinal. Boletín técnico de la Escuela Politécnica del Ejército (ESPE). Sangolqui, Ecuador. 1-34.
- Orozco, C. 2004. Situación Actual de la Biotecnología en Guatemala. Consejo Nacional de Áreas Protegidas(CONAP). Documento Técnico No. 17 (06-2004).
- Pande, S., and P. Gupta. 2013. Plant tissue culture of *Stevia rebaudiana* (Bertoni): A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy* 5: 26–33.
- Pieri, V., A. Belaninc, S. Morales, and H. Stuppner. 2011. Identification and quantification of major steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* purified extracts by 1H NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:4378-4384.
- Plan Nacional de Stevia en Paraguay. 2000. Proyecto para el plan nacional de KA'A HE'E. Paraguay. Plan de Rehabilitación de Cultivo. Asunción. Paraguay. 107 p.
- Pregitzer, King. 2005. Effects of soil temperature on nutrient uptake. *Ecological Studies* 181:277-311.
- Puri, M., D. Sharma, and K. Tiwari. 2011. Downstream processing of stevioside and its potential applications. *Biotechnology Advances*, 29:781-791.
- Rank, H., and J. Midmore. 2006. Stevia an intense, natural, sweetener: laying the groundwork for a new rural industry. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. RIRDC Publication No 06/020. <https://rirdc.infoservices.com.au/downloads/06-020.pdf> (Consulta: abril 2018).
- Ramesh, K., S. Virendra, and N. Megeji. 2006. Cultivation of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: a comprehensive review. *Advances in Agronomy* 89:137-177.
- Ramírez, G. 2011. Paquete tecnológico Estevia (*Stevia rebaudiana*) establecimiento y mantenimiento. Programa estratégico para el desarrollo rural sustentable de la región sur-sureste de México: Trópico Húmedo. pp: 1- 10.
- Ramírez, G., W. Avilés B., Y. Moguel O., S. Góngora G, y C. May L. 2011. Estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), un cultivo con potencial productivo en México. Instituto

- Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Sureste. Mérida, Yucatán, México. 88 p.
- Ramírez-Jaramillo, G. 2011. Programa estratégico para el desarrollo rural sustentable de la región Sur- Sureste de México: Trópico húmedo 2011. Paquete Tecnológico Estevia (*Stevia rebaudiana*) Establecimiento y mantenimiento. pp: 1–15.
- Ramírez-Jaramillo, G., y M. Lozano-Contreras. 2016. Potencial productivo de *Stevia rebaudiana* Bertoni, bajo condiciones de riego en México. Agroproductividad 9: 76-81.
- Ramírez-Jaramillo, G., y M. Lozano-Contreras. 2017. La producción de *Stevia rebaudiana* Bertoni en Mexico. Agroproductividad 10: 84-90.
- Ramía A., N. 2002. Estudio económico para la producción y comercialización de *Stevia rebaudiana*. Proyecto de titulación de nivel profesional. Carrera de gestión de Agronegocios. Universidad El Zamarano, Zamarano, Honduras. pp: 24-31.
- Rozzi, N., y R. Singh. 2002. Supercritical Fluids and the Food Industry, Comprehensive. Reviews in Food Science and Food Safety 1:33-44.
- Ruiz C., J. A., H. E. Flores L., J. L. Ramírez D., y D.R. González E. 2002. Temperaturas cardinales y duración del ciclo de madurez del híbrido de maíz H-311 en condiciones de temporal. Agrociencia 36:569-577.
- Ruiz R., O. 2006. Agroecología: Una disciplina que tiende a la transdisciplina. Interciencia 31:140-145.
- Salazar, T. 2014. Caracterización de los sitios de cultivo potenciales en Costa Rica para la especie *Stevia rebaudiana* Bertoni. Tesis. Programa de maestría en gestión de recursos naturales y tecnologías de producción. Instituto tecnológico de Costa Rica. Pp 21-26.
- Sarandón, S. 2002. El agroecosistema: un sistema natural modificado. En: Agroecología: El camino para una agricultura sustentable. Ediciones científicas Americanas. La Plata Argentina.

- Scott, R. 2003. Principles and Practice of Chromatography. Chrom-Ed Book Series. 2003. Book 1. <http://www.chromatographyonline.org/1/contents.html> (Consulta: septiembre 2018).
- Serfaty, M., M. Ibdah, R. Fischer, D. Chaimovitsh, Y. Saranga, and N. 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.
- SIAP (Servicio de Información Agrolimentaria y Pesca). 2015. [https://nube.siap.gob.mx/cierre\\_agricola/](https://nube.siap.gob.mx/cierre_agricola/) (Consulta: mayo 2017).
- SIACON (Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta). 2017. <https://www.gob.mx/siap/documentos/siacon-ng-161430> (Consulta: en mayo 2017).
- Socolovsky, S. 2007. El rol y la seguridad de sustitutos del azúcar. *La Alimentación Latinoamericana* 271: 18-24.
- Tamura, Y., S. Nakamura, H. Fukui, and M. Tabata. 1984. Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni by stem-tips culture. *Plant cell reports* 3:183-185.
- Vázquez, L., A. Robledo, A. Muratalla, y V. Conde. 2014. Micro propagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni y detección de esteviósidos. *Bioagro* 26:49-56.
- Villa, M., y C. Chifa. 2006. Contribución al comportamiento de la “Yerba dulce” *Stevia rebaudiana* Bertoni (Asteraceae) en el Chaco argentino. Universidad nacional del Noreste. *Comunicaciones científicas y tecnológicas* 2006. Resumen: A-056
- Vergara, C., A. Jarma, J. Polo, y L. Pastrana. 2003. Crecimiento y desarrollo de dos variedades de *Stevia rebaudiana* en tres tipos de suelo del Medio Sinú. p.68. *In: Memorias XXXIII Congreso Anual de Comalfi*. Montería, Colombia.
- Vélez-Tamayo, A., y M. Hincapié-Zapata. 2005. El cultivo de la estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.). Corpoica-Centro de investigación La Selva. Rio negro-Antioquia-Colombia, Bogotá. pp 16-12.

- Woelwer-Rieck, U., C. Lankes, A. Wawrzun, and M. Wust. 2010. Improved HPLC method for the evaluation of the steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. European Food Research and Technology 231:581-588.
- Yaday, K., S. Singh, D. Dhyani, and P. Ahuja. 2011. A review on the improvement of *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Canadian Journal of Plant Science 91: 1-27.
- Yantis, M. 2011. Refrescos bajos en calorías. Nursing 29: 52-55.
- Yong-Heng, Y., H. Su-zhen, H. Yu-lin, Y. Hai-yan, and G. Chun-sun. 2014. Base substitution mutations in uridinediphosphate-dependent glycosyltransferase 76G1 gene of *Stevia rebaudiana* causes the low levels of rebaudioside A Mutations in UGT76G1 A key gene of steviol glycosides synthesis. Plant Physiology Biochemical 80: 220-225.

## 11. ANEXOS

**Anexo 1.** Muestreo de plantas y muestreo de suelo en el cultivo de estevia. Figura a), b), c), muestreo de hoja y suelo del cultivo de estevia en la localidad de Tuzamapan, Veracruz. Figura d), e), f), muestreo de hoja y suelo en Venustiano Carranza. Figura g) h), i) muestreo de hoja y suelo en Bacalar, Quintana Roo.





**Anexo 2.** Análisis de varianza (ANOVA) de algunas variables morfológicas y de contenido de esteviósido y rebaudiósido A.

**Variable dependiente: Altura**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	2	1529.624667	764.812333	20.74	<.0001
<b>Error</b>	27	995.825000	36.882407		
<b>Corrected Total</b>	29	2525.449667			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	ALTURA Mean
0.605684	16.79350	6.073089	36.16333

**Variable dependiente: Número de hojas**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	2	14788784.47	7394392.23	11.97	0.0002
<b>Error</b>	27	16679554.50	617761.28		
<b>Corrected Total</b>	29	31468338.97			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	HOJAS Mean
0.469958	31.50170	785.9779	2495.033

**Variable dependiente: Contenido de esteviósido**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	2	14.58402667	7.29201333	17.20	<.0001
<b>Error</b>	27	11.44631000	0.42393741		
<b>Corrected Total</b>	29	26.03033667			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	STEV Mean
0.560270	24.89250	0.651105	2.615667

**Variable dependiente: Contenido de rebaudiósido A**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
<b>Model</b>	2	2.7750733	1.3875366	0.25	0.7781
<b>Error</b>	27	147.9494341	5.4796087		
<b>Corrected Total</b>	29	150.7245074			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	REBA Mean
0.018412	19.59460	2.340856	11.94643

**Anexo 3.** Cuestionario aplicado a los productores de estevia en las localidades muestreadas.

## CUESTIONARIO

Fecha: \_\_\_\_\_

<b>DATOS GENERALES DEL PRODUCTOR:</b>
---------------------------------------

Nombre del productor: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

<b>UNIDAD DE PRODUCCIÓN</b>
-----------------------------

Ubicación de la localidad: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Latitud

\_\_\_\_\_

Longitud

\_\_\_\_\_

Altitud

\_\_\_\_\_

Superficie

Tenencia de la tierra: 1) Ejidal 2) Comunal 3) Pequeña propiedad

Superficie sembrada: \_\_\_\_\_ ha

Variedad cultivada: \_\_\_\_\_

<b>PRÁCTICAS DE MANEJO DE CULTIVO DE ESTEVIA</b>
--

	Fecha	No. de jornales		Costo por día			
Barbecho							
Rastreo							
Desmonte							
Tipo de fertilizante	Fecha de aplicación	Cantidad por ha	Costo	No. de jornales	Método de fertilización		

Tipo de riego \_\_\_\_\_



Realiza prácticas de almacenamiento y conservación del producto

1) Sí      2) No

Cuales:

<b>COMERCIALIZACIÓN</b>
-------------------------

Tipo de venta:	Cantidad (kg)	Precio (\$ Kg <sup>-1</sup> )	Presentación
Intermediario			
Venta por contrato			
Consumidor directo			

Observaciones generales:

**Anexo 3.** Extracción de compuestos edulcorantes de estevia para el análisis en el equipo de cromatografía líquida. Figura a), b), c), d), e). Metodología de extracción de esteviósidos y rebaudiósido A. Figura f). Equipo de cromatografía líquida para la extracción de glucósidos a través de cromatogramas.

