

Glucósidos en respuesta a dos fuentes de nutrición en *Stevia rebaudiana* Bertoni Glucosides in Response to two sources of nutrition in *Stevia rebaudiana* Bertoni

Carlos Javier Villalba Martínez¹, Rosa María López Romero^{2‡}, Antonio Trinidad Santos^{2†},
Abel Quevedo Nolasco³ y Alfonso Muratalla Lua⁴

¹ Universidad Nacional de Caaguazú. Ruta N° 8, Blas A. Garay, km 138. Coronel Oviedo. Paraguay.

² Programa de Edafología, ³ Programa de Hidrociencias, ⁴ Programa de Genética. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. 56230 Montecillo, Estado de México, México.

‡ Autora responsable (rosal@colpos.mx)

RESUMEN

La *Stevia rebaudiana* Bertoni es una planta nativa de Paraguay conocida por el dulce sabor de sus hojas, en los últimos años la superficie sembrada ha aumentado considerablemente en varios países como alternativa ante el consumo de sacarosa. El objetivo de este trabajo fue determinar la concentración de esteviósido y rebaudiosido A en hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, var. Eirete y su rendimiento con la aplicación de diferentes dosis de nitrógeno. El ensayo se llevó a cabo durante cuatro meses, como sustrato se utilizó una mezcla de suelo-tezontle (60:40%) y como fuente de nitrógeno gallinaza y lombricomposta en tres dosis: 1, 2, y 4 g N planta⁻¹. Los tratamientos se generaron de un factorial completo 3 × 2, en condiciones de invernadero en un diseño de bloques completamente al azar, con cuatro repeticiones. El riego se aplicó por goteo mediante un cálculo de evapotranspiración diaria y con los datos de temperaturas máximas y mínimas se calculó la temperatura media que se utilizó para calcular grados días desarrollo (GDD). Se realizaron 5 muestreos y se determinó: la concentración nutrimental, glucósidos, altura de la planta, brotes basales y rendimiento de hojas. De acuerdo a los resultados obtenidos el mayor rendimiento se presentó en el tratamiento donde se aplicó 4 g N planta⁻¹ de lombricomposta, se obtuvieron 9 brotes y 19 g de hoja de stevia por planta con respecto al tratamiento con gallinaza en la misma dosis donde se presentaron 3 brotes y 12 g de hoja seca planta⁻¹. La mayor concentración de esteviósido y rebaudiosido A se dio en los tratamientos con lombricomposta con

1 y 2 g N planta⁻¹ (11.1 y 12.1%, respectivamente). En las propiedades físicas del sustrato se observó una disminución del agua fácilmente disponible del inicio al final en los tratamientos con gallinaza no así en los de lombricomposta. El modelo fenológico mostró que la energía requerida para realizar la cosecha en la aparición de las flores es de 604 grados días desarrollo (GDD), aunque la mayor concentración de glucósidos se dio a los 562 GDD, información que indica que la cosecha debe hacerse en esta etapa fenológica. La utilización de la lombricomposta favorece el crecimiento vegetativo de la stevia, de acuerdo a los datos obtenidos presenta mayor concentración de esteviósido y rebaudiosido A, y es una alternativa para la fertilización orgánica de la stevia.

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

SUMMARY

The *Stevia rebaudiana* Bertoni is a plant native to Paraguay known for the sweet taste of its leaves. In recent years the area planted in stevia has increased considerably in several countries as an alternative to the consumption of sucrose. The objective of this work was to determine the concentrations of stevioside and rebaudioside A in leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni, variety Eirete, and their yield in response to application of different doses of nitrogen. The leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni, Eirete variety, were used to determine yield and concentration of stevioside and

Cita recomendada:

Villalba Martínez, C. J., R. M. López Romero, A. Trinidad Santos[†], A. Quevedo Nolasco y A. Muratalla Lua. 2018. Glucósidos en respuesta a dos fuentes de nutrición en *Stevia rebaudiana* Bertoni. Terra Latinoamericana 36: 411-421.

DOI: <https://doi.org/10.28940/terra.v36i4.318>

Recibido: enero de 2018. Aceptado: septiembre de 2018.

Publicado en Terra Latinoamericana 36: 411-421.

rebaudioside A in a nitrogen dose application assay. The assay was conducted for four months in a soil-tezontle mix (porous volcanic rock) (60:40%). Chicken manure and vermicompost as a nitrogen source were used at three doses: 1, 2, and 4 g N plant⁻¹. The treatments were generated from a complete 3 × 2 factorial array. These treatments were distributed in the greenhouse in a completely randomized block design with four replicates. Water by drip irrigation was supplied in correspondence to calculated daily evapotranspiration, and the maximum and minimum temperature data were used to obtain the mean temperature. This was used to determine growing degree days (GDD) and thus propose the phenological model. Five samplings were done to determine nutrient concentration, glucosides, plant height, basal buds, and shoot biomass. Physical characterization of the substrates was done at the beginning and at the end of the assay to observe changes in the substrate. For yield, the best response was with vermicompost, 4 g N plant⁻¹, resulting in 9 buds and 19 g stevia leaves per plant, relative to the treatment with chicken manure at the same dose, which obtained 3 buds and 12 g plant⁻¹. With regard to glucosides, the highest concentrations of stevioside and rebaudioside A were found in the treatments with vermicompost 1 and 2 g N plant⁻¹ (11.1 and 12.1%, respectively). In relation to the physical properties of the substrate, there was an observed decrease in readily available water from the beginning to the end in the treatments with chicken manure, but not in the treatments with vermicompost. The phenological model shows that the energy required to harvest time from flowering is 604 GDD, although the highest concentration of glucosides was at 562 GDD, which indicates that harvest should be carried out at this phenological stage. The use of the vermicompost favors stevia vegetative growth. In addition, according to the data obtained, it promoted higher concentrations of stevioside and rebaudioside A and is thus an option for the organic fertilization of stevia.

Index words: *estevioside, rebaudioside A, growing degree days.*

INTRODUCCIÓN

La *Stevia rebaudiana* Bertoni es una planta nativa del Paraguay, de la familia Asteraceae, utilizada por los nativos guaraníes como medicina

y endulzante tradicional (Brandle y Telmer, 2007). El sabor dulce de sus hojas se debe a compuestos no calóricos, principalmente esteviósido y rebaudiosido A, el primero tiene un ligero sabor amargo, pero se le atribuyen propiedades medicinales como antioxidante, diurético y acción hipoglicémica entre otros, en cambio el segundo es superior en términos de dulzura y en calidad de sabor, aspecto importante para las industrias de bebidas y alimentos. La stevia es un edulcorante con cero calorías e inocuo, que hace a esta planta ideal para personas diabéticas y para aquellas que desean conservar su peso. México tiene 10 millones de pacientes diabéticos (FID, 2012); entre las complicaciones reportadas por este padecimiento se tienen: visión disminuida (47.6%), daño a la retina (13.9%), pérdida de vista, úlceras, coma diabético, infarto, amputaciones y diálisis; lo anterior es preocupante porque la cifra de pacientes diabéticos se está incrementando (Gutiérrez, *et al.*, 2012). Por lo que es deseable ofrecer alternativas saludables principalmente a la población con escaso poder adquisitivo. Una alternativa es el uso de *Stevia rebaudiana* para reducir estos problemas de salud. Para producir alimentos inocuos, se requiere entre otros, el uso de abonos orgánicos, manejo de plagas, insumos no contaminados y el medio ambiente saludable. Los abonos orgánicos pueden provenir, entre otros, de residuos domésticos que se pueden compostear. Para personas con escaso poder adquisitivo el uso de estos materiales tiene un beneficio económico, ya que no sería necesario utilizar fertilizantes químicos. La información reportada en esta investigación forma parte de un proyecto general que tiene como objetivo que los pacientes diabéticos gocen de una mejor calidad de vida al tener controlado su nivel de azúcar en la sangre al consumir stevia como edulcorante.

Aunque hay abundante información sobre fertilización química en stevia con N, P y K (Carneiro, 2007; Tavarini y Angelini, 2014), las investigaciones sobre fertilización orgánica son escasas (Liu *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013). Se sabe que, con el uso de abonos orgánicos hay aumento en la concentración de glucósidos, se mejora la actividad de la raíz y se incrementa la tasa fotosintética en la etapa de crecimiento vegetativo y en consecuencia la biomasa total, este comportamiento obedece a que las fuentes orgánicas de nutrición, contienen la mayoría de los nutrientes requeridos por las plantas, además mejora la estructura física del medio de crecimiento mejorando la aireación y la retención de agua. La stevia es una planta

cuya propagación y producción está sujeta a diversos factores como el fotoperiodo, temperatura, humedad, plagas y enfermedades que dañan principalmente los tallos y las hojas, por lo que el manejo agronómico y la sanidad del cultivo son fundamentales para obtener altos rendimientos. Por lo anterior el objetivo de esta investigación fue evaluar el rendimiento y la concentración del esteviósido y rebaudiosido A en *Stevia* cultivada en invernadero con la utilización de gallinaza y lombricomposta como fuentes de nutrición.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó del 29 de mayo al 9 de agosto del 2014 en un invernadero, del Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados, localizado a 19° 53' N y 98° 53' O, a una altitud de 2250 m. La temperatura osciló entre 16 y 30 °C y la humedad relativa entre 51 y 89%, estos fueron registrados con un datta logger (HOBO U12). Se utilizaron plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni de la variedad Eirete, que se multiplicaron de manera asexual por esquejes de plantas madres, estos fueron trasplantados cuando los plantines tenían 15 cm de altura.

El suelo y los abonos que se utilizaron en el ensayo se analizaron para conocer su contenido de macronutrientes. Se consideró la tasa de mineralización anual de la gallinaza 36% y lombricomposta 20% para un período de 4.8 meses de desarrollo de la planta. Con base en el requerimiento interno de la stevia de 2 g N planta⁻¹ (Jarma *et al.*, 2010) se diseñaron seis tratamientos, de un factorial completo 3 × 2, donde 3 indica tres niveles de nitrógeno (1, 2 y 4 g N planta⁻¹), y 2, dos tipos de abono gallinaza y lombricomposta.

Estos tratamientos se distribuyeron en el invernadero en un diseño de bloques completamente al azar con 4 repeticiones. Como sustrato se usó suelo y tezontle (tamizado a 0.5 mm) en una proporción 60:40 v/v. El abono correspondiente (Cuadro 1) y el sustrato se mezclaron y depositaron en una bolsa de polietileno negra de 12 L, a la que se sembró una planta de stevia. Para promover la formación de los brotes basales en la planta se realizó la poda de uniformización una semana después de instalado el experimento. Con la finalidad de evitar la pérdida de agua y disminuir la lixiviación de los nutrimentos se aplicó riego por goteo. Mediante una tina de evapotranspiración se determinó la cantidad de agua a aplicar diariamente. Adicionalmente se adicionaron 24 macetas correspondientes al tratamiento de 2 g N planta⁻¹ de gallinaza o de lombricomposta para evaluar la concentración de glucósidos y de nutrimentos durante el desarrollo vegetativo del cultivo a los 33, 43, 53 y 63 días después del trasplante (DDT). La cosecha se realizó al comienzo de la emisión de flores, a los 73 días después del trasplante (DDT), con base en las recomendaciones agronómicas de Carneiro, 2007 y Álvarez y Casaccia, 2008. Los parámetros evaluados fueron: altura de planta, brotes basales y biomasa aérea.

Con la finalidad de desarrollar un modelo fenológico se registró con un datta logger (HOBO U12) la temperatura máxima y mínima cada hora durante el ensayo. Con la temperatura máxima y mínima se obtuvo la temperatura media diaria y con ello se calcularon los grados días desarrollo (GDD) con la siguiente fórmula:

$$GDD = \frac{T_{MAX} + T_{MIN}}{2} - T_{Base} \quad (1)$$

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos.

Tratamiento	Nitrógeno	Fuente orgánica	AO [†]	TS [‡]
	g N maceta ⁻¹		g maceta ⁻¹	kg sustrato ⁻¹
T1	1	Gallinaza	176	9824
T2	2	Gallinaza	353	9647
T3	4	Gallinaza	706	9294
T4	1	Lombricomposta	549	9451
T5	2	Lombricomposta	1099	8901
T6	4	Lombricomposta	2198	7802

[†] Abono (gallinaza o lombricomposta). [‡] Mezcla de tezontle - suelo para 10 kg.

donde: GDD = grados días desarrollo. Tmax = temperatura máxima. Tmin = temperatura mínima. Tbase = temperatura base (15 °C).

Con el GDD se determinó la energía requerida por la stevia durante el ensayo que sirvió para fijar el período de mayor concentración de glucósidos. Para evaluar el rendimiento a los 73 días de instalado el experimento, primero se contaron los brotes basales y se midió la altura de planta con un flexómetro. Posteriormente, una vez cosechada la stevia se determinó el peso fresco y el peso seco de la biomasa. Las mezclas de los sustratos correspondientes a los tratamientos T1 al T6 fueron analizadas al inicio y al término del experimento en cuanto a: densidad aparente (Da), porosidad de aireación (Pa), porosidad total (Pt), capacidad de retención de humedad (Crh) y agua fácilmente disponible (Afd).

Para los análisis químicos tanto las hojas como los tallos fueron secados a 70 °C (Heraeus), molidos (Arthur H. Thomas. U.S.A), tamizados (malla 70, 0.21 mm) y homogenizados. En tallos se determinó N, P y K. En hojas se evaluó macronutrientes (N, P, K, Mg, Ca) y micronutrientes (Fe, Zn, Cu, Mn) por digestión con HNO₃-H₂O₂ (Westerman *et al.*, 1990); el P se analizó en un espectrofotómetro (UV-Vis HP 5876, Estados Unidos) y K, Ca, Mg, Fe, Zn, Cu y Mn en un espectrofotómetro de absorción atómica (Spectra AA 220, VARIAN, Estados Unidos). La medición de N se realizó por el método micro Kjeldahl.

Se determinó esteviósido y rebaudiosido A por cromatografía de líquidos de alta resolución (Bergs *et al.*, 2012). Las técnicas de extracción de los glucósidos varían en cantidad de muestra (0.25 a 5 g), solvente (metanol (MEOH), acetonitrilo (ACN) o agua (H₂O), volumen de extractante (10 a 50 mL) y método de extracción (sonicación y extracciones con diversos agitadores y calentamiento de 60-100 °C) (Jiménez *et al.*, 2010; Woelwer-Rieck *et al.*, 2010; Bergs *et al.*, 2012; Tavarini y Angelini, 2013; Aranda González *et al.*, 2014). En esta investigación se utilizó 0.25 g de stevia para evitar diluir los extractos y disminuir el error analítico. Para la limpieza de los extractos se utilizó el método descrito por Bergs *et al.* (2012) modificando el volumen de elución. Como solvente se empleó ACN y MEOH grado HPLC (J.T. Baker, Estados Unidos), el agua utilizada fue obtenida de un sistema de purificación Simplicity® UV (Millipore; Merck, Alemania).

Para esta investigación en un agitador recíproco Eberbach (Michigan, Estados Unidos) se realizaron

pruebas preliminares para determinar el tiempo de extracción de los glucósidos, ya que la cantidad depende del sistema de extracción empleado. Para ello en tubos de polipropileno de 50 mL (Nalgene) con tapa se pesaron 0.25 g de muestra y se adicionaron 10 mL de H₂O. Las muestras se agitaron a 220 rpm por 30, 60, 90 y 120 minutos, los extractos se filtraron en papel Ahlstrom 631. La mayor cantidad de glucósidos se extrajo a los 90 min, por lo tanto las extracciones se realizaron a ese tiempo. Para la limpieza de los extractos de stevia se utilizaron cartuchos Hypersep C₁₈ de 200 mg/3mL (ThermoScientific, Bellefonte, PA, Estados Unidos). Para ello, se acondicionó el cartucho con 3 mL de MEOH y con 3 mL de H₂O. Posteriormente se agregaron 0.5 mL del extracto de hojas de stevia. Los compuestos coextraídos se eliminaron con 3 mL de agua y con 5 mL de ACN:H₂O 20:80 (v/v) y la elución de los glucósidos se realizó con 3 mL de MEOH en vez de 2 mL como lo sugiere Bergs *et al.* (2012) ya que se observó aumento en la recuperación del rebaudiosido A. El eluato se colectó en un matraz de 10 mL y se aforó con MEOH, posteriormente, parte de éste se filtró en un acrodisco GHP de 13 mm y de 0.45 µm (Pall Corporation, NY, Estados Unidos) y se colectó en viales de 1.5 mL con tapa de rosca y septo Pre-slit, los que fueron colocados en el inyector automático del cromatógrafo.

Los análisis de glucósidos se realizaron en un cromatógrafo WATERS 2956 con un detector dual UV 2487 (Massachusetts, Estados Unidos). Se empleó una columna Pinnacle II Amino (150 mm × 4.6 mm, 5 µm) y una precolumna de la misma fase estacionaria. Como fase móvil se utilizó ACN:H₂O 80:20 (v/v) a un flujo de 1 mL min⁻¹. La temperatura del horno se mantuvo a 30 ± 1 °C, y se inyectó 10 µL del eluato. Tanto muestras como estándares se inyectaron por triplicado en el cromatógrafo.

La cuantificación de los glucósidos se realizó mediante curvas de calibración externa. El esteviósido (98%) y el rebaudiosido A (96%) se adquirieron con Sigma-Aldrich Química (Toluca, México). La preparación de todos los estándares se realizó peso/peso. Se prepararon disoluciones patrón de 568 µg g⁻¹ de rebaudiosido A y de 307 µg g⁻¹ de esteviósido disueltas en H₂O y se conservaron a 4 °C. La preparación de las curvas de calibración correspondientes se efectuó a partir de las disoluciones patrones anteriores. Estos estándares se diluyeron en ACN:H₂O 80:20 y se prepararon diariamente. Para el esteviósido de 31 µg g⁻¹

a 134 $\mu\text{g g}^{-1}$ y para el rebaudiosido A de 22 $\mu\text{g g}^{-1}$ a 80 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Para evaluar la recuperación de los glucósidos se empleó al rebaudiosido A. Para ello, a partir de una disolución patrón de rebaudiosido A de 568 $\mu\text{g g}^{-1}$ se tomaron dos alícuotas de 1 mL, una se colocó en un matraz de 10 mL y la otra en un cartucho C₁₈ previamente acondicionado, se eluyó como se describió anteriormente y ambas se aforaron con MEOH, se filtraron en acrodiscos GHP antes de inyectarse al cromatógrafo y la recuperación se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Recuperación} = \frac{AE_{\text{SFE}}}{A_{\text{STD}}} 100 \quad (2)$$

donde: AE_{SFE} = Área estándar eluido por el cartucho C₁₈ (SFE, del inglés solid phase extraction). A_{STD} = Área de estándar.

En cuanto al control de calidad de las determinaciones analíticas realizadas en tallos y hojas de stevia, en el análisis de las muestras simultáneamente se incluyeron materiales de control de calidad de los Programas de Intercomparación de México (ISP-23, ISP-24), Holanda (IPE-2002 e IPE-2003) y un material de referencia certificado de hojas de espinaca (SRM 1515a) del NIST.

Respecto al Análisis estadístico, a todas las variables medidas se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) por medio del programa Statistical Analysis System software, versión 9.2 (SAS Institute Inc., 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variables Agronómicas Evaluadas

Se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre tratamientos para las variables biomasa (fresca y seca) y brotes basales, no así para altura de planta (Cuadro 2).

El mayor número de brotes basales (9) se registró en la dosis alta de lombricomposta (T6, 4 g N planta⁻¹) a diferencia del tratamiento con la misma dosis de gallinaza, que obtuvo menor cantidad de brotes (3), por la pérdida de nutrimentos debido a una rápida y alta mineralización de la gallinaza (90%). Respecto al efecto de los tratamientos sobre altura de planta, brotes basales, peso fresco y peso seco se observaron diferencias significativas en las dos últimas variables de acuerdo a la prueba de Tukey (< 0.05 de error). El peso fresco es un reflejo del número de brotes basales de la planta (Carneiro *et al.*, 2007), por lo tanto, el T6 que corresponde a una dosis alta de lombricomposta es superior a los demás tratamientos con un rendimiento de hojas secas de 19 g por planta.

Para determinar la concentración nutrimental en hojas y tallos se seleccionó el mejor tratamiento de producción de biomasa (T6 dosis alta de lombricomposta).

Los resultados del análisis foliar en hojas de la stevia (Cuadro 3), son similares a los reportados por Tavarini y Angelini (2014), en el caso de algunos nutrientes como el potasio se encuentran por debajo a los reportados por Atteh *et al.* (2011) y Jarma *et al.* (2010).

Cuadro 2. Efecto de la gallinaza y lombricomposta en la altura de planta, brotes basales, peso fresco y peso seco del cultivo de stevia.

Tratamiento	Variables				
	Nitrógeno	Altura	Brotes basales	Peso fresco	Peso seco
	g N ⁻¹	cm		g planta ⁻¹	
1.- Gallinaza	1	39a	4.0c	175c	58c
2.- Gallinaza	2	44a	7.0bc	203ba	68b
3.- Gallinaza	4	37a	3.2c	148c	48c
4.- Lombricomposta	1	45a	5.5bc	200ba	67b
5.- Lombricomposta	2	41a	8.5ab	208a	70ba
6.- Lombricomposta	4	42a	9.2a	212a	74 ^a

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas (Tukey, $P > 0.05$).

Cuadro 3. Comparación de concentración nutrimental en hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni de diferentes investigaciones.

Elemento	Datos [†] (2015)	Referencias			
		Tavarini y Angelini (2014)	Atteh <i>et al.</i> (2011)	Jarma <i>et al.</i> (2010)	Utumi <i>et al.</i> (1998)
Nitrógeno (%)	2.14	2.18	-	2.07	2.56
Fósforo	0.22	0.20	0.26	0.20	0.74
Potasio	3.39	2.25	1.73	0.99	4.36
Calcio	1.76	-	0.82		0.52
Magnesio	0.64	-	0.24		0.26
Hierro (mg kg ⁻¹)	177	-	366		-
Cobre	51	-	6		-
Zinc	38	-	20	-	-
Manganeso	370	-	30		-

[†] Resultados de esta investigación.

Igualmente, los resultados de la concentración de N, P y K en tallos de stevia pueden ser observados en el Cuadro 4, puede ilustrarse la alta concentración de potasio, resultados que coinciden con lo reportado por Tavarini y Angelini (2014).

Para determinar la concentración nutrimental durante el ciclo de desarrollo de la stevia se seleccionó el tratamiento T6 (dosis alta de lombricomposta). Para N la concentración máxima fue 3.6% en hoja a los 33 DDT y disminuye conforme transcurre el ciclo de cultivo y se estabiliza a los 63 días en 2.1% (Figura 1), a partir de esta etapa la planta detiene su crecimiento vegetativo y comienza a translocar los fotoasimilados para la floración. Comportamientos similares al N se observan en P y en K. A diferencia del Ca y el Mg que tienen un comportamiento contrario a estos (Figura 1). La menor concentración de Ca en las primeras etapas

de crecimiento vegetal y su incremento se explica porque éste va acumulándose en las paredes celulares de la planta formando pectatos de calcio y lignificando la estructura vegetal (Hanson, 1984). Respecto al Mg, el incremento se debe a que la stevia es una planta C4, por lo tanto, tiene mayor capacidad fotosintética.

Respecto a las propiedades físicas de los sustratos al inicio y final del experimento se realizó un comparativo en cuanto a la porosidad de aireación y total, la variación no fue significativamente diferente entre tratamientos; la retención de humedad, disminuyó ya que está estrechamente relacionada con el porcentaje de materia orgánica que disminuye con el tiempo por la mineralización o por la lixiviación de los abonos (Figura 2). Al respecto Hashemimajd *et al.* (2004) señalan que los abonos orgánicos incrementan la retención del agua pero su efecto se mantiene por corto tiempo. En este trabajo la disminución se atribuye a la mineralización del abono, ya que el agua se suministró apropiadamente durante todo el experimento. En relación a la densidad aparente no hubo variaciones significativas durante el experimento, sin embargo, para el agua fácilmente disponible hubo una disminución al término de la investigación en los tratamientos con gallinaza, no así en lombricomposta que incrementaron la disponibilidad de agua durante el desarrollo del estudio.

Para determinar el ciclo fenológico de stevia se utilizó la temperatura media diaria para el cálculo de los grados días desarrollo (GDD) considerando como temperatura base 15 °C. En el Cuadro 5 se

Cuadro 4. Comparación de diferentes investigaciones respecto a la concentración de N, P y K en tallos de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

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

[†] Resultados de esta investigación.

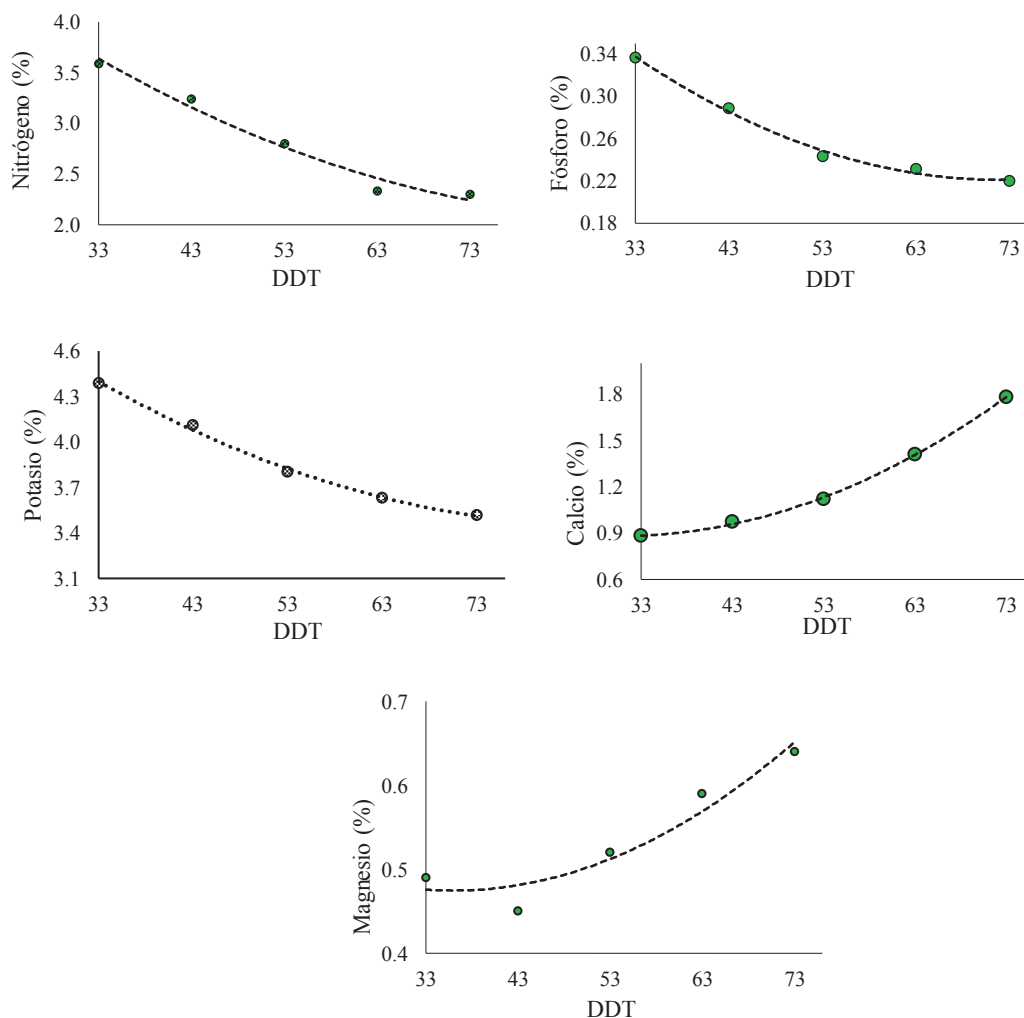


Figura 1. Concentración de N, P, K, Ca y Mg en hoja durante diferentes etapas de desarrollo de *Stevia rebaudiana* Bertoni. var. Eirete. DDT = días después del transplante.

ilustran las etapas del desarrollo de la planta con riego acumulado, la duración en días y la energía requerida para completar la etapa fenológica. Los resultados coinciden con lo publicado por Carneiro (2007) en Maringa, Brasil, y con Bonilla *et al.* (2007) en Valle del Cauca, Colombia. Los grados días desarrollo permiten tomar decisiones en diferentes condiciones ambientales, ya que, conociendo la cantidad de energía requerida por la stevia para completar su desarrollo fenológico, se pueden realizar prácticas agronómicas y planes de manejo en el cultivo independientemente del lugar donde se cultive la planta, con la finalidad de alcanzar mejores rendimientos (Hajek y Damn, 1976).

El tiempo térmico, es conocido como grados días desarrollo (GDD) y es utilizada para describir el desarrollo de cultivos, siendo la temperatura ambiental

el factor influyente en el desarrollo de las plantas (Trudgill *et al.*, 2005). En la Figura 3 se observa el resultado del desarrollo fenológico en GDD de la *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Eirete, en sus diferentes etapas, ésta es considerada una herramienta útil para la predicción de plagas y enfermedades, necesidades hídricas y fertilizantes, además para la cosecha (Gary *et al.*, 1998; Meira y Guevara, 2000).

Glucósidos

Antes de realizar la determinación de los glucósidos en hojas y tallos se evaluó la recuperación de los mismos, ésta se calculó con base en el rebaudiosido A. La recuperación de éste fue de 98.9% con un CV de 0.84% (n = 3).

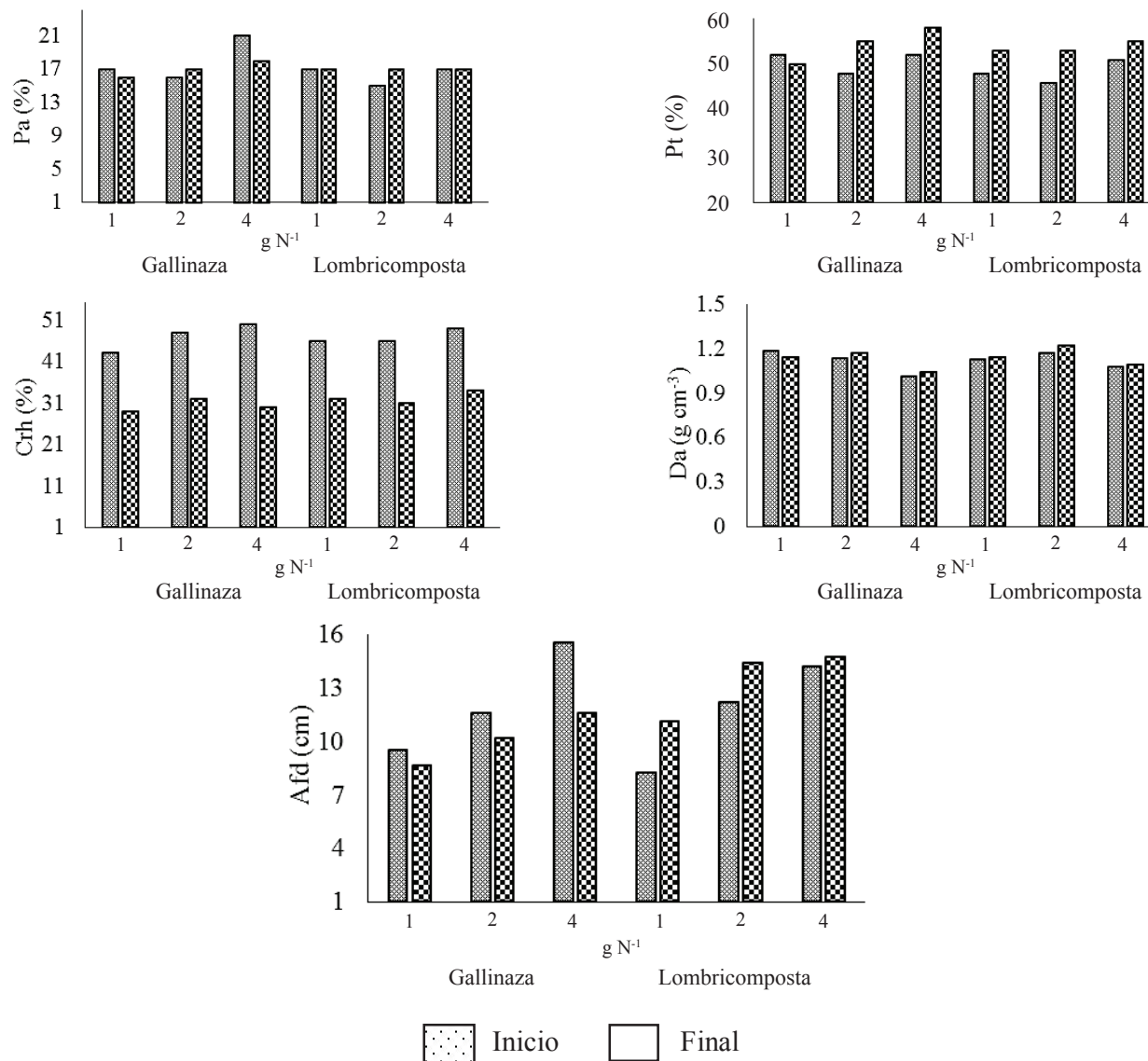


Figura 2. Características físicas de los sustratos al inicio y final del experimento: porosidad de aireación (Pa), porosidad total (Pt), capacidad de retención de humedad (Chr), densidad aparente (Da), y agua fácilmente disponible (Afd), gramos de nitrógeno por planta (g N⁻¹).

Cuadro 5. Estado fenológico de *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Eirete.

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

GDD = grados días desarrollo; Dv = desarrollo vegetativo.

La concentración de esteviósido fue significativamente diferente entre tratamientos ($P \leq 0.05$) no así el rebaudiosido A (Cuadro 6). Al comparar las dos fuentes, la lombricomposta presentó la mayor cantidad de glucósidos totales (esteviósido + rebaudiosido A), con 1 y 2 g N planta⁻¹ (T4 y T5). La fertilización orgánica en el cultivo de stevia incrementa la concentración de glucósidos, sin embargo la cantidad de esteviósido y rebaudiosido A se ven afectados por el tipo de abono orgánico (Liu *et al.*, 2011). En esta investigación la lombricomposta proporcionó mejores

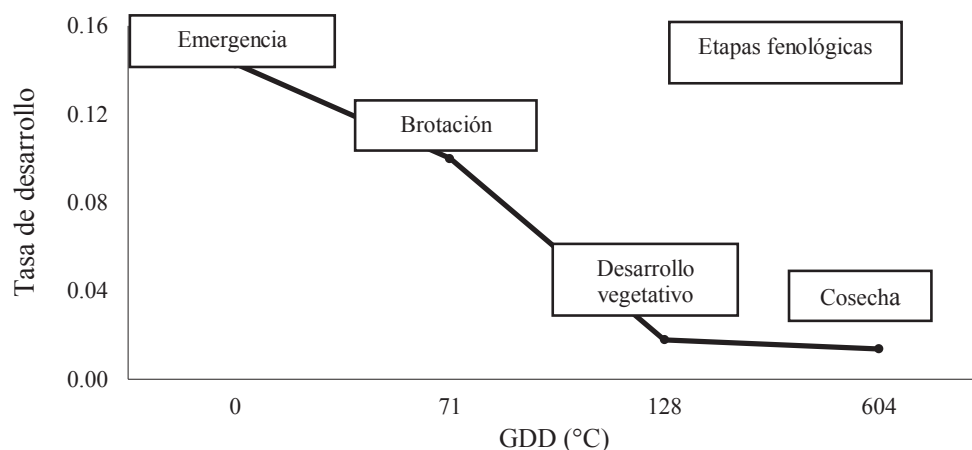


Figura 3. Fenología de *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Eirete.

condiciones para el crecimiento de esta planta, como lo demuestran los resultados en el Cuadro 6.

Jiménez *et al.* (2010), evaluaron la concentración de glucósidos en stevia y observaron que la mayor variación ocurría cuando las plantas eran reproducidas por semillas debido a la variabilidad genética. Sin embargo, cuando la propagación es asexual las diferencias fueron no significativas. Otros factores que influyen son: la altitud, estación del año y clima en donde se cultiva esta planta (Brandle y Telmer, 2007; Serfaty *et al.*, 2013). En esta investigación las variaciones en la concentración de esteviósido y rebaudiosido A, se deben a la fuente de nutrición en donde la lombricomposta fue superior estadísticamente a la gallinaza.

En el Figura 4 se muestra la relación entre la concentración de los glucósidos y los GDD durante el ciclo de cultivo de la stevia. Los datos corresponden

a los tratamientos 1 y 2 g N planta⁻¹ (dosis baja y media de lombricomposta) seleccionados por su mayor concentración de glucósidos totales. Como se observa se obtiene la mayor concentración de esteviósido y de rebaudiosido A, a los 562 GDD, y ocurre una disminución considerable en especial del esteviósido en un corto período de crecimiento. De lo anterior, si la finalidad es proveer stevia a la industria se podría cosechar la planta a los 562 GDD por haber mayor cantidad de glucósidos y ganar otro ciclo, aproximadamente 10 a 15 días para obtener la mayor cantidad de biomasa en primavera-verano por haber más horas luz. De lima *et al.* (1997) mencionan que los glucósidos en cultivos de stevia en Brasil disminuyen con la aparición de los botones florales y por esta razón la cosecha se debe realizar al momento de su aparición. Con la finalidad de obtener mayor biomasa, las recomendaciones agronómicas para realizar la cosecha de stevia son cuando aparecen

Cuadro 6. Efecto de gallinaza y lombricomposta en la concentración de esteviósido y rebaudiosido A al final del ciclo de cultivo en *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Eirete.

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

Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas (Tukey, $P > 0.05$). N = nitrógeno.

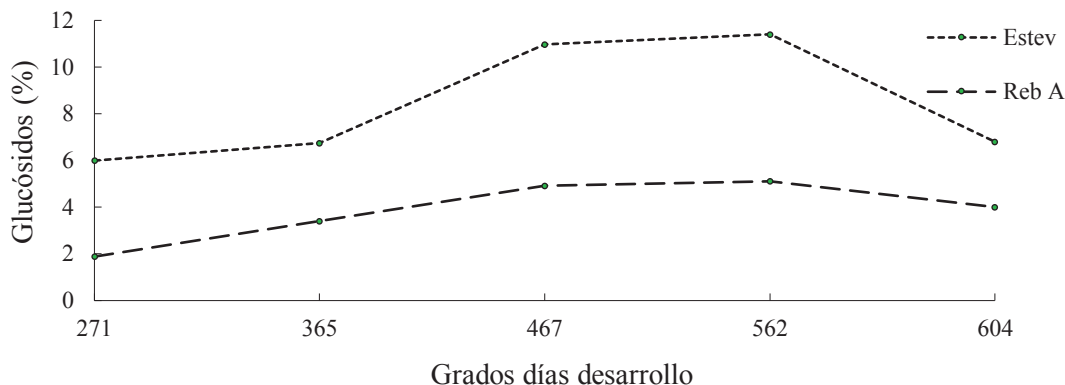


Figura 4. Concentración del esteviósido (Estev) y rebaudiosido A (Reb A), durante el ciclo de cultivo en grados días desarrollo de *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Eirete.

los primeros botones florales, (Carneiro, 2007; Lemus-Moncada *et al.*, 2010), sin embargo, con los resultados obtenidos se comprueba que en esta etapa existe una disminución considerable en especial del esteviósido.

Como se mencionó anteriormente esta investigación forma parte de un proyecto general para que los pacientes diabéticos gocen de una mejor calidad de vida al consumir stevia como edulcorante y así tener controlado su nivel de azúcar en la sangre.

Para cumplir con dicho punto se organizó en el 2015 un taller sobre stevia y otras plantas medicinales (Colpos, Campus Montecillo), para que el público aprendiera el manejo agronómico de la stevia en macetas, elaborar compostas así como el manejo alternativo de plagas.

CONCLUSIONES

La lombricomposta fue el mejor abono orgánico al crear las mejores condiciones para el crecimiento de stevia. El mejor rendimiento fue con 4 g N planta⁻¹ en el que se obtuvieron 9 brotes y 19 g de hoja de stevia por planta, en comparación al tratamiento con gallinaza con la misma dosis que se obtuvieron 3 brotes y 12 g planta⁻¹. La mayor concentración de esteviósido y rebaudiosido A, se dio en los tratamientos con lombricomposta 1 y 2 g N planta⁻¹ (11.1 y 12.1% como glucósidos totales). El modelo fenológico mostró que la energía requerida para realizar la cosecha en la aparición de las flores es de 604 grados días desarrollo (GDD), aunque, la mayor concentración de glucósidos se dio a los 562 GDD, aspecto importante porque permitiría cosechar la stevia

antes de lo realizado habitualmente. La producción de stevia con la utilización de abonos es una de las alternativas para la reutilización de los insumos que son utilizados en la finca, además eleva el rendimiento de hojas secas por hectárea y la concentración de glucósidos en las hojas.

AGRADECIMIENTOS

Carlos Javier Villalba Martínez agradece a IICA-CONACYT por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México. Los autores agradecen al Colegio de Postgraduados, el apoyo económico, otorgado para el desarrollo de la investigación a través del Fideicomiso Convocatoria 2013.

LITERATURA CITADA

- Álvarez, L. A. y R. Casaccia. 2008. Ministerio de Agricultura y Ganadería del Paraguay. Producción de Ka'a He'e. Asunción, Paraguay.
- Aranda-González, I., Y. Moguel-Ordoñez, and D. Betancur-Ancona. 2014. Rapid HPLC Method for determination of Rebaudioside D in leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni grown in the southeast of México. *Am. J. Anal. Chem.* 5: 813-819. doi: 10.4236/ajac.2014.513090.
- Atteh, J., O. Onagbesan, K. Tona, J. Buyse, E. Decuyper, and J. Geuns. 2011. Potential use of *Stevia rebaudiana* in animal feeds. *Arch. Zootec.* 60: 133-136.
- Bergs, D., B. Burghoff, M. Joehnick, G. Martin, and G. Schembecker. 2012. Fast and isocratic HPLC-method for steviol glycosides analysis from *Stevia rebaudiana* leaves. *J. Verbr. Lebensm.* 7: 147-154. doi: 10.1007/s00003-012-0760-5.

- Bonilla C., C. R., M. S. Sánchez O. y D. F. Perlaza. 2007. Evaluación de métodos de propagación, fertilización nitrogenada y fenología de estevia en condiciones del Valle del Cauca. *Acta Agron.* 53: 131-134.
- Brandle, J. and P. G. Telmer. 2007. Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry* 68: 1855-1863.
- Carneiro, J. W. P. 2007. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Stages of plant development. *Can. J. Plant Sci.* 87: 861-865.
- De Lima Filho, O. F., E. Malavolta, J. O. A. de Sena e J. W. P. Carneiro. 1997. Absorção e acumulação de nutrientes em *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: II. Micronutrientes. *Sci. Agric.* 54: 14-22.
- FID (Federación Internacional de Diabetes). 2012. Atlas de la FID 5ta edición. <http://www.idf.org/diabetesatlas>. (Consulta: agosto 30, 2013).
- Gary, C., J. W. Jones, and M. Tchamitchian. 1998. Crop modelling in horticulture: state of the art. *Sci. Hortic.* 74: 3-20.
- Gutiérrez, J. P., J. Rivera-Dommarco, T. Shamah-Levy, S. Villalpando-Hernández, A. Franco, L. Cuevas-Nasu, M. Romero-Martínez y M. Hernández-Avila. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca, Morelos, México.
- Hajek, E. R., E. Rodríguez y A. Damn. 1976. Aplicación del método de sumas térmicas para la determinación de períodos vegetativos en Chile. *Cienc. Invest. Agric.* 3: 175-180. doi: 10.7764/rcia.v3i4.531.
- Hanson, J. R. and B. H. De Oliveira. 1993. Stevioside and related sweet diterpenoid glycosides. *Nat. Prod. Rep.* 10: 301-309.
- Hashemimajd, K., M. Kalbasi, A. Golchin, and H. Shariatmandari. 2004. Comparison of vermicomposting and compost as potting media for growth of tomatoes. *J. Plant Nutr.* 27: 1107-1123. doi: 10.1081/PLN-120037538.
- Jarma O., A. J., E. M. Combatt C. y J. A. Cleves L. 2010. Aspectos nutricionales y metabolismo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Una revisión. *Agron. Colom.* 28: 199-208.
- Jiménez, T., G. Cabrera, E. Álvarez y E. Gómez. 2010. Evaluación del contenido de esteviosido y rebaudiosido A en una población de *Stevia rebaudiana* Bertoni (kaâheê) cultivada comercialmente. Estudio preliminar. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud* 8: 47-53
- Lemus-Moncada, R., A. Vega-Gálvez, L. Zura-Bravo, and K. Ah-Hen. 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chem.* 132: 1121-1132. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.11.140.
- Liu, X., R. G. Ren, and Y. Shi. 2011. The effect of organic manure and chemical fertilizer on growth and development of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Ener. Proc.* 5: 1200-1204.
- Meira, S. y E. Guevara. 2000. Uso de modelos de simulación de cultivos como herramienta para la toma de decisiones en el cultivo de soja. INTA. Buenos Aires, Argentina.
- SAS Institute. 2007. SAS-STAT user's guide 9.2. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
- 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 stand and harvest regime. *Ind. Crops Prod.* 50: 731-736.
- Tavarini, S. and L. G. Angelini. 2013. *Stevia rebaudiana* Bertoni as a source of bioactive compounds: The effect of harvest time, experimental site and crop steviol glycoside content and antioxidant properties. *J. Sci. Food Agric.* 93: 2121-2129.
- Tavarini, S. and L. G. Angelini. 2014. Crop productivity, steviol glycoside yield, nutrient concentration and uptake of *Stevia rebaudiana* Bert. Under mediterranean field conditions. *Soil Sci. Plant Anal.* 45: 2577-2592.
- Trudgill, D. L., A. Honek, D. Li, and N. M. van Straalen. 2005. Thermal time - Concepts and utility. *Ann. Appl. Biol.* 146: 1-14.
- Utumi, M. M., P. E. Monnerat, P. R. Gomes-Pereira, P. C. Rezende-Fontes e V. P. Campos-Godinho. 1999. Deficiência de macronutrientes em estêvia: Sintomas visuais e efeitos no crescimento, composição química e produção de esteviosídeo. *Pesq. Agropec. Bras.* 34: 1039-1043.
- Westerman, R. L., J. V. Baird, N. W. Chistensen, P. E. Fixen, and D. A. Whitney. 1990. Soil testing and plant analysis. Soil Science of America. Inc. Madison, WI, USA.
- Woelwer-Rieck, U., C. Lankes, A. Wawrzun, and M. Wüst. 2010. Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. *Eur. Food Res. Technol.* 231: 581-588.
- Yang, J., X. Liu, and Y. Shi. 2013. Effect of different mixed fertilizer on yield, quality and economic benefits in *stevia rebaudiana* Bertoni. *Adv. Food Sci. Technol.* 5: 588-591.