



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Centro de Desarrollo de Productos Bióticos

Fertilización, secado y obtención de esteviósidos en *Stevia rebaudiana* Bertoni

T E S I S

Que para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos

PRESENTA

Tomás Rodríguez García

Directores de Tesis

Dra. Silvia Evangelista Lozano

Dr. Mario Rodríguez Monroy



Yautepec de Zaragoza, Morelos; Noviembre 2015

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD


Con base en el artículo 57 fracción I del Reglamento de Estudios de Posgrado vigente y en la Sección IV del Código de Ética del IPN, hacemos constar que el trabajo de tesis "**Fertilización, secado y obtención de esteviósidos en *Stevia rebaudiana* Bertoni**" es responsabilidad de la **Dra. Silvia Evangelista Lozano, Dr. Mario Rodríguez Monroy y Tomás Rodríguez García**, y que ni los datos experimentales ni el texto han sido usados para obtener otro grado académico en el país o en el extranjero. Cualquier colaboración o cita textual fue declarada y reconocida en el documento.

Yautepec, Morelos; a 26 de Octubre de 2015

ATENTAMENTE



Dra. Silvia Evangelista Lozano
Director de tesis



Dr. Mario Rodríguez Monroy
Director de tesis



Tomás Rodríguez García
Alumno



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de **Yautepec, Morelos** el día **26** del mes de **Octubre** del año **2015**, el que suscribe **Tomás Rodríguez García** alumno del Programa de **Maestría en ciencias en desarrollo de Productos Bióticos** con número de registro B130121, adscrito al **Centro de Desarrollo de Productos Bióticos**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Silvia Evangelista Lozano** y el **Dr. Mario Rodríguez Monroy** y cede los derechos del trabajo intitulado "**Fertilización, secado y obtención de esteviósidos en *Stevia rebaudiana* Bertoni**", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Carretera Yautepec-Jojutla, Km. 6, calle CEPROBI No. 8, Col. San Isidro, Yautepec, Morelos, México. C.P. 62731, Apartado Postal 24. Teléfonos: (735) 394 20 20, 3941896, (55) 57 29 69 00 Ext. 82500 / 82505. Fax 82512, 82521**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Tomás Rodríguez García

Autorización de uso de obra

Instituto Politécnico Nacional
Presente

Bajo protesta de decir verdad el que suscribe **Tomás Rodríguez García**, manifiesto ser autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada "**Fertilización, secado y obtención de esteviósidos en *Stevia rebaudiana* Bertoni**", en adelante "La Tesis" y de la cual se adjunta copia, por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 fracción II, inciso b) de la Ley Federal del Derecho de Autor, otorgo a el Instituto Politécnico Nacional, en adelante El IPN, autorización no exclusiva para comunicar y exhibir públicamente total o parcialmente en medios digitales (**Tesis empastadas y discos**) "La Tesis" por un periodo de **2 años** contado a partir de la fecha de la presente autorización, dicho periodo se renovará automáticamente en caso de no dar aviso expreso a "El IPN" de su terminación.

En virtud de lo anterior, "El IPN" deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de "La Tesis".

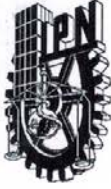
Adicionalmente, y en mi calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de "La Tesis", manifiesto que la misma es original y que la presente autorización no contraviene ninguna otorgada por el suscrito respecto de "La Tesis", por lo que deslindo de toda responsabilidad a El IPN en caso de que el contenido de "La Tesis" o la autorización concedida afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros y asumo las consecuencias legales y económicas de cualquier demanda o reclamación que puedan derivarse del caso.

México, D. F., 26 de Octubre de 2015.

Atentamente



Tomás Rodríguez García



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Yautepec siendo las 15:00 horas del día 9 del mes de Septiembre del 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CeProBi-IPN para examinar la tesis titulada:
Fertilización, secado y obtención de esteviósidos en Stevia rebaudiana Bertoni

Presentada por el alumno:

Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)							
Rodríguez	García	Tomás							
Con registro: <table border="1"><tr><td>B</td><td>1</td><td>3</td><td>0</td><td>1</td><td>2</td><td>1</td></tr></table>			B	1	3	0	1	2	1
B	1	3	0	1	2	1			

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Silvia Evangelista Lozano

Dr. Mario Rodríguez Monroy

Dra. Gabriela Sepúlveda Jiménez

Dr. Javier Solórzua Feria

Dr. Roberto Campos Mendiola

Dra. Martha Lucía Arenas Ocampo

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio



SEP-IPN
CENTRO DE DESARROLLO
DE PRODUCTOS BIOTICOS
YAUTEPEC, MOR.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Biotecnología y el Departamento de Desarrollo Tecnológico del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Silvia Evangelista Lozano y el Dr. Mario Rodríguez Monroy. Parte del trabajo se realizó en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma de Morelos bajo la supervisión de las Doctoras Ma. Yolanda Ríos Gómez y María de los Ángeles Ramírez Cisneros. El trabajo forma parte de los productos del Programa de Cooperación Técnica y Científica entre México y Costa Rica 2013-2015 dentro del proyecto “Incremento de las capacidades Biotecnológicas de México y Costa Rica, para el desarrollo de cultivos vegetales”, con el apoyo de la Secretaria de Relaciones Exteriores.

Para la realización de los estudios se obtuvo el apoyo económico de la beca CONACYT (29028) y la beca del Programa Institucional de Formación de Investigadores (20141303, 20151244). Así como de los proyectos SIP 20150061 “Propagación *in vitro* de plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni inoculadas con microorganismos en un sistema de biorreactores de inmersión temporal”, SIP 20140785 “Propagación y manejo de plantas de uso industrial” y SIP 20150446 “Herramientas técnicas para la obtención de materia prima agrícola en proyectos de investigación”.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Silvia Evangelista Lozano por la oportunidad que me brindó al trabajar a su lado y compartir gran parte de sus conocimientos y dedicación en la realización del presente trabajo. Muchas Gracias

Al Dr. Mario Rodríguez Monroy por su gran apoyo, paciencia, dedicación y por sus comentarios tan acertados en la realización del trabajo. Muchas Gracias

A los miembros del comité revisor de tesis: Dra. Gabriela Sepúlveda Jiménez, Dra. Martha Lucia Arenas Ocampo, Dr. Javier Solorza Feria y al Dr. Roberto Campos Mendiola. Por cada uno de sus comentarios, los cuales le dieron calidad al presente trabajo.

A la Maestra Sandra Escobar Arellano y Antonia De Jesús Sánchez por el gran apoyo brindado en el laboratorio.

A Uriel Guerrero y Marisela Vázquez por el apoyo brindado en el invernadero

A mis amigos y compañeros de la Maestría: Alex, Pedro, Cesar, Paola, Mina y Adri.

A Lore por ser una gran amiga y compañera en este camino de aprendizaje.

Al Instituto Politécnico Nacional y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por las becas otorgadas para mis estudios de Maestría.

DEDICATORIA

A mi esposa Maribel y mis hijos Tomás Elías y José María, por su apoyo incondicional y por ser quienes me impulsan a ser mejor cada día.

A mis padres Tomás y Nela, por ser siempre mis guías y un ejemplo a seguir.

A mis hermanos Jorge y Víctor

A la tía Susy (†)

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1 Origen y distribución de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	2
2.2 Clasificación y descripción botánica de <i>S. rebaudiana</i>	2
2.3 Condiciones ambientales de cultivo y propagación de <i>S. rebaudiana</i>	4
2.3.1 Fisiografía	4
2.3.2 Propagación	4
2.3.3 Beneficio de la propagación en invernadero	5
2.3.4 La poda de plantas	6
2.4 Fertilización de las plantas	6
2.5 Solución nutritiva para riego	9
2.5.1 Solución nutritiva universal de Steiner	11
2.6 Sistemas de secado de materiales vegetales	12
2.7 Glicósidos de <i>S. rebaudiana</i>	14

2.8	Síntesis de esteviósidos	16
3.	JUSTIFICACIÓN	18
4.	OBJETIVOS	19
4.1	Objetivo general	19
4.2	Objetivos específicos	19
5.	HIPOTESIS	19
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	20
6.1	Localización del experimento	20
6.2	Condiciones de cultivo de <i>S. rebaudiana</i>	20
6.3	Material vegetativo	20
6.4	Sustrato	20
6.5	Contenedores	20
6.6	Propagación de las plantas de <i>S. rebaudiana</i>	21
6.7	Solución nutritiva universal de Steiner	21
6.8	Manejo de cultivo de <i>S. rebaudiana</i>	22
6.9	Riegos de las plantas de <i>S. rebaudiana</i>	23
6.10	Variables evaluadas	23
6.11	Análisis de los datos	28
7.	RESULTADOS	29
7.1	Evaluación del efecto de la fertilización con solución de Steiner en el crecimiento de plantas de <i>S. rebaudiana</i>	

	Bertoni en invernadero	29
7.2	Evaluación del rendimiento de follaje en <i>S. rebaudiana</i> con diferentes métodos de secado	34
7.3	Estimación del contenido de esteviósidos en <i>S. rebaudiana</i>	37
8.	DISCUSIÓN	42
9.	CONCLUSIONES	46
10.	BIBLIOGRAFÍA	47
11.	ANEXOS	53
Anexo 1	Reactivos utilizados en la preparación de la solución universal de Steiner	53
Anexo 2	Cromatogramas de los extractos de plantas de <i>S. rebaudiana</i> , regadas con la solución de Steiner en diferentes concentraciones y de muestras secadas en secador solar y liofilizadora.	54

ÍNDICE DE CUADROS

Número	Cuadro	Página
1	Funciones de los nutrimentos esenciales en las plantas	9
2	Composición de diferentes soluciones nutritivas (ppm) usadas en hidroponía	10
3	Contenido de los glicósidos presentes en <i>S. rebaudiana</i>	15
4	Preparación de solución universal de Steiner en diferentes concentraciones a partir de soluciones madre	22
5	Respuesta del desarrollo de las plantas de <i>S. rebaudiana</i> a diferentes concentraciones de fertilización en condiciones de invernadero	31
6	Datos de colecta de follaje de plantas de <i>S. rebaudiana</i> cultivadas en invernadero. Datos de tres podas a los 40, 60 y 90 días. Las plantas fueron regadas con solución de Steiner a diferentes concentraciones	33
7	Datos de crecimiento de las plantas de <i>S. rebaudiana</i> cultivadas en invernadero. A los 90 días de riego con la solución de Steiner a diferentes concentraciones	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Figura	Página
1	Aspecto de la raíz filiforme de <i>S. rebaudiana</i> cultivada en maceta de 10 L	4
2	Estructura química de los glicósidos más abundantes en <i>S. rebaudiana</i> .	15
3	Ruta y enzimas involucradas en la síntesis del esteviol en <i>S. rebaudiana</i> Bertoni	17
4	Esquejes de <i>S. rebaudiana</i> , para plantado en charolas de 50 cavidades	21
5	A) Interior del secador tipo invernadero y B) charola de aluminio para deshidratar las hojas de <i>S. rebaudiana</i>	25
6	Secador solar para secar hojas de <i>S. rebaudiana</i>	26
7	Liofilizadora utilizada para secar hojas de <i>S. rebaudiana</i>	26
8	Plantas de <i>S. rebaudiana</i> a los 20 días después del trasplante a maceta, con dos riegos de solución universal de Steiner	29
9	Plantas de <i>S. rebaudiana</i> a los 40 días, regadas con solución de Steiner a diferentes concentraciones	30
10	Hojas de <i>S. rebaudiana</i> regadas con diferentes concentraciones de solución de Steiner	31
11	Pérdida de peso de hojas de <i>S. rebaudiana</i> de los	

	diferentes riegos con la solución Universal de Steiner a diferentes concentraciones, en secador tipo invernadero a una temperatura de 45 °C	35
12	Pérdida de peso de hojas de <i>S. rebaudiana</i> de los diferentes riegos con la solución Universal de Steiner a diferentes concentraciones, en secador solar a una temperatura de 43 °C.	36
13	Cromatogramas de los estándares utilizados: a) Esteviósido y b) Rebaudiósido A	38
14	Cromatograma de los extractos de plantas de <i>S. rebaudiana</i> , regados con la solución de Steiner en diferentes concentraciones y de muestras secadas en el secador tipo invernadero	39
15	Contenido de esteviósidos en hojas de <i>S. rebaudiana</i> sometidas a diferentes condiciones de secado y fertilización con la solución de Steiner	41

Resumen

Stevia rebaudiana es una planta originaria de Paraguay y conocida como Ka'á he'é, que quiere decir "hierba dulce". Sus hojas tienen un intenso sabor dulce, propiedad que se debe al contenido de nueve glicósidos. La producción de los esteviósidos en la planta, al igual que la de otros metabolitos, puede estar influenciada por las condiciones de propagación y del manejo del cultivo. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto de la fertilización en el desarrollo de plantas de *S. rebaudiana* y las condiciones de secado sobre la producción de esteviósidos. La propagación de *Stevia* se llevó a cabo a través de esquejes bajo condiciones de invernadero, las plantas fueron regadas con diferentes concentraciones de la solución nutritiva universal de Steiner (control 0, 25, 50, 75 y 100%). Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con solución Steiner al 50% fue el que favoreció los valores más altos de diámetro del tallo, distancia intermodal y área foliar. Los datos de tres cosechas de follaje de las plantas de *S. rebaudiana* regadas con la solución nutritiva universal de Steiner al 50 %, generaron 6 veces más ganancia de peso, que las hojas regadas con agua (control). Sin embargo, el contenido específico estimado de los esteviósidos en las hojas disminuyó con el empleo de los riegos con la solución nutritiva universal de Steiner. Así mismo, se compararon dos métodos de secado de las hojas de *S. rebaudiana* (secador solar y un secador tipo invernadero). Los resultados de la cinética de secado indicaron que el secador tipo invernadero fue el más rápido que el secador solar, debido a las altas temperaturas alcanzadas.

Abstrac

Stevia rebaudiana is a plant native of Paraguay and is known as Ka´a he´e, which means “sweet herb”. Its leaves have an intense sweet flavor, attributed to content of nine glycosides presents. The production of steviosides in the plant, like other metabolites, can be influenced by propagations conditions and the crop management. The aim of the present study was to analyze the fertilization effect on development of plants of *S. rebaudiana* and the conditions drying over steviosides production. Stevia propagation was carried out through cuttings under greenhouse conditions, plants were treated with different concentrations of the universal nutrient solutions of Steiner (control 0, 25, 50, 75 and 100%). The results showed that treatment with 50% solution Steiner was favoring the highest values of stem diameter, leaf area and intermodal distance. The data from three crops foliage *S. rebaudiana* plants irrigated with nutrient solution universal Steiner 50%, generated 6 times more weight gain, which leaves irrigated with water (control). However, the stevioside content in the leaves decreased when the plant were irrigation with universal Steiner nutrient solution. Also, two methods to dry the leaves of *S. rebaudiana* (solar greenhouse dryer and dryer) were compared. The results of the drying kinetics indicated that the greenhouse dryer was faster than the solar dryer, due to the higher temperature reached.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la industria alimentaria y farmacéutica tienen interés por la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni, esto debido a su poder edulcorante sin aporte de calorías. El sabor dulce de la planta se debe principalmente a los compuestos químicos denominados de forma genérica como esteviósidos. China es el principal productor de *S. rebaudiana* y Japón y Corea los países con mayor consumo, donde es utilizado como edulcorante en bebidas y en la industria alimentaria.

S. rebaudiana es una planta perenne, de la familia Asteraceae, originaria del noreste de Paraguay, en los límites con Brasil, donde crece en estado silvestre. Ésta planta era usada por los indios guaraníes para endulzar bebidas y mezclarla con otras plantas, además es conocida en su dialecto como Ka'á He'e o hierba dulce.

Las hojas de *S. rebaudiana* en estado fresco son 15 veces más dulces que el azúcar común y secas son hasta 30 veces más dulces, sus principales compuestos activos son el esteviósido y rebaudiósido A. El extracto puro de estos compuestos, posee un poder endulzante que varía de 100 a 400 veces mayor que la sacarosa. Su capacidad endulzante ha conducido a considerarla como una alternativa para reemplazar a los edulcorantes sintéticos. Al consumir *S. rebaudiana* los niveles de azúcar sanguíneo no se ven afectados, existen reportes que demostraron sus propiedades hipoglucémicas y por eso es recomendado para los pacientes diabéticos. El cultivo de la *S. rebaudiana* es considerado como una alternativa rentable para muchos países y los reportes relacionados a sus atributos son abundantes. Sin embargo, son escasos los reportes en cuanto al manejo de la planta, la nutrición, podas, vida útil y sistemas de secado. Por esta razón en el presente trabajo se planteó el objetivo de analizar el efecto de la fertilización con solución universal de Steiner en el desarrollo de plantas de *S. rebaudiana* Bertoni cultivada en invernadero, además de determinar el tipo de proceso de secado del material vegetal más conveniente para la obtención de los esteviósidos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Origen y distribución de *Stevia rebaudiana* Bertoni

La *S. rebaudiana* es una planta herbácea, nativa de la región de Amambay en el Noreste de Paraguay (Brandle y Telmer, 2007), donde las tribus guaraníes, endulzaban tés de la yerba mate, así como también la usaban en los alimentos y como planta medicinal para tratar problemas de ardor de estómago (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012). *S. rebaudiana* es conocida por las tribus guaraníes como *Ka'á He'é* que quiere decir "hierba dulce" (Yadav *et al.*, 2011).

El cultivo de *S. rebaudiana* se ha extendido en diversas partes del mundo como: Malasia, Singapur, Corea del Sur, Taiwán, Tailandia, Brasil, Colombia, Argentina y el mayor productor es China con una superficie sembrada de aproximadamente 13,400 hectáreas y produce cerca de 40,000 toneladas de materia seca (Brandle *et al.*, 1998; Chatsudthipong y Muanprasat, 2009).

En México, *S. rebaudiana* se cultiva en los estados de Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo (Ramirez, 2011).

2.2 Clasificación y descripción botánica de *S. rebaudiana*

S. rebaudiana fue clasificada botánicamente en 1899 por Moisés Santiago Bertoni, inicialmente era llamada *Eupatorium rebaudianum*, pero en 1905 su nombre botánico cambió a *Stevia rebaudiana* Bertoni (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012).

El género *Stevia* tiene alrededor de 230 especies (Brandle y Telmer, 2007) y pertenece a la familia de las Asteraceae.

Clasificación Taxonómica de *S. rebaudiana*

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Stevia*

Especie: *Stevia rebaudiana* Bertoni

Sinonimia: *Eupatorium rebaudianum* (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012)

S. rebaudiana es una planta de hábito de crecimiento herbáceo que llega a crecer hasta un metro de altura en su forma silvestre (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012); la raíz es fibrosa (gran número de raíces finas), filiforme (carecen de una raíz principal) perenne (tipo de raíz en que la parte aérea puede morir aparentemente y después brota nuevamente la planta) y no profundiza, se distribuye cerca de la superficie (Figura 1). El tallo es leñoso (suberizado) y pubescente en la parte inferior (Yadav *et al.*, 2011). La ramificación inicia con un líder central, a más de 40 cm de altura ramifica, las ramas son opuestas, y de acuerdo al sistema de poda es como la planta se desarrolla (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012).

Las hojas son opuestas de 3 a 4 cm de largo, son sésiles (hojas unidas al tallo con el pedúnculo muy corto), lanceoladas (alargadas) y con borde aserrado o dentado (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012). La flor es hermafrodita pequeña y blanca en capítulos (en grupos), pequeñas terminales (se desarrollan en la parte terminal de las ramas) o axilares (se desarrollan en los meristemas laterales entre el tallo y una rama) (Shock, 1982). Los frutos son aquenios (fruto seco que contiene una sola semilla, cuya envoltura externa no está soldada a la misma); el aquenio mide aproximadamente 3 mm de longitud, las semillas fértiles son color oscuro, mientras que las estériles son pálidas o claras (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012).



Figura 1. Aspecto de la raíz filiforme de *S. rebaudiana* cultivada en maceta de 10 L

2.3 Condiciones ambientales de cultivo y propagación de *S. rebaudiana*

2.3.1 Fisiografía.

Stevia rebaudiana Bertoni se desarrolla en altitudes entre 500 a 3 000 msnm (Puri *et al.*, 2011) en clima semi-húmedo subtropical, con temperatura que va desde -6 a 43 °C y en promedio de 23 °C, con precipitación de 1500 a 1800 mm por año (Yadav *et al.*, 2011). La humedad ambiental debe ser menor a 85% de humedad relativa. En suelo areno-arcillosa, francos y franco-arenosos, con proporción de humus regular, se adapta bien a suelos con buen drenaje, no así en lugares con exceso de humedad; a un pH entre 6.5 a 7.5 (Ramirez, 2011); es una planta de día corto con una duración crítica de 12 a 13 h (Ceunen y Geuns, 2013).

2.3.2 Propagación

La propagación sexual en *S. rebaudiana* implica intercambio de caracteres importantes, como los niveles edulcorante y de composición (Taware *et al.*, 2010). El porcentaje de germinación de sus semillas es menor al 5% (Puri *et al.*, 2011). Por lo que éste método no es recomendado para su utilización a nivel comercial.

Alternativamente la propagación vegetativa puede realizarse con la ventaja de poder utilizar cualquier parte de la planta y obtener nuevos individuos con las características distintivas de la planta madre (Oliva *et al.*, 2009). El uso de esqueje es una forma usual para propagar plantas. El esqueje es una fracción de la parte terminal de la rama pero que debe tener características de madurez para un crecimiento y enraizamiento adecuado. 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 (Oliva *et al.*, 2009); además de contar con las condiciones para el enraizamiento de los esquejes. A este respecto Ingle y Venugopal (2009) probaron el uso del ácido indol butírico (IBA) y ácido naftalen acético (ANA) para inducir el enraizamiento en los esquejes de *S. rebaudiana*. Los autores reportan que el IBA a una concentración de 400 y 500 ppm induce un enraizamiento del 90 y 92 % y un crecimiento radicular de 14.05 y 11.55 cm, respectivamente. Este resultado fue mejor que el obtenido con el tratamiento sin reguladores de crecimiento, en donde se obtuvo un porcentaje de enraizamiento del 70 % y una longitud de raíces de 6.23 cm.

2.3.3 Beneficio de la propagación de las plantas en invernadero

Un invernadero es una estructura cerrada, cubierta por materiales como plástico blanco o transparente, dentro de la cual es posible obtener condiciones artificiales de microclima y con ello cultivar plantas en condiciones óptimas y fuera de temporada. El invernadero es el sistema más simple y económico, para captar energía solar en favor del desarrollo de las plantas.

El intervalo de temperatura recomendable para crecer plantas en invernadero es de 10 a 30 °C con una diferencia de 5 a 7°C entre la temperatura diurna y nocturna para lograr una condición benéfica para las plantas. Algunas de las funciones de los invernaderos son: facilitan el cultivo, la propagación y protección de las plantas, ya

que permiten regular la temperatura, la humedad del aire y la intensidad de luz (Miserendino y Astoquizaga, 2014).

2.3.4 La poda de plantas

La poda es una técnica de cultivo avanzado que se utiliza para obtener una mayor producción de plantas (Jaimez *et al.*, 2002). Esta práctica limita la altura y permite el desarrollo de ramas laterales, con ello las hojas aprovechan de mejor forma la luz disponible. Los beneficios de la poda son evidentes siempre que se realice de forma adecuada y se elija la técnica que mejor se adapte a las necesidades de la planta.

Como una norma para plantas de porte bajo, la primera poda se realiza cuando la planta tenga un mínimo de 6 nudos. La poda apical consiste en cortar el ápice superior, también denominado líder central; con esto se permite la brotación lateral, se aumenta el número de ramas y se estimulan las yemas laterales (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012).

2.4 Fertilización de las plantas

El ambiente que rodea a una planta influye en su desarrollo, entre los factores que determinan un ambiente se pueden citar el suelo y/o sustrato, los nutrientes que se suministran en el agua de riego, precipitación pluvial, luz, temperatura, humedad relativa, plagas y enfermedades. Estos factores pueden ocasionar variaciones en la composición química de las plantas y por ende en su desarrollo, aunque también es necesario cuidar las prácticas de manejo del cultivo. Un sustrato para el cultivo de plantas debe ser poroso, se sugiere que una mezcla de turba, arena y hojarasca, puede ser conveniente para el establecimiento de plantas en maceta (Ramírez, 2011).

Tavarini *et al.* (2015) demostraron el efecto de diferentes dosis de nitrógeno (0, 50, 150 y 300 kg N/ha) y tiempo de cosecha en plantas de *S. rebaudiana*, sobre la producción de glicósidos, flavonoides y antioxidantes. Estos autores reportan que el máximo contenido de esteviósidos se obtuvo en plantas sin ningún tratamiento de nitrógeno ($6.47 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), pero el mayor contenido de rebaudiosido A se obtuvo en

plantas fertilizadas con 150 y 300 kg N/ha con 3.88 y 3.75 mg•g⁻¹, respectivamente. Así mismo, el contenido de flavonoides se vio favorecido con dosis de 150 kg N/ha, con valores de 104.03 mg•g⁻¹. Estos resultados sugieren que la manipulación de nitrógeno puede ser una manera de aumentar los metabolitos secundarios en *S. rebaudiana*.

Ma y Shi (2011) reportan el efecto de la fertilización en *S. rebaudiana* con diferentes dosis de potasio (0, 60, 90, 120 y 150 kg/ ha), los resultados mostraron que el tratamiento de 120 kg/ha favoreció a las plantas de *S. rebaudiana*, obteniendo un contenido de clorofila de 3.01 mg/g⁻¹; asimismo, tuvo un efecto favorable en la actividad de la enzima nitrato reductasa (NR); involucrada en la asimilación del nitrógeno con 6.02 μmol (NO₂⁻¹)/ g¹ min¹. Además también midieron el efecto del potasio sobre la actividad de la raíz, en el que demostraron que el nivel más alto de la actividad se presentó en el tratamiento con 120 kg/ha, el cual fue de 1.5 veces mayor que el control. Con dichos resultados los autores mencionan que una dosis adecuada de potasio en plantas de *S. rebaudiana* favorece el aumento de la tasa fotosintética, promueve la actividad de la raíz, además de aumentar la resistencia al estrés.

Liu *et al.* (2011), compararon el uso de fertilizantes químicos contra el uso de abono orgánico sobre el desarrollo de la planta de *S. rebaudiana* y el contenido de glicósidos. Observaron que a los 80 días después de tratamiento, las plantas tratadas con abono orgánico presentaron un diámetro del tallo de 0.95 cm, con rendimiento en peso seco de 65.9g/ planta y contenido de glicósidos de 14.63% Estos resultados fueron mejores con el obtenido en plantas tratadas con fertilizante químico, donde se obtuvo un diámetro de tallo de 0.9 cm, rendimiento de peso seco de 60.7 g/planta y 13.38 % en el contenido de glicósidos.

Como una alternativa en la fertilización química, Das *et al.* (2007) reportan la utilización de bacterias, como biofertilizantes en plantas de *S. rebaudiana*. Los autores evaluaron el uso de bacterias solubilizadoras de fósforo (PBS), *Azospirillum*

y una micorriza vesículo - arbuscular, observando que las plantas tratadas con la combinación de las dos bacterias y la micorriza incrementa en 60 % la producción de biomasa en comparación con el testigo sin bacterias. Asimismo, las bacterias favorecen la nutrición en las hojas, mejorando el contenido de nutrientes en las siguientes proporciones nitrógeno 55.14 %, fósforo 193.78 % y potasio 60.41. El estudio demostró que es deseable el uso de las bacterias y el hongo para lograr un efecto sinérgico por consorcio en el desarrollo de *S. rebaudiana*.

Navarro y Navarro (2003) mencionan que los vegetales se componen de entre el 94 y 99.5 % de hidrógeno, carbono y oxígeno. Las plantas obtienen el hidrógeno, directa o indirectamente del agua del suelo, mientras que el carbono y el oxígeno lo obtienen del aire por medio del proceso de fotosíntesis. El resto del peso seco de una planta (0.5 a 6 %) son otros elementos químicos, involucrados directamente en el metabolismo y son componentes estructurales, activadores enzimáticos o constituyentes de enzimas, todos son elementos o nutrimentos esenciales (Cuadro 1).

Los reportes acerca de la fertilización en *S. rebaudiana* y su posible efecto en la acumulación de esteviósidos, son aún limitados. Ramirez (2011) reporta que para fertilizar *S. rebaudiana* se puede usar la siguiente fórmula: 180 kg·ha⁻¹ de nitrógeno (N), 60 kg·ha⁻¹ de potasio (K) y 92 kg·ha⁻¹ de fósforo (P), pero señala que una fertilización inadecuada, puede conllevar a obtener rendimientos de producción de hoja seca bajos. Por otra parte las deficiencias de nitrógeno pueden causar disminución en el crecimiento y desarrollo, principalmente en hojas, el órgano de interés comercial. El fósforo forma parte esencial de muchos glucofosfatos como la uridin difosfato glucosa (UDP-glc) molécula donadora de glucosa en la síntesis de los glucósidos de diterpeno entre otros procesos metabólicos. También, deficiencias de potasio, pueden ocasionar reducción en el número de ramas por planta (Jarma *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Funciones de los nutrimentos esenciales en las plantas

Nutrimentos	Funciones
Nitrógeno (N)	<ul style="list-style-type: none">• Forma parte de todas las proteínas, estructura de la clorofila y otros pigmentos.• Forma parte de los ácidos nucleicos, NADH₂, porfirinas, coenzimas y varios metabolitos secundarios.
Fósforo (P)	<ul style="list-style-type: none">• Forma parte estructural de los ácidos nucleicos y fosfolípidos.• Participa en la fotosíntesis, almacenamiento y transferencia de energía.
Potasio (K)	<ul style="list-style-type: none">• Acelera la madurez de tejidos y la formación de semillas.• Activa enzimas en el metabolismo de proteínas y carbohidratos.• Participa en la fotosíntesis.• Aumenta la resistencia a fitopatógenos.• Aumenta la calidad de frutos y controla la turgencia de las células especializadas.
Calcio (Ca)	<ul style="list-style-type: none">• Participa en el crecimiento (mitosis).• Aumenta la resistencia contra enfermedades.• Aumenta la rigidez de las células.• Es activador de enzimas (amilasas, ATP-etas).
Magnesio (Mg)	<ul style="list-style-type: none">• Es activador enzimático en el metabolismo de carbohidratos y síntesis de ácidos nucleicos.• Forma parte de la clorofila y varias proteínas.• Participa en la respiración.
Azufre (S)	<ul style="list-style-type: none">• Participa en la síntesis de aminoácidos, proteínas y vitaminas.• Participa en la fotosíntesis.
Zinc (Zn)	<ul style="list-style-type: none">• Activa enzimas y participa en la biosíntesis del ácido indol-3-acético.
Hierro (Fe)	<ul style="list-style-type: none">• Participa en la síntesis de clorofila, en la fotosíntesis; también en la síntesis de proteínas.
Cobre (Cu)	<ul style="list-style-type: none">• Participa en la respiración, transferencia de energía y fijación de N.• Participa en la fotosíntesis y activa enzimas como fenolasas, citocromo oxidasa.
Manganeso (Mn)	<ul style="list-style-type: none">• Participa en el crecimiento y reproducción.• Es activador de enzimas envueltas en el ciclo de Krebs y en la síntesis de proteínas.
Boro (B)	<ul style="list-style-type: none">• Participa en la floración, formación de semillas, translocación de azúcares y síntesis de proteínas.
Cloro (Cl)	<ul style="list-style-type: none">• Interviene en la fotólisis del agua en la fotosíntesis.• Conjuntamente con el K⁺, mantienen la turgencia de las células.
Molibdeno (Mo)	<ul style="list-style-type: none">• Participa en la reducción de nitratos.
Níquel (Ni)	<ul style="list-style-type: none">• Es constituyente de la enzima ureasa.

Fuente: Sánchez y Martínez, 1999 (citado por Estrada, 2010).

2.5 Solución nutritiva para riego

Una solución nutritiva de plantas consiste en disolver los fertilizantes en agua, los elementos se disocian y quedan en forma iónica; de este modo, los elementos esenciales son fácilmente asimilables por las raíces de las plantas (Steiner, 1968). Existen diversas formulaciones de soluciones nutritivas utilizadas para el manejo de cultivos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Composición de diferentes soluciones nutritivas (ppm) usadas en hidroponía

Referencia	pH	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Na ⁺⁺	K ⁺	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	PO ₄	SO ₄	Cl ⁻	Fe	Mn	Cu	Zn	B	Mo
Knop (1865)		244	24		168		206	57	32							
Shive (1915)		208	484		562		148	448	640							
Hoagland (1919)	6.8	200	99	12	284		158	44	125	18						
Jones and Shive (1921)		292	172		102	39	204	65	227		0.83					
Rothamsted	6.2	116	48		593		139	117	157	17	8	0.25			0.2	
Hoagland and Snyder (1933, 1938)		200	48		234		210	31	64	-1		0.1	0.014	0.01	0.1	0.016
Hoagland and Arnon (1938)		160	48		234	14	196	31	64		0.63/sem	0.5	0.02	0.05	0.5	0.01
Long Ashton	5.5-6	134-300	36	30	130-295		140-284	41	48	3.5	5.6 o 2.8	0.55	0.064	0.065	0.5	0.05
Eaton (1931)		240	72		117		168	93	96		0.8	0.5			1	
Shive and Robbins (1942)		60	53	92	117		56	46	70	107		0.15		0.15	0.1	
Robbins (1946)		200	48		195		196	31	64		0.5	0.25	0.02	0.25	0.25	0.01
White (1943)	4.8	50	72	70	65		47	4	140	31	1	1.67	0.005	0.59	0.26	0.001
Duclos (1957)	5-6	136	72		234		210	27	32		3	0.25	0.15	0.25	0.4	2.5
Tumanov (1960)	6-7	300-500	50		150		100-150	80-100	64	4	2	0.5	0.05	0.1	0.5	0.02
A.J. Abbott	6.5	210	50		200		150	60	147		5.6	0.55	0.064	0.065	0.5	0.05
E. B. Kidson	5.5	340	54	35	234		208	57	114	75	2	0.25	0.05	0.05	0.5	0.1
Purdue (1948): A		200	96		390	28	70	63	607		20	0.3	0.02	0.05	0.5	
B		200	96		390	28	140	63	447		1	0.3	0.02	0.05	0.5	
C		120	96		390	14	224	63	64		1	0.3	0.02	0.05	0.5	

Fuente: Resh (1992) (Citado por Estrada, 2010); la Solución Universal de Steiner, ampliado en texto.

2.5.1 Solución nutritiva universal de Steiner

Steiner (1961) menciona que una solución nutritiva verdadera, debe cumplir con los siguientes requisitos:

- Una relación mutua entre cationes (K^+ : Ca^{2+} : Mg^{2+}).
- Una relación mutua entre aniones (NO_3^- : $H_2PO_4^-$: SO_4^{2-}).
- Una concentración iónica total.
- Un pH con tolerancia de ± 0.1 .

En la solución nutritiva, todos los iones deben estar disueltos, ya que la precipitación de los iones de los nutrimentos puede ocasionar deficiencias en la planta. Además, deja de cumplir con los requisitos de una solución nutritiva verdadera, sobre todo en la relación mutua entre los cationes y aniones. En la solución nutritiva universal de Steiner, la relación para NO_3^- : $H_2PO_4^-$: SO_4^{2-} es de 60:5:35 y para K^+ : Ca^{2+} : Mg^{2+} es de 35:45:20 (Steiner, 1961). Dentro del intervalo de dichas relaciones mutuas es posible que cualquier cultivo tenga un desarrollo favorable (Steiner, 1964). Sin embargo, es necesario realizar las pruebas para utilizar la concentración que le favorezca al cultivo de interés. Algunos factores a considerar en la elección son: el tipo de planta, el estado de desarrollo y el ambiente en donde se cultiva, si es a la intemperie o bajo cubierta.

Como algunos antecedentes del uso de la solución de Steiner, se pueden citar el trabajo de Gastelum *et al.* (2012), quienes utilizaron la solución de Steiner para el desarrollo de un cultivo de *Physallis peruviana* L. en invernadero ensayando concentraciones que van de 25 a 100%, observaron que las concentraciones de 50 y 75 % favorecen el crecimiento de la planta; además el fruto no se vio afectado en su contenido de sólidos solubles totales (°Brix).

Preciado *et al.* (2003) utilizaron la solución universal de Steiner para plántulas de melón (*Cucumis melo* L.) variedades Crusier y Gold Eagle, recomendaron que un

incremento gradual en la concentración en la solución nutritiva de 45-90 y 100% genera el mejor crecimiento y desarrollo de las plántulas, valorados en términos de altura de la plántula, diámetro de tallo, crecimiento de la raíz y el área foliar.

La solución universal de Steiner se ha utilizado también en plantas ornamentales bulbosas, tal como la azucena (*Eucharis grandiflora* Planch & Linden), en donde la respuesta más favorable se observó en plantas sometidas a concentraciones de 75 y 100 % de solución Steiner, obteniendo plantas con una altura de 37.50 y 39.63 cm, respectivamente, comparadas con el testigo que creció 28.87 cm. Así mismo, las plantas sometidas a 75 y 100 % de solución Steiner, presentaron un área foliar de 50.34 y 47.82 cm² respectivamente, comparadas con el control que fue de 39.85 cm². (Evangelista-Lozano *et al.*, 2015)

Salgado (2013) reporta para *S. rebaudiana* que el uso de la solución de Steiner a una concentración de 25% en combinación con cuatro concentraciones de NO₃⁻ (3, 6, 9 y 12 meq L⁻¹), observaron que los efectos en el desarrollo de las plantas (número de tallos, rendimiento en peso total de la planta, peso seco, área foliar y la acumulación de biomasa) es directamente proporcional a la concentración de nitrato.

2.6 Sistemas de secado de materiales vegetales

El proceso de secado es útil para preservar la calidad de los alimentos, la reducción de la actividad de agua a través de la disminución del contenido de humedad y de esta manera evitar el deterioro y contaminación durante el período de almacenamiento (Akpinar y Bicer, 2007).

En el secado de alimentos tradicional o a la intemperie, el producto se coloca sobre una manta, lona o tablas de madera, expuesto directamente al sol o en la sombra, para aprovechar la temperatura ambiental. Sin embargo el método de secado a la intemperie tiene el inconveniente de ser un proceso lento en zonas de alta humedad, los productos están expuestos al polvo, a insectos y animales que pueden deteriorar los alimentos y causar enfermedades al consumirlos. La exposición directa de los

alimentos a los rayos solares puede ser perjudicial en cuanto a su calidad porque hay pérdida del color natural, destrucción de vitaminas y valor nutritivo debido a la acción de los rayos ultravioleta.

Los factores claves para un buen secado son: aire caliente a una temperatura de 40 a 70°C, bajo contenido de humedad y movimiento constante. Generar aire caliente que está a la temperatura ambiente y con un cierto porcentaje de humedad, aumenta su capacidad de absorber vapor de agua. Por cada 20 °C de aumento de la temperatura del aire su capacidad de retener vapor de agua se triplica y por consecuencia su humedad relativa se reduce a un tercio. Para eliminar la humedad de los alimentos, es necesario que el aire que pasa por los productos esté en constante movimiento y renovación. Esta ventilación se puede lograr en forma natural gracias al efecto chimenea o en forma forzada mediante ventiladores, dependiendo del modelo del secador (Verás *et al.*, 2012).

Los secadores solares consiste en una cámara de secado y un colector solar inclinado, unidos entre sí en la parte inferior de la cámara, en ésta se encuentran bandejas de secado removibles superpuestas. Las bandejas están protegidas por una puerta colocada en la pared trasera de la cámara. El colector está cubierto con vidrio y tiene en su interior una chapa de color negro doblada en zig-zag, para aumentar la superficie de intercambio de calor con el aire. El aire ambiental entra por la parte inferior del colector, se calienta gradualmente. El aire entra en la cámara, donde atraviesa las bandejas ejerciendo su poder secador (Sharma *et al.*, 2009)

El criterio más importante para definir el fin del secado es el contenido residual de humedad, cuando el producto deja de perder peso, después de tres registros cada 15 min el peso es constante.

Lorenzo *et al.* (2014) reportan que las hojas secas de *S. rebaudiana* son 20 veces más dulces que el azúcar común. El método más utilizado para el secado de las hojas es mediante la energía solar, sin embargo, con éste método de secado no se

reporta la calidad del producto seco, relacionado con el aspecto de las hojas; contenido de esteviósidos y la seguridad microbiológica (Lemus-Mondaca *et al.*, 2014).

Muanda *et al.* (2011) reportan que las hojas de *S. rebaudiana* se pueden consumir en infusiones, debido a que aparte de su sabor dulce, presenta propiedades antioxidantes, que se derivan de su alto nivel de flavonoides y compuestos fenólicos. Periche *et al.* (2015) evaluaron tres métodos de secado de las hojas de *S. rebaudiana*: a la sombra (20°C), con aire caliente (100 y 180°C) y por liofilización a una presión de vacío de 9.5×10^{-1} mm Hg. El método de secado a la sombra fue con el que se obtuvieron los valores más altos de esteviósidos (48 mg/g peso seco), seguido por método por aire caliente y liofilización con 37 y 35 mg/g peso seco, respectivamente. Mientras que el método más adecuado para conservar los compuestos antioxidantes fue el de aire caliente, reportando un contenido de compuestos antioxidantes de 126mg/ g peso seco, seguido por el método a la sombra y liofilización con 75.9 y 48.5 mg/ g peso seco respectivamente. En este sentido el secado que se aplique a las hojas de *S. rebaudiana* puede favorecer su uso como edulcorante o antioxidante.

2.7 Glicósidos de *S. rebaudiana*

S. rebaudiana es conocida principalmente por su sabor dulce, y se reporta que solo las especies *Stevia rebaudiana* Bertoni y *Stevia phlebophyta* producen esteviolglicósidos (Brandle y Telmer, 2007). También se reporta que se encuentran en mayor cantidad en las hojas (Tavarini y Angelini, 2013).

Se han identificado más de 30 esteviol glicosidos en *S. rebaudiana* (Wölwer-Rieck, 2012). Sin embargo, en las hojas se encuentran 8 glicósidos que incluyen al esteviósido, esteviolbiosido, rebaudiósido (A, B, C, D y E) y dulcosido A (Ramya *et al.*, 2014). El más abundante es el esteviósido en las hojas (Figura 2), el cual llega a ser hasta 300 veces más dulce que la sacarosa (Geuns, 2003), seguido del rebaudiosido A, rebaudiosido C y dulcosido A (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012). Las

proporciones de los glicósidos en las hojas son el esteviósido (5-10%), rebaudiósido A (2-4%), rebaudiósido C (1-2%) y dulcósido A (0.4-0.7%) (Cuadro 3). Todos los glicósidos aislados de *S. rebaudiana* tienen el mismo esqueleto de esteviol y difieren principalmente en el contenido de restos de hidratos de carbono (R1 y R2), mono, di y trisacáridos que contienen glucosa y / o ramnosa en las posiciones C13 y C19 (Kochikian *et al.*, 2006).

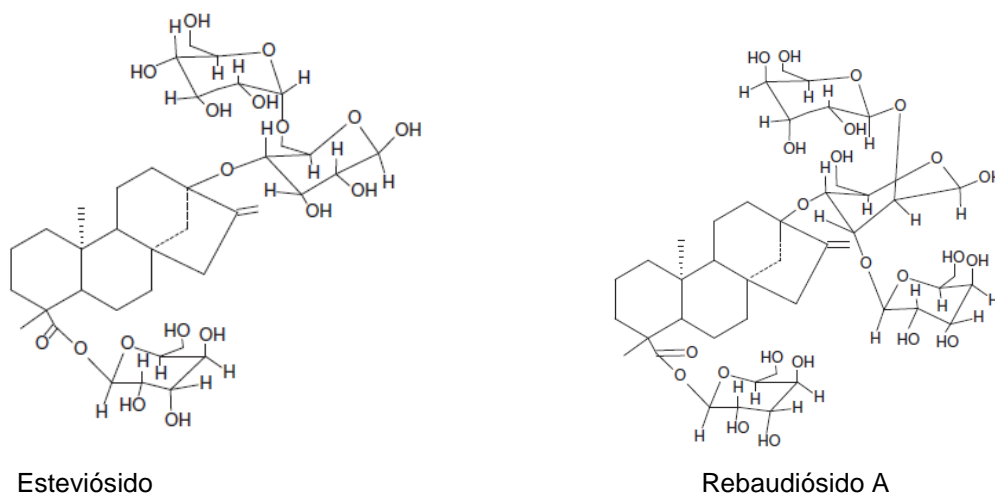


Figura 2. Estructura química de los glicósidos más abundantes de *S. rebaudiana*. (Puri *et al.*, 2011)

Cuadro 3. Contenido de los glicósidos presentes en *S. rebaudiana*

Glicósido	Contenido (%)	Poder Endulzante	Peso Molecular	Referencia
Esteviósido	5-10	250-300	804.87	Bridel y Lavielle 1931
Rebaudiósido A	2-4	350-450	967.01	
Rebaudiósido B	<1	300-350	804.87	
Rebaudiósido C	1-2	50-120	951.01	Sakamoto <i>et al.</i> 1977
Rebaudiosido D	<1	200-300	1129.15	Sakamoto <i>et al.</i> 1977
Rebaudiósido E	<1	250-300	967.01	
Rebaudiósido F	<1	Nd	936.99	
Esteviolbiónido	<1	100-125	642.73	Kohda <i>et al.</i> 1976
Dulcósido A	0.4-0.7	50-120	788.87	Kobayashi <i>et al.</i> 1977

(Puri *et al.*, 2011)

2.8 Síntesis de esteviosidos

La ruta de síntesis que da origen a los esteviósidos de *S. rebaudiana* está ligada a la síntesis del ácido giberélico. La cadena de terpenos se alarga a partir de uniones sucesivas de isopentenil pirofosfato (IPP), considerado como el isopreno activo (Richman *et al.*, 1999; Buchanan *et al.*, 2000). Las enzimas que catalizan el alargamiento de la cadena terpenica son las prenil transferasas, de las cuales se han aislado hasta ahora la geranil pirofosfato sintasa, enzima identificada en plastos que requieren Mg^{2+} o Mn^{2+} como cofactores (Suga y Endo, 1991; Kim *et al.*, 1996); la farnesil pirofosfato sintasa, que requiere Mg^{2+} como cofactor, se localiza en el citoplasma y cataliza la formación de farnesil pirofosfato (FPP) en dos etapas; por último, la geranil pirofosfato sintasa, que requiere Mn^{2+} para su máxima actividad, se localiza en plastos y forma la geranil geranil pirofosfato (GGPP) en tres etapas (Figura 3). Brandle *et al.* (2002), clonaron y secuenciaron el gen de *S. rebaudiana* que codifica para la enzima copalil pirofosfato sintasa, responsable de la conversión de GGPP a CPP e indican que la hidroxilación del ácido ent-kaurenoico en la posición C13 es el punto de divergencia para la síntesis del esteviol y las giberelinas. Esta hidroxilación, requiere NADPH y oxígeno molecular proveniente del estroma y es catalizada por la enzima ácido ent-kaurenoico 13-hidroxilasa (Jarma *et al.*, 2010).

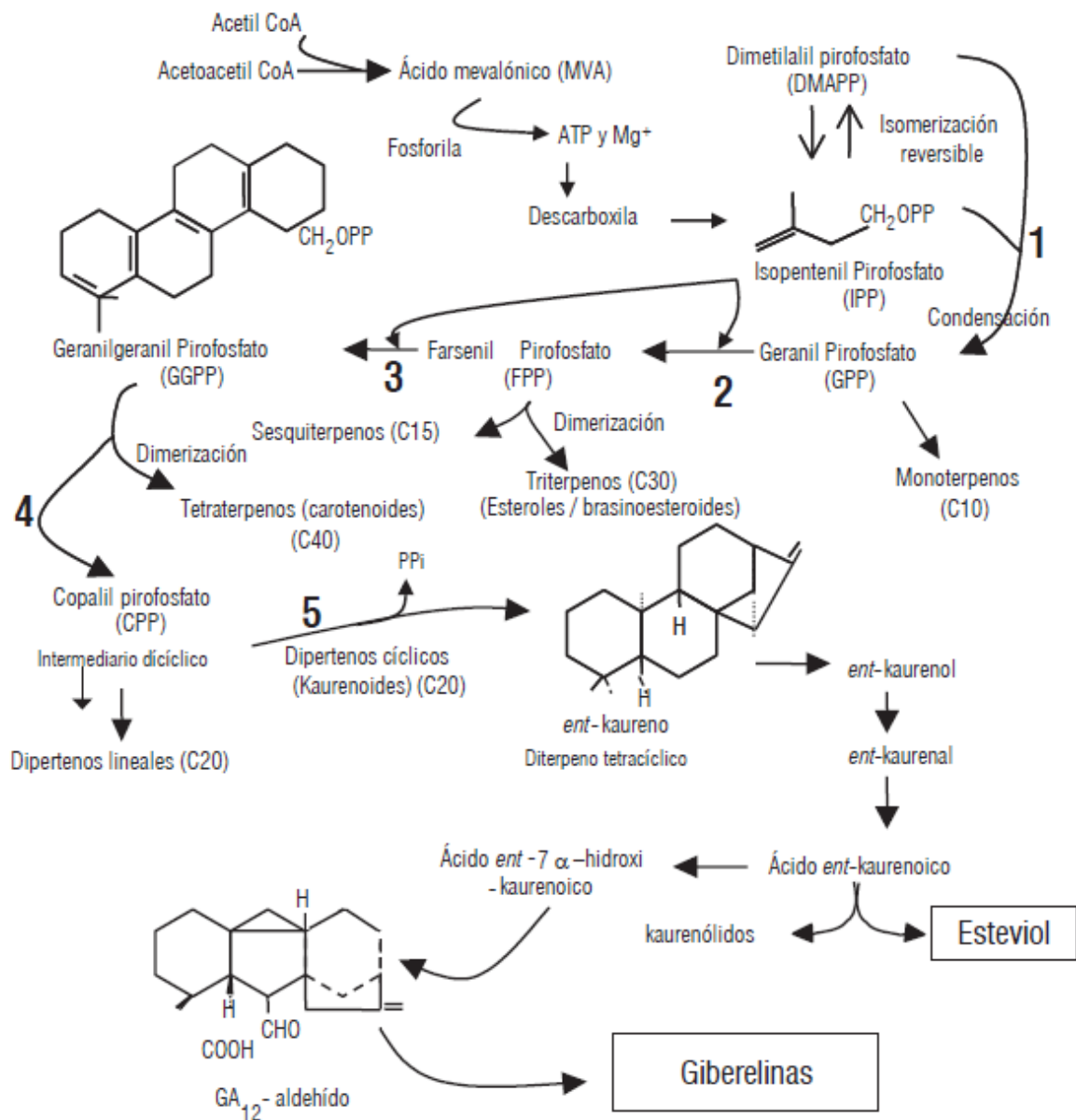


Figura 3. Ruta y enzimas involucradas en la síntesis del esteviol en *Stevia rebaudiana* Berton. 1.GPP-sintasa; 2. FPP-sintasa; 3.GGPP-sintasa; 4. CPP-sintasa; 5. Kaureno sintetasa. . (Jarma 2010)

3. JUSTIFICACIÓN

La *S. rebaudiana* se produce en grandes cantidades en diferentes regiones del mundo, donde las condiciones tanto de propagación, manejo, cosecha, postcosecha y ambientales son diferentes; por lo que el producto del cultivo también lo será. Siempre se busca manejar el cultivo para producir plantas con mayor rendimiento de biomasa, principalmente las hojas, que es donde se encuentra la mayor cantidad de metabolitos secundarios, especialmente los esteviósidos. Los esteviósidos presentes en *S. rebaudiana* tienen un poder edulcorante muy superior a la sacarosa, éste poder edulcorante podría estar influenciado por el método de propagación, tipo de fertilización, temperatura y humedad relativa durante el cultivo de la planta; así como el método de secado de las hojas. La información que se genere sobre el manejo de *S. rebaudiana*, será importante debido a que el cultivo tiene mucha importancia económica.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Conocer el efecto de la fertilización en el desarrollo de plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni y las condiciones de secado sobre la producción de esteviosidos

4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la fertilización con solución de Steiner en el desarrollo de plantas *S. rebaudiana*
2. Determinar el rendimiento en peso seco de follaje de *S. rebaudiana* con diferentes sistemas de secado
3. Valorar el efecto de la nutrición y método de secado en el contenido de esteviosidos de *S. rebaudiana*

5. HIPÓTESIS

El cambio en la fertilización en plantas de *S. rebaudiana* aumenta el rendimiento en biomasa; así también la cantidad de esteviosidos depende del sistema de secado de hojas de *S. rebaudiana*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Localización del experimento

Este trabajo se realizó en el Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (Departamento de Biotecnología y Departamento de Desarrollo Tecnológico), ubicado en el municipio de Yautepec de Zaragoza, Morelos; cuyas coordenadas geográficas son N 18°49'44.278, W 099°05'34.296 y con una altitud de 1064 msnm.

6.2 Condiciones de cultivo de *S. rebaudiana*

El cultivo de *S. rebaudiana* se realizó en un invernadero, con orientación Norte-Sur, rectangular cubierto con plástico tratado color blanco amarillento; con ambiente semi-controlado, con temperaturas promedio de 25 °C (máximas de 38°C y mínimas de 12°C) y humedad relativa promedio de 62%.

6.3 Material vegetativo

Las plantas de *S. rebaudiana* utilizadas se obtuvieron a partir de esquejes enraizados procedentes de plantas madre cultivadas *in vitro*. Las plantas progenitoras de la variedad criolla *in vitro* fueron donadas por el Instituto Tecnológico de Costa Rica.

6.4 Sustrato

Para el crecimiento y desarrollo de las plantas se usó como sustrato una mezcla, que consistió en turba 60%, perlita 20% y vermiculita 20%, con pH de 5.8 ± 0.2 y porosidad de 85 %.

6.5 Contenedores

Se utilizaron macetas negras con capacidad de 10 L, diámetro inferior 23 cm, diámetro superior 30.5 cm y 4 perforaciones en la base. Estas macetas estuvieron colocadas dentro de una palangana de plástico reciclado con diámetro superior de 27 cm y diámetro inferior de 25 cm.

6.6 Propagación de las plantas de *S. rebaudiana*

Los esquejes se seleccionaron y obtuvieron a partir de la parte superior de plantas madres (Figura 4) y presentaban un grosor entre 0.5 y 0.7 mm y una longitud de 10 cm aproximadamente. Estos esquejes se cortaron con tijeras previamente desinfectadas con alcohol al 70%; la colecta de esquejes se realizó en charolas con papel humedecido con agua purificada. Los esquejes se plantaron el mismo día, eliminando el último par de hojas y quedando aproximadamente 1 cm de la base del tallo para enterrarlos en sustrato contenido en charolas de 50 cavidades adaptadas a una cámara humedad con el fin de evitar la deshidratación de los esquejes. A los 5 días, después de la plantación, las charolas se destaparon 2 horas por la mañana y a los 7 días se destaparon hasta observar que la planta ya no se deshidrató. Al día 8, las plantas presentaron suficiente raíz y posteriormente fueron trasplantadas a macetas.



Figura 4. Esquejes de *S. rebaudiana*, para plantado en charolas de 50 cavidades

6.7 Solución nutritiva universal de Steiner

La solución nutritiva utilizada fue la solución universal de Steiner (Steiner, 1968). Para la elaboración de la solución madre, los reactivos utilizados fueron grado reactivo (Anexo 1).

Las diferentes concentraciones de la solución Steiner, fueron preparadas a partir de soluciones madre (Cuadro 4), se prepararon 20 L de cada una de las concentraciones y se ajustaron a un pH de 5.4 con H₂SO₄ 1N y NaOH 1N con un potenciómetro manual (JENCO Electronics, LTD, Modelo 1671). Se formularon soluciones nutritivas a 25, 50, 75 y 100%.

Como testigo se utilizaron plantas que solo fueron regadas con agua, que fueron marcadas como 0%.

Cuadro 4. Preparación de solución universal de Steiner en diferentes concentraciones a partir de soluciones madre

Solución Madre	Normalidad	g•L ⁻¹	100% ml•L ⁻¹	75% ml•L ⁻¹	50% ml•L ⁻¹	25% ml•L ⁻¹
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	1	118.08	9	6.75	4.5	2.25
KNO ₃	1	101.1	3	2.25	1.5	0.75
K ₂ SO ₄	0.5	43.57	6	4.5	3	1.5
MgSO ₄ 7H ₂ O	1	123.24	4	3	2	1
KH ₂ PO ₄	1	136.09	1	0.75	0.5	0.25
H ₃ BO ₃		2.88				
MnCl ₂ 4H ₂ O		1.81				
ZnSO ₄ 7H ₂ O		0.22	Poner 1ml•L ⁻¹ de la solución madre en todos los tratamientos			
CuSO ₄ 5H ₂ O		0.18				
H ₂ MoO ₄ H ₂ O		0.02				
Quelatos		2.8 ppm	Se utilizó 43µl de Fierro ® en todos los tratamientos			

6.8 Manejo del cultivo de *S. rebaudiana*

Las plantas en las macetas se colocaron en camas de 2.5 m de ancho por 1.2 m de largo, quedando 36 plantas por cama y arregladas al azar. Las plantas se distinguieron con una etiqueta tipo banderín; las macetas estuvieron dispuestas de tal manera que las plantas se pudieron manejar sin necesidad de moverlas. Los esquejes se despuntaron a los diez días después del trasplante a maceta, con este

manejo se permitió la brotación de las yemas laterales, a los 40 días después del trasplante se realizó la primera cosecha; el corte se realizó 15 cm arriba de la base del cuello de la planta. El segundo corte se realizó a los 60 días y a los 90 días el tercero y último corte.

6.9 Riegos de las plantas de *S. rebaudiana*

Las macetas debidamente etiquetadas se colocaron en palanganas y las plantas se regaron con 500 ml de solución Steiner cada 7 días, la colocación de las macetas en palanganas, permitió que no hubiera pérdida de solución nutritiva.

6.10 Variables Evaluadas

Diámetro del tallo y la distancia internodal. La medición de estas variables en las plantas de cada uno de los tratamientos se realizó con un vernier (marca FOY modelo 14070 de 15 cm). La medición del diámetro de tallo se realizó en el tercer nodo de la rama terminal central. La distancia internodal se tomó entre el cuarto y el tercer nodo que se encuentran antes de la punta de la rama.

Actividad estomática del envés de la hoja. Esta variable se midió y se realizó solamente en el envés debido a que es donde se localiza el mayor número de estomas en las hojas del tercer entrenudo. Se utilizó un porómetro de hoja SC-1 serie LPS0883.

Área foliar. Las hojas fueron colectadas por la mañana, se colocaron en una charola con papel húmedo y se llevaron al laboratorio. Se tomaron hojas del tercer nodo de las plantas de cada uno de los tratamientos y se tomaron imágenes con una cámara digital Sony Cyber-Shot dsc-w710 (16.1 mega pixeles, 5x optical zoom) y el cálculo del área se realizó con el programa ImageJ (versión 14.8) realizando una calibración con una imagen de un papel milimétrico en una escala en centímetros.

Rendimiento de biomasa. En la primera cosecha se cortaron las ramas y se separaron las hojas de las plantas de *S. rebaudiana* sujetas a cada tratamiento. El

peso fresco total se dividió entre el número de plantas; posteriormente las hojas se colocaron en charolas de aluminio y se secaron en una estufa a 90 °C, por 72 h y se calculó el rendimiento de peso seco.

Las hojas tanto frescas como secas, se pesaron en una balanza (ADAM modelo CQT251 con capacidad de 250 g x 0.1 g).

Se realizó un primer corte (poda productiva), una segunda y la tercera a los 90 días. Después de cada corte se cuantificó el número de ramas por planta, el número de hojas y el peso fresco de las hojas.

En la tercera poda se sacrificó la planta cortándola al ras del sustrato, se obtuvo el peso fresco de la planta, antes del corte se midió la altura de la planta y con extremo cuidado se extrajo la raíz la cual fue medida y pesada.

Secado de hojas de *S. rebaudiana*. Las hojas de la tercera poda de las plantas sujetas a cada uno de los tratamientos se usaron para cuantificar la pérdida de peso y elaborar la curva de cinética de secado. Se colocaron 30 g de hojas frescas en charolas de aluminio de 50 cm de largo por 35 cm de ancho, dichas charolas con el material vegetal se colocaron en los diferentes sistemas de secado, como lo fueron: secador tipo invernadero acondicionado con charolas con entrepaños de malla con marco de madera (Figura 5).

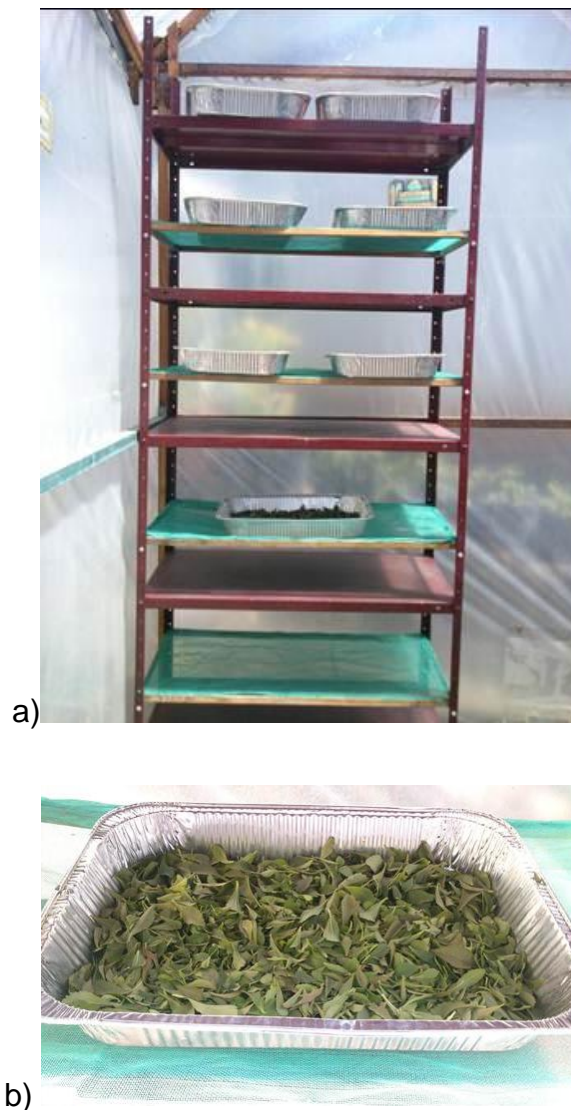


Figura 5. a) Interior del secador tipo invernadero y b) Charola de aluminio para deshidratar las hojas de *S. rebaudiana*

Otro de los sistemas de secado fue con el secador solar tipo armario inclinado, con base elevada y cubierto con vidrio para permitir la entrada de luz y la deshidratación del material vegetal. Este tipo de secador no cuenta con sistema cerrado lo que permite el flujo de aire (Figura 6).

En ambos sistemas se registró el peso del material vegetal cada 30 min, hasta que el peso fue constante en cada uno de los tratamientos.



Figura 6. Secador solar para secar hojas de *S. rebaudiana*

Otro sistema de secado, fue por medio de una liofilizadora marca LABCONCO (Figura 7). Este tipo de secado se basa en la congelación del agua del tejido y su extracción al vacío, en donde se mantuvo el material vegetal durante 16 h.



Figura 7. Liofilizadora utilizada para secar hojas de *S. rebaudiana*

Determinación de esteviósidos

Se realizó en el Laboratorio No.10 de Química de Productos Naturales en el Centro de Investigaciones en Química de la Universidad Autónoma de Morelos (CIQ-UAEM), en Cuernavaca, Morelos.

Preparación de los extractos para la estimación de esteviósidos:

Previo a la lectura por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Las hojas secas de cada uno de los tratamientos se molieron en un molino (Tekmar) hasta obtener un gramo de cada uno de los tratamientos y métodos de secado, por lo que se obtuvieron 15 muestras. El disolvente para obtener el extracto fue agua destilada, 15 ml de agua destilada en 1 g de hoja molida.

Las muestras se calentaron a 40 °C (baño María) por 20 minutos y se filtraron con papel filtro Whatman No 1. El filtrado se congeló durante 24 h a -4 °C y se liofilizó durante 40 h. A partir de las muestras liofilizadas se prepararon soluciones de 1 mg de muestra / ml de agua grado HPLC. Se usó un cromatógrafo Dionex modelo Ultimate U-3000 equipado con una bomba cuaternaria (modelo LPG3400) y un detector UV-Vis con arreglo de diodos. La fase estacionaria fue una columna C18 (Dionex) de 250 mm de longitud con un diámetro interno de 4.6 mm y tamaño de partícula 5 µm; la fase móvil se preparó con el siguiente sistema de disolventes:

Disolvente A: CH₃CN

Disolvente B: Solución de Fosfatos de sodio pH 2.6

La elución fue isocrática con 36% de disolvente A y 64% de disolvente B a flujo constante de 0.8 mL/min durante 18 min y se inyectaron 20 µl de muestra. La detección de los esteviósidos se realizó mediante un detector de arreglo de diodos con un intervalo de 190 a 400 nm, con un registro fijo a 240 nm.

La identificación de los esteviósidos se realizó por comparación con el tiempo de retención que presentó cada esteviósido en el cromatograma de los estándares utilizados, el rebaudiosido A y esteviósido (Sigma-Aldrich).

La estimación de los compuestos se realizó integrando el área bajo la curva del pico correspondiente a ese compuesto en el cromatograma, Los datos se reportan por unidades de rebaudiosido A y esteviósido.

6.11 Análisis de los datos

Los datos de las variables, se analizaron con el programa estadístico SigmaPlot versión 11.0, del que se obtuvo un análisis de varianza por cada variable, con el propósito de saber si existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos; además se realizaron pruebas de comparación de medias por Tukey con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, para conocer cuáles de los tratamientos son diferentes estadísticamente.

7. RESULTADOS

7.1. Evaluación del efecto de la fertilización con solución de Steiner en el crecimiento de plantas de *S. rebaudiana* Bertoni en invernadero

A los 20 días de la siembra de los esquejes de *S. rebaudiana* en sustrato, las plantas regadas con la solución de Steiner presentaron un desarrollo favorable en contraste con las plantas del tratamiento testigo (Figura 8). Todas los tratamientos con la solución de Steiner generaron la formación de brotes en las plantas, además las raíces de las plantas invadieron el sustrato, sobre todo en los tratamientos con 25, 50 y 75 % de la concentración de solución Steiner. En el día 20 se realizó la poda de formación de las plantas.

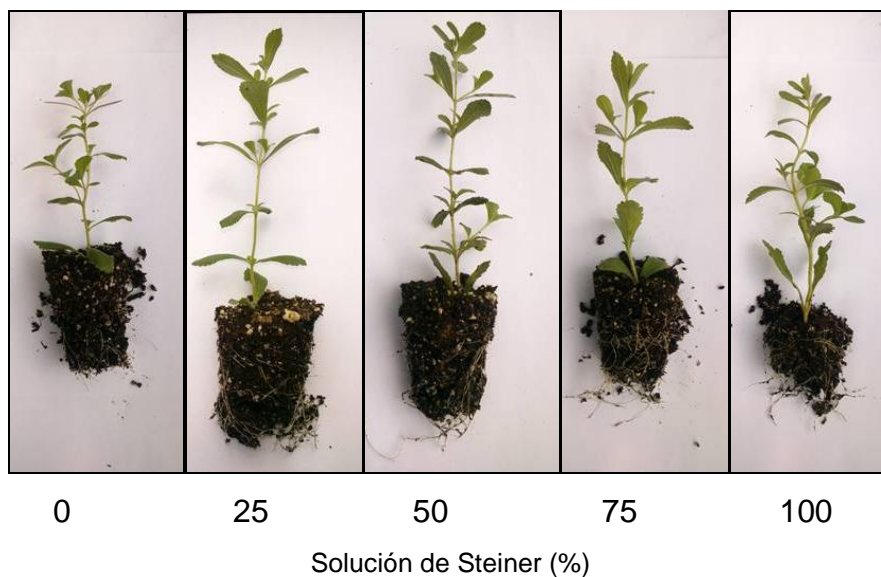


Figura 8. Plantas de *S. rebaudiana* a los 20 días después del trasplante a maceta, con dos riegos de solución universal de Steiner

Las plantas de *S. rebaudiana* a los 40 días de tratamiento recuperaron el follaje (Figura 10) y se realizó la primera evaluación del desarrollo de las plantas, obteniéndose los resultados que se presentan en el Cuadro 5. Todas las plantas con los tratamientos de solución de Steiner superaron en desarrollo a las plantas del tratamiento testigo. El diámetro de tallo del tercer entrenudo de las plantas sometidas al tratamiento con la solución de Steiner al 50 %, fueron las que presentaron el mayor grosor (0.32 cm); seguidos del tratamiento al 75 % (0.27 cm). Este parámetro es importante, ya que la presencia de un tallo vigoroso favorece la colecta de las hojas en el período de poda. La distancia internodal en las plantas de los tratamientos de 25 y 50 % fue 0.62 veces más largo que en las plantas testigo (Cuadro 5).

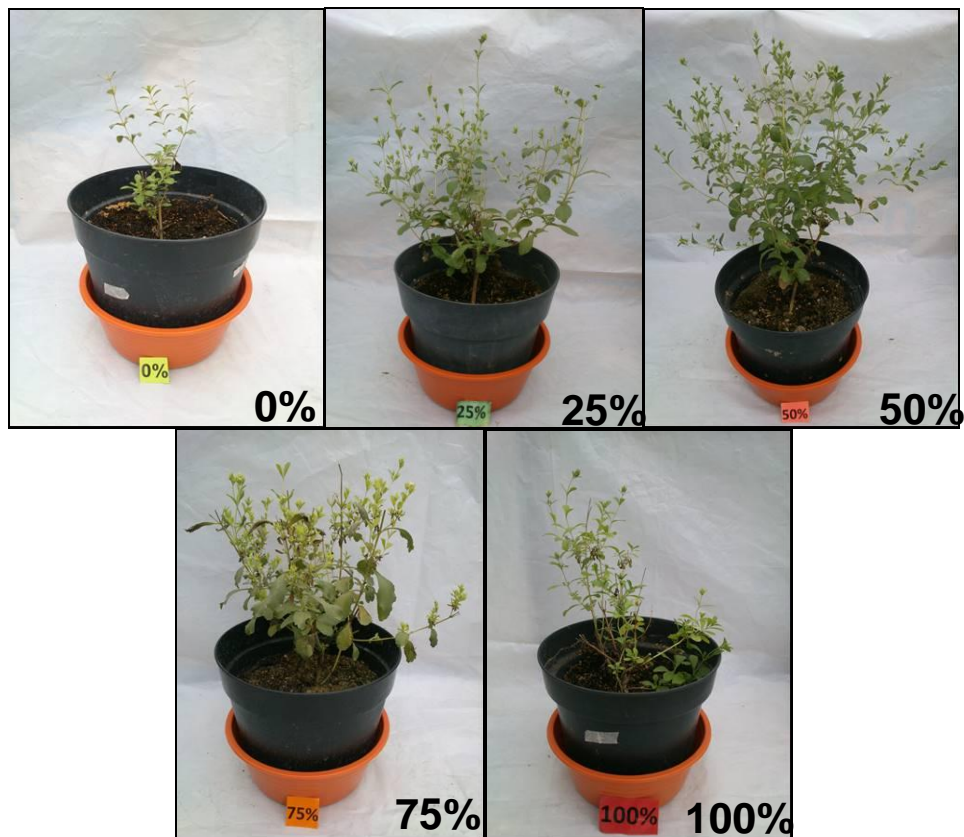


Figura 10. Plantas de *S. rebaudiana* a los 40 días, regadas con solución nutritiva universal de Steiner a diferentes concentraciones.

Cuadro 5. Respuesta del desarrollo de las plantas de *S. rebaudiana* a diferentes concentraciones de fertilización en condiciones de invernadero.

Variable	Unidades	Concentración de solución universal de Steiner (%)				
		0	25	50	75	100
Diámetro del tallo	cm	0.22±0.5 ^a	0.2±0 ^a	0.32±0.5 ^b	0.27±0.5 ^a	0.25±0.5 ^a
Distancia internodal	cm	3.85±0.3 ^a	6.32±1.7 ^b	6.32±0.5 ^b	5.1±0.4 ^b	4.92±0.8 ^b
Actividad estomática envés antes de la poda	mmoles.m ² .s ²	34.2±9.5 ^a	28.5±14.1 ^a	26.6±8.2 ^a	27.4±9.9 ^a	28.2±10.5 ^a
Actividad estomática envés después de poda	mmoles.m ² .s ²	34.0±5.5 ^a	29.97±6.3 ^a	25.54±6.4 ^a	25.74±5.9 ^a	21.6±4.5 ^a
Área foliar	cm ²	6.15±2.2 ^a	9.08±1.8 ^b	11.44±3.4 ^b	8.52±1.8 ^b	8.42±2.5 ^b
Rendimiento peso fresco	g por planta	24±3.6 ^a	91±13.9 ^b	111±17.0 ^b	90±13.8 ^b	70±10.7 ^b
Rendimiento peso seco	g por planta	5.0±0.6 ^a	18±2.7 ^b	21±3.7 ^b	17±2.6 ^b	13±2.0 ^b

Letras distintas indican diferencia significativa (P<0.05), prueba de Tukey

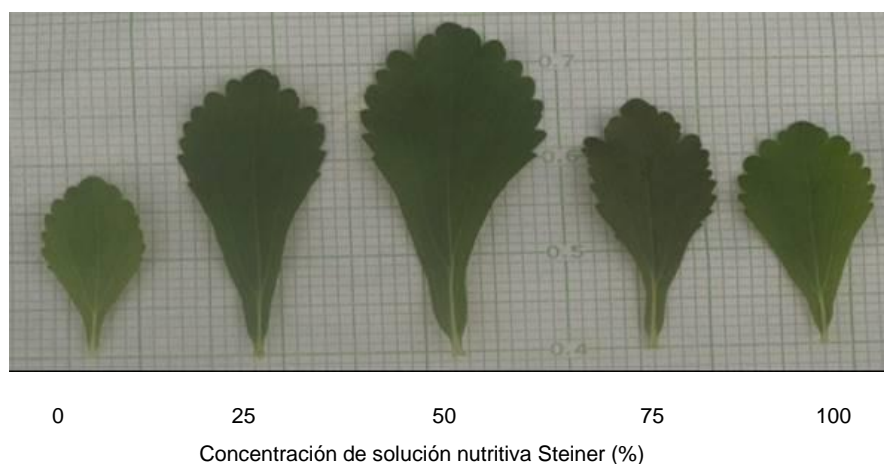


Figura 9. Hojas de *S.rebaudiana* regadas con diferentes concentraciones de solución universal de Steiner

La actividad estomática del envés de las no tuvo diferencia antes y después del corte de ramas. Las hojas de las plantas regadas a una concentración del 25, 50 y 75 % de la solución de Steiner mostraron coloración verde oscuro; mientras que las del

100 % y el testigo tuvieron un color verde pálido (Figura 9). Las plantas regadas con la solución de Steiner presentaron hojas significativamente más grandes que las de las plantas testigo, el valor de área foliar más alto (11.44 cm²) se logró utilizando la solución de Steiner al 50 %. Consistente con la determinación del área foliar, los resultados del rendimiento de follaje, tanto en peso fresco como seco, fue significativamente superior para los tratamientos de las plantas regadas con la solución de Steiner. Los valores más altos se alcanzaron con la solución de Steiner al 50 % (111 g peso fresco/planta y 21 g peso seco/planta) (Cuadro 5).

A las plantas de *S. rebaudiana* después de la primer poda se dejaron crecer con riegos con los tratamientos de la solución Steiner, se realizó una nueva poda a los 60 días y el mismo procedimiento se repitió a los 90, de tal forma que se obtuvieron tres diferentes veces muestras de follaje colectado, los parámetros de desarrollo del material que se cortó son presentados en el Cuadro 6.

Los datos del número de ramas, hojas y peso fresco de las plantas de *S. rebaudiana* no presentan una clara tendencia de variación que dependa de la poda. Sin embargo, el material vegetal colectado de las plantas regadas con la solución de Steiner muestra valores superiores a la del testigo. Vale la pena destacar que las cosechas de material de las plantas regadas con 50% de la solución de Steiner fue la condición en donde se obtuvieron los valores más altos: 3 veces más ramas, 2.2 veces más hojas y 6 veces más peso fresco de las hojas (Cuadro 6).

Cuadro 6. Datos de colecta de follaje de plantas de *S. rebaudiana* cultivadas en invernadero. Datos de tres podas a los 40, 60 y 90 días. Las plantas fueron regadas con solución de Steiner a diferentes concentraciones.

Variable	Núm. Poda	Concentración de solución universal de Steiner (%)				
		0	25	50	75	100
Número de ramas/planta	1	6.0 ± 1.9 ^{Aa}	17.0 ± 2.5 ^{Ab}	18.0 ± 5.4 ^{Ab}	10.8 ± 4.5 ^{Ab}	18.8 ± 5.3 ^{Ab}
	2	10.0 ± 1.6 ^{Ba}	15.6 ± 6.0 ^{Ab}	16.2 ± 3.6 ^{Ab}	17.8 ± 7.1 ^{Ab}	17.2 ± 2.5 ^{Ab}
	3	5.6 ± 1.9 ^{Aa}	32.4 ± 5.9 ^{Bb}	28.0 ± 5.0 ^{Bb}	30.4 ± 8.2 ^{Ab}	23.2 ± 3.8 ^{Ab}
	Total	21.6	65.0	62.2	59.0	59.2
Número de hojas/planta	1	38.2 ± 11.4 ^{Aa}	157.0 ± 27.7 ^{Ab}	196.6 ± 33.6 ^{Ab}	108.0 ± 66.7 ^{Ab}	183.4 ± 75.2 ^{Ab}
	2	116.8 ± 23.7 ^{Ba}	166.2 ± 85.5 ^{Ab}	196.6 ± 39.9 ^{Ab}	217.7 ± 79.0 ^{Ab}	180.8 ± 25.8 ^{Ab}
	3	64.0 ± 9.6 ^{Ca}	305.0 ± 77.5 ^{Ab}	254.8 ± 63.9 ^{Ab}	292.8 ± 52.3 ^{Ab}	225.6 ± 35.3 ^{Ab}
	Total	219	628.2	648.2	618.5	589.8
Peso fresco de hojas (g)/planta	1	2.9 ± 1.4 ^{Aa}	14.6 ± 2.9 ^{Ab}	23.1 ± 3.5 ^{Ab}	11.0 ± 5.9 ^{Ab}	19.4 ± 6.6 ^{Ab}
	2	5.0 ± 2.3 ^{Aa}	14.8 ± 8.0 ^{Ab}	16.4 ± 6.4 ^{Ab}	18.5 ± 9.3 ^{ABb}	14.2 ± 4.5 ^{Ab}
	3	2.7 ± 0.4 ^{Aa}	20.2 ± 2.5 ^{Ab}	22.3 ± 5.4 ^{Ab}	23.4 ± 2.7 ^{Bb}	18.8 ± 3.4 ^{Ab}
	Total	10.6	49.6	61.84	52.9	52.4

Letras minúsculas corresponden a comparación por tratamiento con solución de Steiner, mayúsculas corresponden a número de poda. Letras distintas indican diferencia significativa ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

En la tercer poda se cosechar las plantas de *S. rebaudiana* y se tomaron determinaciones tanto de la parte aérea como de la raíz, los datos son presentados en el Cuadro 7. Las plantas regadas con los tratamientos de solución de Steiner al 25, 50 y 75 presentaron valores de la parte aérea y de la raíz superiores significativamente con las plantas testigo. La concentración de la solución de Steiner al 100 % provocó una disminución en el desarrollo de las plantas, probablemente por un efecto tóxico. Cabe resaltar que el riego con la solución de Steiner generó un aumento en los valores de desarrollo de la planta: altura > 2.52, peso de la parte aérea > 9.0, longitud de la raíz > 1.69 y peso de la raíz > 1.9.

Cuadro 7. Datos de crecimiento de las plantas de *S. rebaudiana* cultivadas en invernadero. A los 90 días de riego con la solución de Steiner a diferentes concentraciones

Variable	Concentración de solución universal de Steiner (%)				
	0	25	50	75	100
Altura (cm)	19.1 ± 1.2 ^a	43.0 ± 2.8 ^b	48.3 ± 3.0 ^b	45.6 ± 4.3 ^b	35.8 ± 4.5 ^c
Peso fresco (g)	5.1 ± 0.7 ^a	47.2 ± 5.4 ^b	54.2 ± 1.2 ^b	54.7 ± 8.4 ^b	43.8 ± 7.4 ^b
Peso seco (g)	1.0 ± 0.2 ^a	9.1 ± 1.0 ^b	9.3 ± 2.4 ^b	11.7 ± 1.8 ^b	9.2 ± 1.6 ^b
Contenido de agua (%)	80.0	80.0	82.0	78.0	79.0
Longitud de raíz (cm)	23.6 ± 2 ^a	38.8 ± 6.4 ^b	39.6 ± 7.9 ^b	29.4 ± 8.6 ^b	25.6 ± 9.3 ^{ab}
Peso fresco de raíz (g)	7.0 ± 0.6 ^a	16.0 ± 3.0 ^b	13.3 ± 3.2 ^b	11.4 ± 5.0 ^{ab}	5.6 ± 3.7 ^a

Letras distintas indican diferencia significativa ($P < 0.05$), prueba de Tukey.

7.2 Evaluación del rendimiento de follaje de *S. rebaudiana* con diferentes métodos de secado

La pérdida de agua de las hojas de *S. rebaudiana* en el secador tipo invernadero y en el secador solar paso de un valor inicial de 30.0 a 5.0 g/L, lo que representa una pérdida de agua del 80 % en ambos casos. Lo cual indica que ambos procedimientos de secado de las hojas eliminan la misma cantidad de humedad. Sin embargo, el secado en el secador tipo invernadero, se realizó a las 2 horas de incubación (figura 11), mientras que en el secador solar se demoró 2.5 horas (figura 12). Lo anterior se debe a que el secador tipo invernadero alcanzó una temperatura promedio de 45 °C y máxima de 52 °C. Estos valores fueron superiores a los del secador solar, que registró una temperatura promedio de 43 °C y máxima de 51 °C.

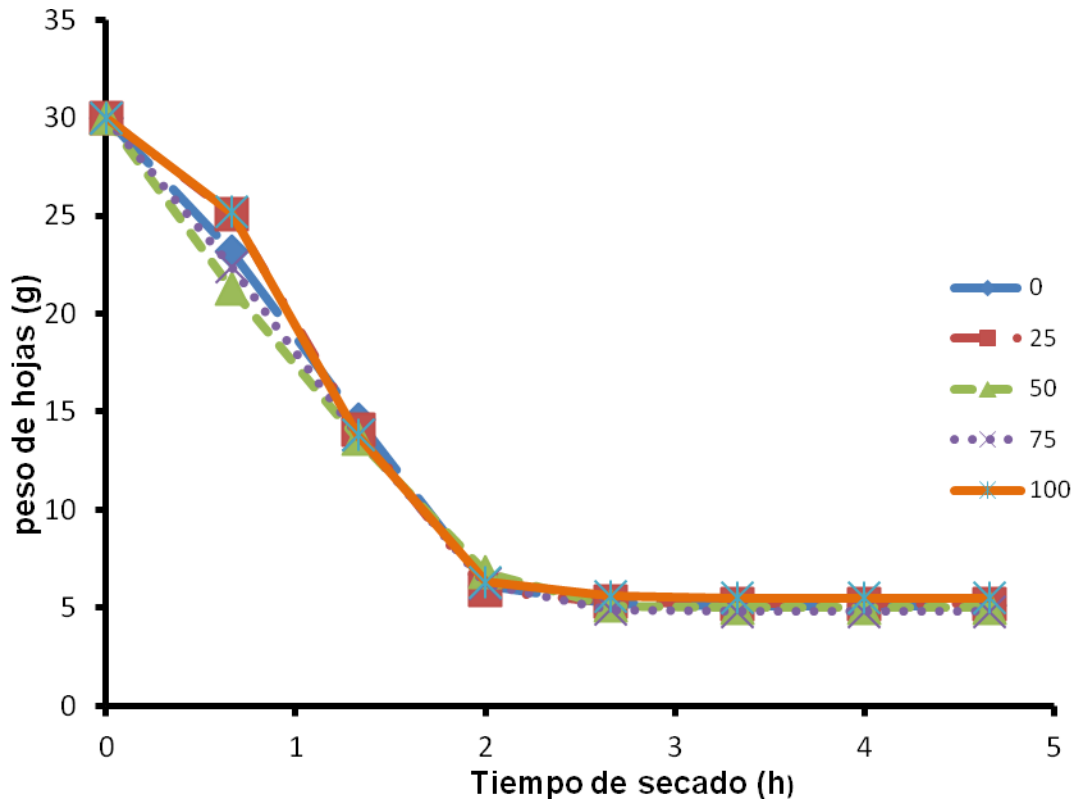


Figura 11. Pérdida de peso de hojas de *S. rebaudiana* de los diferentes riegos con la solución Universal de Steiner a diferentes concentraciones, en secador tipo invernadero a una temperatura de 45 °C.

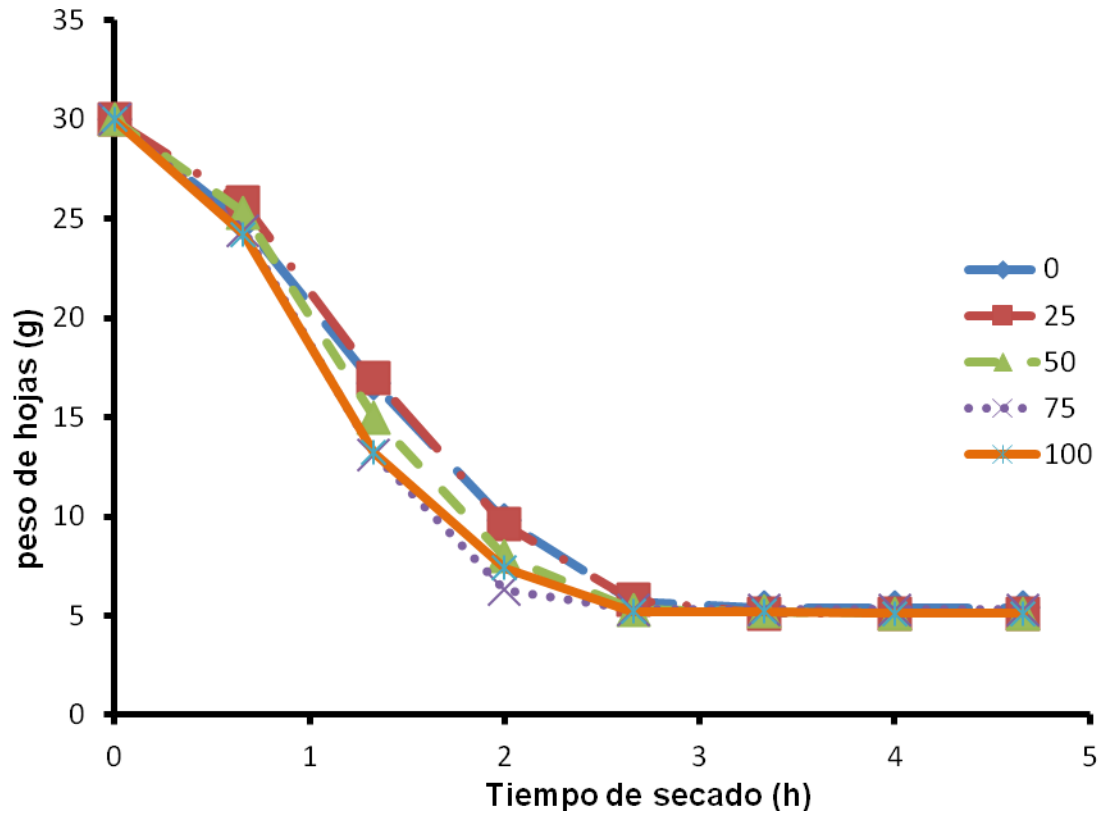


Figura 12. Pérdida de peso de hojas de *S. rebaudiana* de los diferentes riegos con la solución Universal de Steiner a diferentes concentraciones, en secador solar a una temperatura de 43 °C

7.3 Estimación del contenido de esteviósidos en *S. rebaudiana*

La figura 13, muestra los cromatogramas de los estándares de los dos compuestos mayoritarios presentes en *S. rebaudiana*; el esteviosido que tuvo un tiempo de retención de 6.0 minutos y del rebaudiosido A que presentó un tiempo de retención de 5.7 minutos. En la figura 14, se muestran los cromatogramas de los extractos de las plantas de *S. rebaudiana* regadas con la solución de Steiner y secadas con el secador tipo invernadero. De acuerdo a los perfiles cromatográficos fue posible identificar los dos compuestos de interés. En la figura se observa que en todos los extractos regados con la solución de Steiner estuvo presente el esteviosido y solamente en las muestras de 25 % y el testigo, se encontró una cantidad minoritaria del rebaudiosido. También se presentaron otros compuestos que eluyeron a tiempos de retención menores a la de los estándares, pero que no fueron identificados. Un comportamiento similar se observó en las muestras de las plantas regadas con la solución de Steiner y sometidas al proceso de secado por liofilización y en secador solar (ver anexo 2).

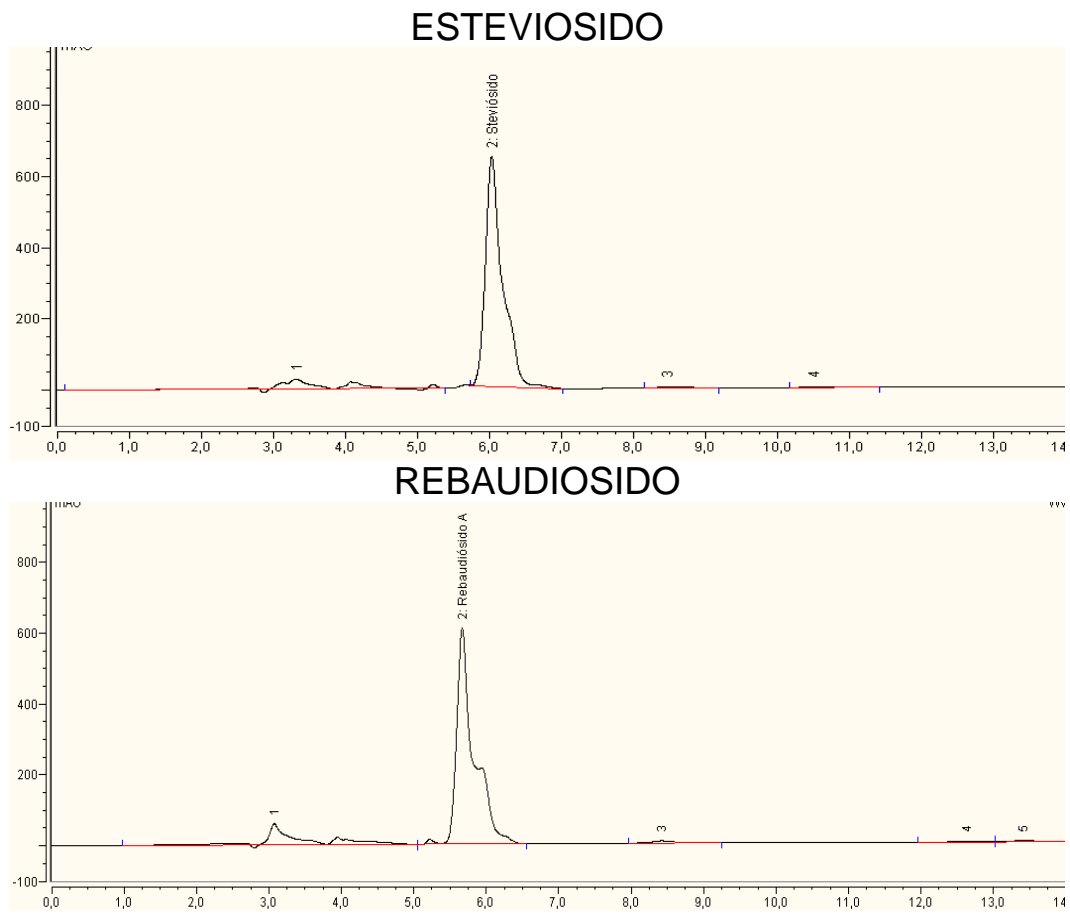


Figura 13. Cromatogramas de los estándares utilizados: a) Estevióside y b) Rebaudiosido A

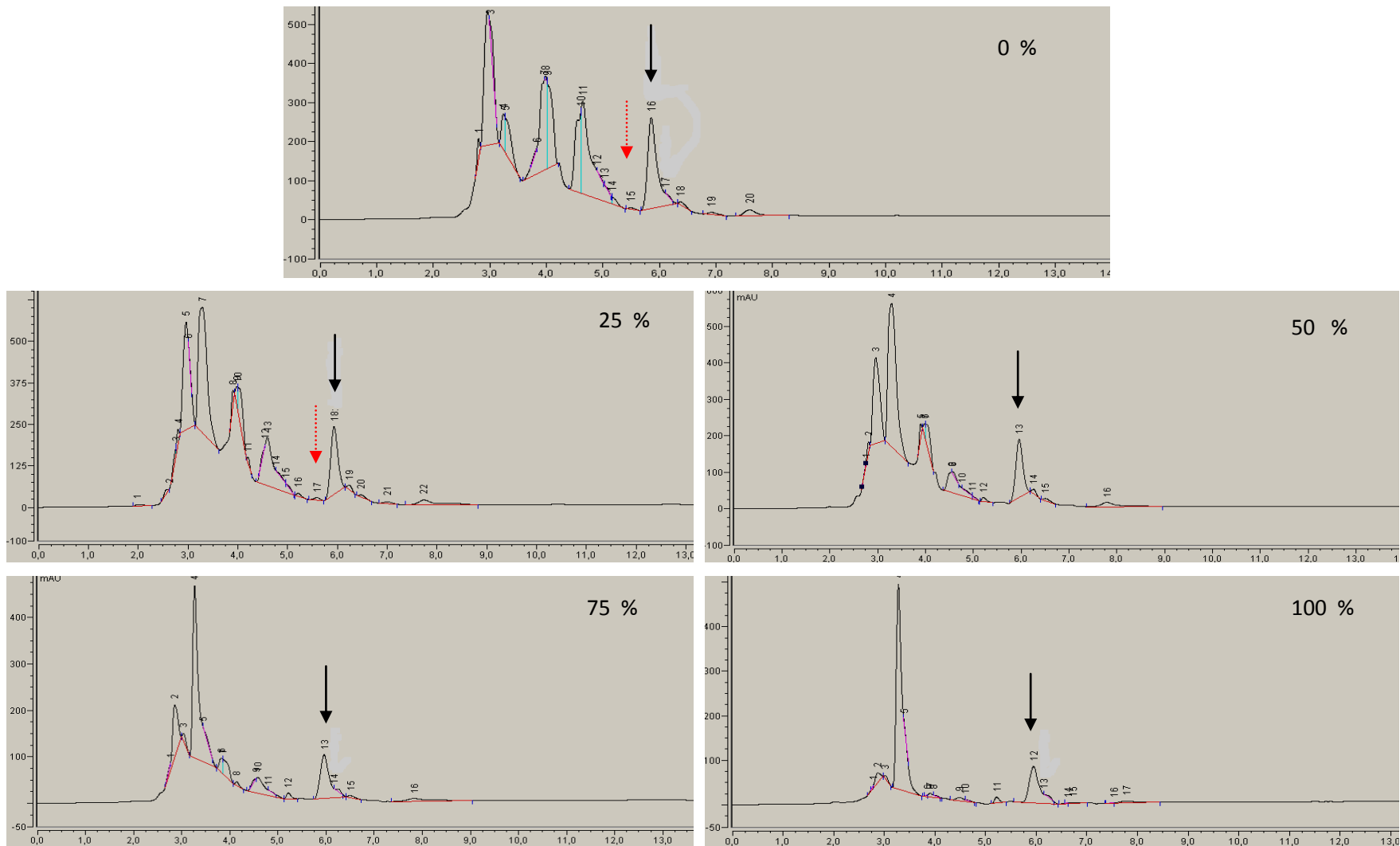


Figura 14. Cromatograma de los extractos de plantas de *S. rebaudiana*, regados con la solución de Steiner en diferentes concentraciones y de muestras secadas en el secador tipo invernadero. Estebiosido — Rebaudiosido A

Para la cuantificación por HPLC de los compuestos se debe cumplir con los parámetros de asimetría y resolución con valores de 1 y 2 respectivamente. Sin embargo, para el análisis cromatográfico de los estándares de esteviósido y rebaudiosido, los valores obtenidos fueron: asimetría de 0.80 y resolución de 1.10 para el esteviósido, mientras que para el rebaudiosido A, la asimetría fue de 0.83 y la resolución de 1.14. Por lo anterior, no se pudo generar una curva de calibración para la cuantificación de los compuestos de interés y por lo tanto se realizó una medición del área de los de los picos en los cromatogramas, reportando los valores estimativos en unidades.

En la figura 15, se presentan las estimaciones de los esteviosidos de las muestras de hojas de *S. rebaudiana*, sometidas a los diferentes tratamientos con la solución de Steiner y sometidas a los tres regímenes de secado. En los tratamientos con la solución de Steiner al 100 % se observó que el secado con el sistema de invernadero y el secador solar fueron menores en 0.6 y 0.5 veces, respectivamente, con relación al obtenido con el secado por liofilización. Este comportamiento es consistente con el observado en los tratamientos con la solución de Steiner al 75 %, en donde se observó una reducción en 0.7 y 0.4 veces, respectivamente. Sin embargo, en los tratamientos de las plantas regadas con la solución de Steiner al 50 % el secado por invernadero tuvo un contenido 1.5 veces mayor de esteviosidos con relación al obtenido con el secado por liofilización y en el secador solar. De manera similar en las plantas regadas con la solución de Steiner al 25 % se observó que el contenido de esteviosidos en el material secado en el secador solar fue de 1.5 a 1.7 más alto al obtenido con el secado en el invernadero y la liofilizadora respectivamente. En las plantas testigo, regadas con agua, no se observó efecto sobre el contenido de los esteviosidos por el método de secado.

Considerando la tendencia global del contenido de esteviosidos en las hojas de *S. rebaudiana*, obtenidos con los métodos de secado solar e invernadero, se observa que el aumento de la concentración de Steiner produce una disminución la cantidad de esteviosidos. Comportamiento diferente al de las hojas secadas por liofilización,

en donde los contenidos más altos de esteviosidos se observaron en el tratamiento con la solución de Steiner al 75 % y en el testigo.

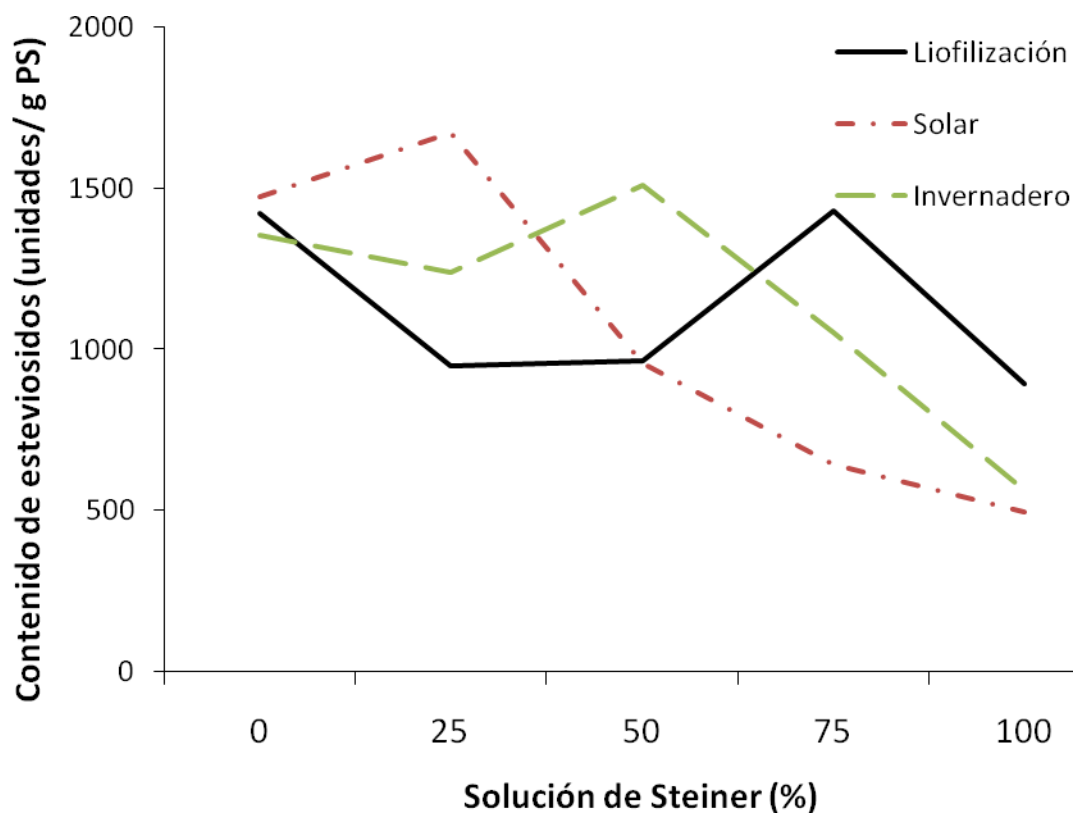


Figura 15. Contenido de esteviósidos en hojas de *S. rebaudiana* sometidas a diferentes condiciones de secado y fertilización con la solución de Steiner.

8. DISCUSIÓN

Después del trasplante de las plantas de *S. rebaudiana*, se realizó la poda, dejando de 5 a 6 pares de hojas y se obtuvo la brotación de las yemas laterales, beneficiando con ello a su desarrollo después de 20 días (figura 10). Este resultado es consistente con el reportado previamente para por Ramírez (2011), quien para *S. rebaudiana* recomendó que la poda de la planta se realice dejando de 3 a 4 pares de hojas, para estimular la brotación múltiple. Por otra parte, Añez y Figueredo (1992), indican que cuando la poda se realiza en plantas que inician su desarrollo, se obtiene mayor cantidad de ramas en plantas arbustivas. Sin embargo, en algunas plantas la intensidad de poda no siempre favorece el desarrollo de ramas laterales. Jaimez *et al.* (2002), reportan que para plantas arbustivas de *Capsicum chinense* Jacq, la poda no favoreció la brotación de las yemas laterales en las planta.

En este trabajo el rendimiento de biomasa de *S. rebaudiana* se vio favorecido con el sistema de fertilización mediante la solución universal de Steiner, ya que se utilizaron tratamientos a diferentes concentraciones durante todo el ciclo de la planta; estos resultados concuerda con los obtenidos por Preciado *et al.* (2003), quienes reportaron que en plántulas de melón (*Cucumis melo* L.), regadas con la solución nutritiva universal de Steiner con un incremento de manera gradual de su concentración de 45-90-100%, incrementó la altura de planta, el diámetro de tallo, peso seco del vástago, área foliar de las hojas y la fructificación en la planta. Gastelum *et al.* (2012) reportaron el manejo de plantas de *Physalis peruviana* L. cultivadas en invernadero y fertilizadas con solución nutritiva universal de Steiner, a diferentes concentraciones (25, 50, 75 y 100%). La concentración de 50 y 75% de solución de Steiner generaron un mejor crecimiento, desarrollo y fructificación, además la concentración no influyó sobre el contenido de sólidos solubles totales en los frutos (°Brix).

Steiner (1984) menciona que la solución nutritiva universal de Steiner es una fórmula completa que cubre los requerimientos nutritivos de cualquier planta. Sin embargo, la concentración a la que se utilice repercute en la respuesta en el desarrollo de las plantas. En este trabajo la concentración que favoreció la producción de hojas de *S.*

rebaudiana fueron los tratamientos al 50 %, seguido del tratamiento al 25 % de solución de Steiner. En *S. rebaudiana* se han realizado estudios como el que reporta Salgado (2013) manejando el sistema hidropónico en tezontle (roca porosa roja de origen volcánico), con riegos iniciales a una concentración del 10 % de solución universal de Steiner, en el inicio de desarrollo de las plantas y conforme creció la planta se aumentó la concentración de solución de Steiner a 25 %, con este manejo obtuvieron los valores más altos de tamaño de la planta, diámetro de tallo basal, área foliar y el rendimiento en peso fresco y peso seco.

Evangelista-Lozano *et al.* (2015) menciona que los elementos de la solución nutritiva universal de Steiner están disponibles de manera inmediata cuando se aplican a las plantas, tal como lo demostró en plantas de azucena (*Eucharis grandiflora* Planch & Linden), que tienen la característica de acumular nutrientes en el bulbo, que le servirán para la floración del siguiente ciclo (anual). Estos mismos autores reportaron el uso de la solución nutritiva universal de Steiner a diferentes concentraciones (25, 50, 75 y 100%) y como testigo utilizaron plantas regadas con agua destilada, demostrando que plantas tratadas con solución Steiner a concentraciones de 75 y 100 % presentaron mayor altura con 37.50 y 39.63 cm respectivamente, comparadas con el control con 28.87 cm. Así mismo, las plantas sometidas a 75 y 100 % de solución Steiner, presentaron un área foliar de 50.34 y 47.82 cm² respectivamente, comparadas con el control que fue de 39.85 cm².

En este trabajo se observó que las plantas sometidas al 50 % de solución Steiner fueron las que presentaron una mejor respuesta en el desarrollo, seguidas de 25, 75 y 100%. Los resultados obtenidos en este trabajo y comparados con otros reportes en los que utilizaron la solución nutritiva universal de Steiner, muestran que la asimilación de los nutrientes está en función del tipo de planta.

Lemus-Mondaca *et al.* (2014) y Periche *et al.* (2015), señalan que el método tradicional de secado para las hojas de *S. rebaudiana* es al sol directo, lo realizan colocando las hojas secas a la intemperie y expuestas al sol durante 8 horas o más. Este procedimiento expone al material vegetal, tanto a la intemperie como a la manipulación constante de los trabajadores de campo, quienes en muchas ocasiones

no tienen la precaución en el aseo de las manos y contaminan el material con microorganismo, que son capaces de deteriorar el material vegetal. Los métodos de secado utilizados en este trabajo fueron el secador tipo invernadero y el secador solar, los cuales generaron una temperatura promedio de 45 y 43°C, respectivamente. Esto permitió que la pérdida de humedad del 83 % en hojas de *S. rebaudiana*, se lograra en solamente 2.0 a 2.5 horas. Esta disminución de tiempo, podría mejorar la calidad sanitaria del material, al no permitir su exposición a la intemperie por un tiempo tan prolongado.

En las muestras de las hojas de *S. rebaudiana* de la variedad criolla, utilizadas en este estudio, se obtuvo el esteviosido como compuesto mayoritario (figura 14 y anexo 2). Este resultado es consistente con lo reportado en la literatura. Puri *et al.*, (2011) indican que la variedad criolla contiene esteviosido en mayor proporción que el rebaudiosido A. Una desventaja de esta variedad es su sabor amargo, que se le atribuye a la mayor proporción de esteviosido que rebaudiosido. Al respecto, se han obtenido variedades mejoradas con un mayor contenido de rebaudiosidos que esteviosido, como la variedad Morita (Ohta *et al.*, 2010).

El uso de la solución de Steiner en el riego de las plantas de *S. rebaudiana*, mostró que el desarrollo de las plantas fue superior en varios de los parámetros de crecimiento y en la cosecha de hojas, en comparación con los valores obtenidos en el testigo (Cuadro 4 y 5). Sin embargo, se observó una disminución en el contenido de los esteviosidos en las hojas de las plantas, con el aumento de la concentración de la solución de Steiner empleada para su riego, particularmente en los tratamientos de las hojas secadas con el secador solar y con el secador de tipo invernadero (figura 15). Este resultado es consistente con el reportado por Salgado (2013), quien realizó un manejo nutrimental con solución de Steiner en plantas de *S. rebaudiana*, observando un mejor desarrollo de las plantas. Pero en el reporte de Salgado (2013), no se cuantificó el contenido de los esteviosidos.

El mayor contenido de esteviosidos específico en las plantas de *S. rebaudiana*, fue el obtenido con el tratamiento testigo, es decir utilizando agua. Sin embargo, este tratamiento fue en el que las plantas presentaron su menor crecimiento (cuadro 4 y

5). Esto podría deberse a que las plantas testigo presentaron un estrés por falta de nutrientes y por consiguiente su metabolismo secundario se vio favorecido con relación a las plantas fertilizadas. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Tavarini *et al.* (2015), quienes utilizaron diferentes concentraciones de nitrógeno en plantas de *S. rebaudiana* y obtuvieron una mayor cantidad de esteviósidos en plantas que no tuvieron suplemento de nitrógeno.

Es importante mencionar que técnicas de secado pueden influir en la composición de los diferentes compuestos de plantas herbáceas. Con los resultados de la figura 15, no es posible establecer un comportamiento consistente en el contenido de los esteviosidos en las hojas de *S. rebaudioana* sometidas a los diferentes métodos de secado. Las plantas de *S. rebaudiana* presenta además de los esteviósidos, otros compuestos de importancia fitoquímica, como lo son los compuestos antioxidantes: flavonoides, compuestos fenólicos, esteroides y triterpenos (Gardana *et al.*, 2010; Periché *et al.*, 2015). Lin *et al.* (2011) reportan para plantas de *Echinacea purpurea*, planta perteneciente a la familia Asteraceae, que flores secadas con aire caliente a 40 °C tienen una pérdida del contenido de antioxidantes de 0.42 y de fenoles totales de 0.53, con relación al material secado por liofilización.

Ceunen y Geuns (2013) mencionan que uno de los factores importantes para el desarrollo de *S. rebaudiana* y acumulación de esteviósidos es el fotoperiodo. En el presente trabajo el factor evaluado en el desarrollo fue la fertilización, por lo que en un futuro, sería posible cultivar *S. rebaudiana* en campo y fertilizar con la misma solución nutritiva y determinar como se ve favorecida la cantidad de esteviósidos influenciada por fotoperiodo y la fertilización.

9. CONCLUSIONES

- El riego de las plantas de *S. rebaudiana* con la solución nutritiva universal Steiner al 50 % mejoró el desarrollo de las plantas, que se reflejó en valores mayores de diámetro del tallo, distancia intermodal y área foliar.
- Los datos de tres cosechas de follaje de las plantas de *S. rebaudiana* regadas con la solución nutritiva universal de Steiner al 50 %, generaron 6 veces ganancia de peso que las hojas regadas con agua (control). Sin embargo, el contenido específico estimado de los esteviósidos en las hojas disminuyó con el empleo de los riegos con la solución nutritiva universal de Steiner.
- El secado de las hojas de *S. rebaudiana* fue más rápida en el secador tipo invernadero que en el secador solar, debido a las altas temperaturas alcanzadas y al sistema cerrado que presenta.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Arab, E., Abou-Arab, A. y Abu-Salem, M. F. (2010). Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. *African Journal of Food Science*, 4, 269–281.
- Akpınar, E. K. y Bicer, Y. (2007). Modelling of thin layer drying kinetics of sour cherry in a solar dryer and under open sun. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 66, 764–771.
- Añez, B. y Figueredo C. (1992). Efectos de diferentes distancias entre hileras y sistemas de podas sobre el crecimiento y producción de *Capsicum frutescens*. *Turrialba* 42 (2): 143-150.
- Aranda-González, I., Barbosa-Martín, E., Toraya-Avilés, R. y Segura-Campos, M. (2014). Evaluación de la inocuidad de *Stevia rebaudiana* Bertoni cultivada en el sureste de México como edulcorante de alimentos. *Nutrición Hospitalaria*, 30 (3): 594–601.
- Brandle, J., Starratt, A. y Gijzen, M. (1998). *Stevia rebaudiana*: Its agricultural , biological and chemical properties. *Canadian Journal of Plant Science*, 78, 527–536.
- Brandle, J.E., Richman, A., Swanson A. y Chapman, B. (2002). Leaf ESTs from *Stevia rebaudiana*: a resource for gene discovery in diterpene synthesis. *Plant Molecular Biology*. 50, 613-622.
- Brandle, J. E. y Telmer, P. G. (2007). Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*, 68(14), 1855–63.
- Ceunen, S. y Geuns, J. M. C. (2013). Influence of photoperiodism on the spatio-temporal accumulation of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Plant Science*, 198, 72–82.

- Chatsudthipong, V. y Muanprasat, C. (2009). Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology and Therapeutics*, 121(1): 41–54.
- Chiang, M.H., Shen, H.L. y Cheng, W.H. (2015). Genetic analyses of the interaction between abscisic acid and gibberellins in the control of leaf development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 236, 260–271.
- Das, K., Dang, R., Shivananda, T. N., Sekeroglu, N., John, S., Lay, R. P. C., y Nagar, V. (2007). Influence of bio-fertilizers on the biomass yield and nutrient content in *Stevia rebaudiana* Bert . grown in Indian subtropics. *Journal of Medicinal Plants Research*, 1(1): 5–8.
- Estrada, M. (2010). Evaluación nutrimental en el desarrollo de la Azucena (*Eucharis grandiflora* Planch & Linden). Tesis de Maestría. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Yautepec, Morelos, México, 71p.
- Evangelista-Lozano, S., Estrada-García, M., Escobar-Arellano, S. L., Arenas-Ocampo, M. L., Camacho-Díaz, B. H. y Jiménez-Aparicio, A. R. (2015). *Eucharis grandiflora* Planch. and Linden development fertirrigated with different osmotic potentials. *Journal of Plant Nutrition*, 38(4): 551–567.
- Evangelista, L. y Rodríguez, M. (2014). *Stevia*, la hierba dulce de libre consumo. *Hypatia*. 49-50,36.
- Gardana, C., Scaglianti, M. y Simonetti, P. (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(9): 1463–1470.
- Gastelum-Osorio, D. A., Sandoval-Villa, M., Trejo-López, C. y Castro-Brindis, R. (2013). Fuerza iónica de la solución nutritiva y densidad de plantación sobre la producción y calidad de frutos de *Physalis peruviana* L. *Revista Chapingo serie horticultura*, 19(2): 197-210.

- Geuns, J. M. C. (2003). Stevioside. *Phytochemistry*, 64, 913–921.
- Ingle, M. R. y Venugopal C. K. (2009). Effect of different growth regulators on rooting of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) cuttings. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 22(2): 455–456.
- Jaimez, R. E.; N. Nava, Y. Rivero y Trompiz, K. (2002). Efecto de diferentes intensidades de poda sobre la dinámica de floración y producción de ají dulce (*Capsicum chinense*, Jacq). *Revista de la Facultad de Agronomía*. 19: 132-139.
- Jarma, A., Combatt, E. y Cleves L. (2010a). Aspectos nutricionales y metabolismo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 38(2): 199-208.
- Jarma, A., Espitia, M. y Fischer, G. (2010b). Síntesis de esteviósidos en estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.). *Acta Biológica Colombiana*, 15(1):263-268.
- Kim, K., Sawa, Y. y Shibata, H. (1996). Hydroxylation of *ent*-Kaurenoic acid to steviol in *Stevia rebaudiana* Bertoni purification and partial characterization of the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 332(2): 223-230
- Kochikyan, V., Markosyan, A., Abelyan, L., Balayan, A. y Abelyan, V. (2006). Combined enzymatic modification of stevioside and rebaudioside A. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42, 31–37
- Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Moraga, N. O. y Astudillo, S. (2014). Dehydration of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves: kinetics, modeling and energy features. *Journal of Food Processing and Preservation*. 39:508-520
- Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L. y Kong, A. H. (2012). *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A

- comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*, 132(3): 1121–1132.
- Liu, X., Ren, G., y Shi, Y. (2011). The effect of organic manure and chemical fertilizer on growth and development of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Energy Procedia*, 5, 1200–1204.
- Lorenzo, C., Serrano-Díaz, J., Plaza, M., Quintanilla, C. y Alonso, G. L. (2014). Fast methodology of analysing major steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chemistry*, 157, 518–523.
- Ma, L., y Shi, Y. (2011). Effects of potassium fertilizer on physiological and biochemical index of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Energy Procedia*, 5, 581–586.
- Miserendino, E. y Astorquizaga, R. (2014). Invernaderos: aspectos básicos sobre estructura, construcción y condiciones ambientales. *Agricultura*, 23,93-100.
- Muanda, F. N., Soulimani, R., Diop, B. y Dicko, A. (2011). Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *LWT - Food Science and Technology*, 44(9): 1865–1872.
- Navarro. G. y Navarro, B. (2003) Química agrícola, el suelo y los elementosquímicos esenciales para la vida vegetal. Ediciones MundiPrensa, Madrid. 487.
- Oliva, Y., Oleas, A., y Tigrero, J. (2009). *Stevia rebaudiana* Bertoni, una planta medicinal. Boletín técnico de la Escuela Politécnica del Ejército (ESPE). Sangolquí, Ecuador. 1-34
- Periche, A., Castelló, M. L., Heredia, A. y Escriche, I. (2015). Influence of drying method on steviol glycosides and antioxidants in *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chemistry*, 172, 1–6.
- Preciado-Rangel, P. Baca-Castillo, G. A., Tirado-Torres, J. L., Kohashi-Shibata, J.,Tijerina-Chávez, L. y Martínez-Garza, A. (2003) Presión osmótica de la

- solución nutritiva y la producción de plántulas de melón. *Terra Latinoamericana*, 21(4): 461-470.
- Puri, M., Sharma, D. y Tiwari, A. K. (2011). Downstream processing of stevioside and its potential applications. *Biotechnology Advances*, 29(6): 781–791.
- Ramirez, G. (2011). Paquete tecnológico Estevia (*Stevia rebaudiana*) Establecimiento y mantenimiento. Programa estratégico para el desarrollo rural sustentable de la región sur - sureste de México: Tropicó Húmedo, 1–15.
- Ramya, M., Manogaran, S., Joey, K., Keong, T. W. y Katherasan, S. (2014). Studies on biochemical and medicinal properties of *Stevia rebaudiana* grown *in vitro*. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy*, 5(2): 169–174.
- Richman, A., Gijzen, M., Starratt, A. Yang, Z. y Brandle, J. (1999). Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway. *Plant Journal*. 19(4): 411-421.
- Salgado, L. (2013). Requerimiento de nitrógeno en la producción de *Stevia rebaudiana* Bertoni en hidroponía e invernadero. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco. Edo de México 60p.
- Sharma, A., Chen, C. R. y Vu Lan, N. (2009). Solar-energy drying systems: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 13(6-7): 1185–1210.
- Shock, C. C. (1982). Rebaudi's stevia: natural non-caloric sweeteners. *California Agriculture*, 36: 4-5.
- Smitha, G. R. y Umesha, K. (2011). Vegetative propagation of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) through stem cuttings. *Journal of Tropical Agriculture*, 50, 72–75.

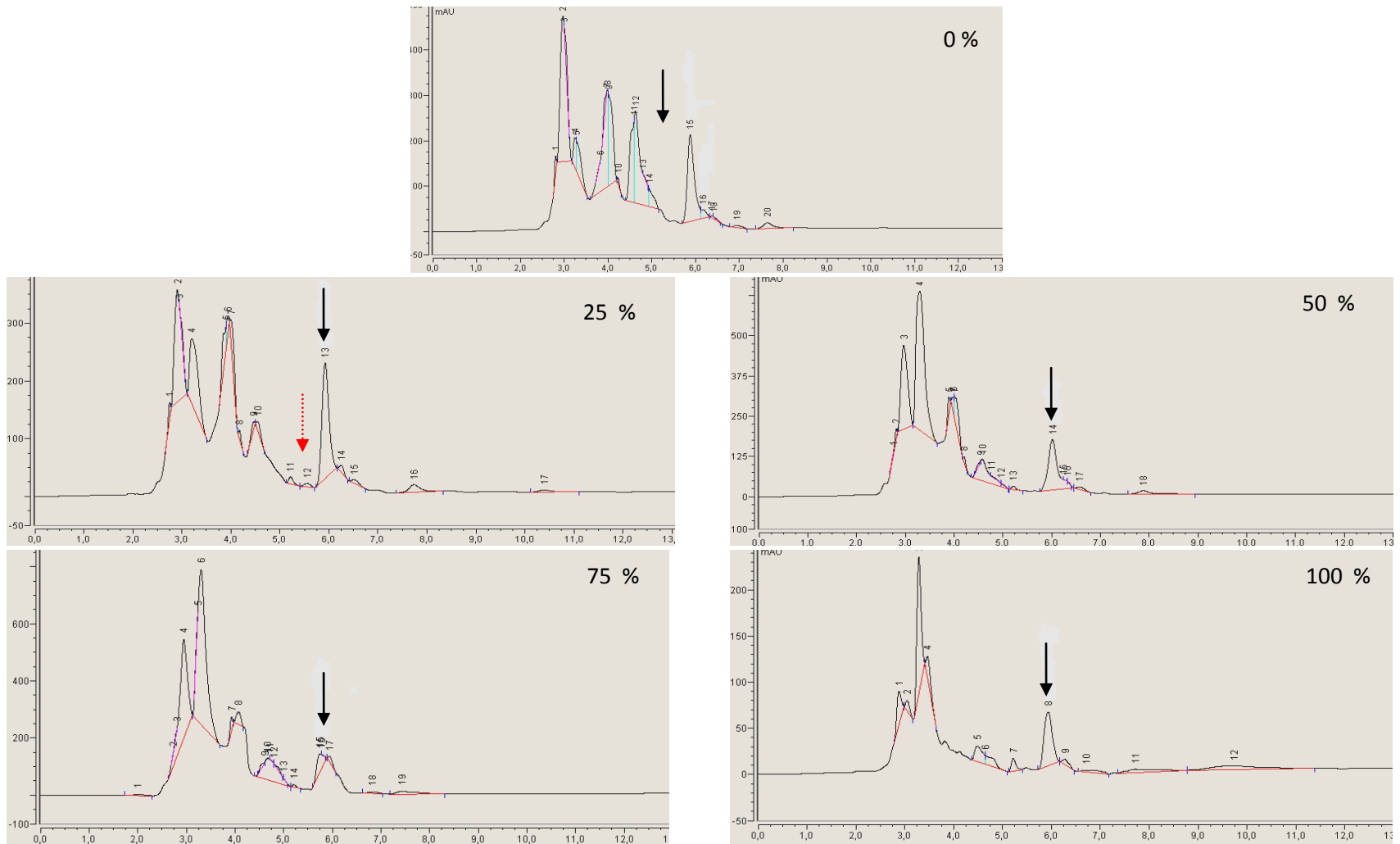
- Steiner, A. A. (1961). A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant and Soil*,15:134–154.
- Steiner A. A. (1966). The Influence of the chemical composition of a nutrient solution on the production of tomato plants. *Plant and Soil*. 24: 454-466
- Steiner A. A. (1984). The universal nutrient solution. 633-649. In: Proceedings of the 6th International Congress on Soilless Culture. ISOSC. Wageningen, The Netherlands.
- Suga, T. y Endo, T. (1991). Geranyl diphosphate synthase in leaves of *Pelargonium roseus*. *Phytochemistry*. 30(6), 1757-1761.
- Tavarini, S. y Angelini, L. G. (2013). *Stevia rebaudiana* Bertoni as a source of bioactive compounds: The effect of harvest time, experimental site and crop age on steviol glycoside content and antioxidant properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 2121–2129.
- Tavarini, S., Sgherri, C., Ranieri, A. M., y Angelini, L. G. (2015). Effect of Nitrogen Fertilization and Harvest Time on Steviol Glycosides, Flavonoid Composition, and Antioxidant Properties in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(31): 7041–7050.
- Taware, A. S., Mukadam, D. S., Chavan, a. M. y Taware, S. D. (2010). Comparative studies of *in vitro* and *in vivo* grown plants and callus of *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *International Journal of Integrative Biology*, 9(1), 10–15.
- Wölwer-Rieck, U. (2012). The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 886–895.
- Yadav, A. K., Singh, S., Dhyani, D. y Ahuja, P. S. (2011). A review on the improvement of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Canadian Journal of Plant Science*, 91, 1–27.


11. ANEXOS

Anexo 1. Reactivos utilizados en la preparación de la solución Universal de Steiner

Fuente	Fórmula	Marca
Macronutrientes		
Nitrato de Calcio	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	Fermont
Nitrato de Potasio	KNO_3	Fermont
Sulfato de Potasio	K_2SO_4	Sigma-Aldrich
Sulfato de Magnesio	MgSO_4	Fermont
Fosfato de Potasio	KH_2PO_4	Fermont
Micronutrientes		
Ácido Bórico	H_3BO_3	J.T. Baker
Cloruro de Manganeso	$\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Fermont
Sulfato de Zinc	ZnSO_4	Sigma-Aldrich
Sulfato de Cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich
Ácido Molibdico	$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Fermont

ANEXO 2. Cromatogramas de los extractos de plantas de *S. rebaudiana*, regados con la solución de Steiner en diferentes concentraciones y de muestras secadas en secador solar. Estevósido —●— Rebaudiosido A —●—



Cromatogramas de los extractos de plantas de *S. rebaudiana*, regados con la solución de Steiner en diferentes concentraciones y de muestras secadas en secador liofilizadora. Esteviósido  Rebaudiosido A 