

ADAPTACIÓN DE DOS CLONES DE ESTEVIA (*Stevia rebaudiana* Bert.)
A TRES AMBIENTES DEL CARIBE COLOMBIANO.

ALFREDO DE JESUS JARMA OROZCO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
ESCUELA DE POSGRADOS
DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
ÁREA AGRARIA - ÉNFASIS EN FISIOLOGÍA DE CULTIVOS
BOGOTÁ, D.C.
2010

ADAPTACIÓN DE DOS CLONES DE ESTEVIA (*Stevia rebaudiana* Bert.)
A TRES AMBIENTES DEL CARIBE COLOMBIANO.

ALFREDO DE JESUS JARMA OROZCO

Tesis de doctorado presentada como requisito parcial para optar al título de Doctor en
Ciencias Agropecuarias, énfasis Fisiología de Cultivos.

Director:

JAIRO FARID CLAVIJO PORRAS. Ph.D.

Codirectores

GERHARD FISCHER. Ph.D. y HERMES ARAMENDIZ TATIS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
ESCUELA DE POSGRADOS
DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
ÁREA AGRARIA - ÉNFASIS EN FISIOLOGÍA DE CULTIVOS
BOGOTÁ, D.C.
2010

“El presidente de tesis y el consejo examinador, no serán responsables de las ideas emitidas por el autor”.

(Artículo 217 de los Estatutos de la Universidad Nacional de Colombia)

A Dios, María Isabel, Betty y Sara

Por su apoyo, estímulo y sacrificio

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias a la colaboración de las siguientes personas y entidades:

Dr. Jairo Clavijo Porras, por la dirección de tesis, enseñanzas y asesoría.

Dres. Gerhard Fischer, Satnislav Margnistky por su apoyo y asesoría.

Dr. Hermes Aramendiz, por su apoyo y asesoría.

Dr. Fabio Da Matta M., por su apoyo y enseñanzas.

Dr. John Alarcón, por su apoyo.

Dra. Martha Henao, por su apoyo.

Universidad de Córdoba por la financiación de los trabajos de campo.

Corporación PBA por su apoyo.

Pequeños productores del Caribe colombiano.

Y a todas las demás personas que contribuyeron a la terminación exitosa de este trabajo.

ADAPTACIÓN DE DOS CLONES DE ESTEVIA (*Stevia rebaudiana* Bert.) EN TRES AMBIENTES DEL CARIBE COLOMBIANO

ADAPTATION OF TWO CLONES OF STEVIA (*Stevia rebaudiana* Bert.) IN THREE COLOMBIAN CARIBBEAN ENVIRONMENTS

RESUMEN

La estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.), es una planta herbácea perenne que pertenece a la familia de las Asteráceas. La especie cobra un alto valor debido a que contiene glucósidos de diterpeno bajos en calorías, cuyo poder edulcorante en estado puro y cristalino es 300 veces más potente que la sacarosa (0,4% en volumen) y cuyo contenido puede variar entre un 4 y 20% dependiendo del genotipo y las condiciones ambientales y de cultivo (Geuns, 2003). Se distingue de los edulcorantes artificiales por no tener sabor metálico y no ser cancerígeno. Los dos glucósidos principales son esteviósido (St) y rebaudiósido A (RebA), cuyos contenidos tradicionalmente son del 6–10% y 2-4% del peso seco de las hojas respectivamente (Jaitak *et al.*, 2008). Tanto las hojas como los extractos se han usado por muchos años en Suramérica, Asia, Japón, China y diferentes estados de EEUU. En Brasil, Korea y Japón, el edulcorante refinado es usado oficialmente como edulcorante bajo en calorías (Mizutani y Tanaka, 2002; Kim *et al.*, 2002); su uso se ha incrementado dramáticamente en la primera década del siglo, debido a la conciencia que ha despertado el uso de la sacarosa sobre la salud, en aspectos como caries, obesidad, diabetes, entre otros (Chatsudthipong y Muanprasat, 2009). Aunque el Caribe colombiano presenta una diversidad de zonas agroecológicas que la hacen apta para la explotación de diversos cultivos, la escasez de cultivos rentables y sostenibles entre otros problemas, ha generado altos niveles de pobreza y la reducción en el área cultivada en aproximadamente 380.000 hectáreas con la pérdida de más de cien mil empleos rurales; la región registra una desigualdad muy grande, comparable con países como Honduras y Senegal (Aarón y Kruscalla, 2004). Por lo anterior, esfuerzos institucionales que contribuyan a identificar cultivos alternativos de economía campesina y/o empresarial como la estevia, y que ayuden a superar estos indicadores, son necesarios, urgentes y hacen parte de la responsabilidad de los profesionales calificados en Ciencias Agrarias de la zona. Con el propósito de evaluar el efecto de la época de siembra (seca, de lluvias y de transición), del genotipo y de la población sobre la adaptabilidad, eficiencia fisiológica y la concentración de los principales glucósidos de la hoja (Reb-A y St), se realizó un primer trabajo que consistió en el establecimiento de tres experimentos en los Campos de Investigación de la Universidad de Córdoba, Montería-Colombia (8°52' N y 76°48' W), durante el 2006 (abril 2 - junio 13) y los semestres A y B de 2007 (febrero 20 - abril 17 y noviembre 20 - enero 30 respectivamente). Un segundo trabajo realizado en Casa de Vegetación de la misma Universidad, determinó el efecto de los elementos nutricionales sobre la calidad de la hoja. Los análisis químicos de los trabajos se realizaron en el Laboratorio de Suelos de la Universidad Nacional de Colombia y en el Laboratorio de Control de Calidad de la Empresa Prodalysa Ltda de Chile. El presente documento compila los trabajos de adaptación realizados en el Caribe colombiano con esta especie y los presenta en cinco capítulos; el primero aborda una introducción referida a los aspectos

principales de la estevia, su origen, historia, importancia económica, etc.; toca la problemática del Caribe colombiano y como estevia podría contribuir a superarla, presenta los principales avances de la investigación que ha desarrollado la Universidad de Córdoba en el manejo del cultivo y relaciona los objetivos que se plantearon en la presente investigación. En el segundo capítulo se presentan los resultados de la captación y uso de la radiación de los genotipos Morita 1 (M1) y Morita 2 (M2) en función de las dos épocas de siembra de 2007. Se usó un modelo matemático que calculó la tasa de acumulación diaria de masa seca (MS) en hojas y tallo a partir de la radiación fotosintéticamente activa (RFA), la fracción de la RFA interceptada por el dosel (FLINT) y el uso eficiente de la radiación (UER). En la siembra de febrero de 2007 se presentó un promedio de radiación de $3 \text{ MJ m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ más alto que en la siembra de noviembre. De manera independiente al genotipo o la población, el índice de área foliar IAF de la estevia cultivada en febrero ($3,12 \pm 0,02$), fue casi tres veces mayor respecto a la siembra de noviembre; el valor más alto del coeficiente de extinción de la luz a través del dosel (k), lo registró M2 (0,21), al cultivarse en febrero con una población de 25 plantas/ m^2 . En esta misma época se observaron los valores más altos del UER (2,04 g MJ RFA). El tercer capítulo registra los resultados del análisis de estabilidad fenotípica de los genotipos (M1 y M2) y las poblaciones (25; 12,5 y 6,25 plantas/ m^2), en las tres épocas de siembra mencionadas. Se utilizaron los criterios de estabilidad fenotípica propuestos por Lin y Binns (1988) y Carneiro (1998). Los resultados señalaron que M2, registra los mejores índices de estabilidad en el rendimiento de hoja seca/hectárea ($p \leq 0,01$), mayor relación hoja/tallo ($p \leq 0,01$) y mayor contenido de glucósidos totales GT ($p \leq 0,05$) cuando la oferta de la radiación es mayor y las poblaciones están entre 12,5 y 25 plantas/ m^2 . El cuarto capítulo aborda el efecto de las deficiencias nutricionales de N, P, K, Ca, S, Mg, Fe, B, Cu y Zn sobre la concentración de los glucósidos totales y de RebA de M2. Así mismo se presentan resultados del contenido de N, P, K, Ca y Mg de raíces, tallo y hojas de M1 y M2, hasta el momento de la cosecha (inicio de floración) y de la estimación de la extracción de estos elementos en una siembra comercial. Los resultados señalaron que la concentración de glucósidos totales (RebA y St) no se afectó por las deficiencias de nutrientes, aunque la concentración de RebA sólo se redujo ante deficiencias de P, S y Cu. Respecto a la distribución de los elementos mayores, se observó una tendencia diferencial entre genotipos. La extracción de nutrientes (kg/ha) para el primer corte de hojas de M1 y M2 fue respectivamente de 24,9 y 30,8 (N); 4,8 y 6,3 (P); 23,7 y 29,9 (K); 9,7 y 10,8 (Ca) y 6,7 y 6,3 (Mg). Por último el quinto capítulo determina el efecto de la RFA y las temperaturas máximas (T_{max}) y mínimas (T_{min}) sobre la concentración de GT y la proporción de sus dos principales componentes (St y RebA) en M1 y M2. Los resultados más importantes indicaron que la concentración de GT, es diferencial entre M1 y M2 al variar la oferta de RFA y temperaturas. En M1, aumentos en la RFA afectan positivamente la concentración de GT y este aumento se da de manera similar para St y RebA; las temperaturas tienen el mismo efecto sobre los GT pero está más relacionado con incrementos de St y no de RebA. En M2 también se observa una correlación positiva entre RFA y GT y al parecer las temperaturas no afectan esta concentración; sin embargo, la concentración de RebA se afecta negativamente en este genotipo cuando aumentan los niveles de RFA y temperaturas (máximas y mínimas).

Palabras clave: Interacción genotipo ambiente, glucósidos de esteviol, *Stevia rebaudiana*, nutrición mineral, uso eficiente de la radiación

ABSTRACT

Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) is a herbaceous perennial plant belonging to the Asteraceae family. The species takes a high value because it contains low calorie diterpene glycosides, whose sweetness in its purest and crystalline is 300 times more potent than sucrose (0.4% volume) and whose contents may vary between 4 and 20% depending on genotype and environmental conditions and cultivation (Geuns, 2003). It is distinguished from artificial sweeteners because they have no metallic taste and not carcinogenic. The two main glycosides are stevioside (St) and rebaudioside A (RebA), whose contents are traditionally 6-10% and 2-4% of leaf dry weight respectively (Jaitak *et al.*, 2008). Both the leaves and extracts, have been used for many years in South America, Asia, Japan, China and several U.S. states. In Brazil, Korea and Japan, the refined sweetener is used officially as low-calorie sweetener (Mizutani and Tanaka, 2002, Kim *et al.*, 2002); its use has increased dramatically in the first decade of the century, due to awareness that has aroused the use of sucrose on health in areas such as caries, obesity, diabetes, among others (Chatsudthipong and Muanprasat, 2009). Although the Colombian Caribbean presents a diversity of ecological zones that make it suitable for the operation of various crops, the scarcity of profitable and sustainable crop, among other problems, has generated high levels of poverty and the reduction in cultivated area in approximately 380,000 hectares, the loss of over a hundred thousand rural jobs; the region has a very large inequality, comparable with countries like Honduras and Senegal (Aaron and Kruscalla, 2004). Therefore, institutional efforts to help identify alternative crops of rural economy and / or business as stevia, and to help overcome these indicators are necessary, urgent and are part of the responsibility of professionals qualified in Agricultural Sciences. In order to evaluate the effect of sowing date, genotype and population on adaptability, physiological efficiency and concentration of the main glycosides of the leaf (RebA and St), was performed first job was in the establishment of three experiments in the Fields of Research at the University of Cordoba, Monteria, Colombia (8 ° 52 'N and 76 ° 48' W) during 2006 (April 2-June 13) and semesters A and B of 2007 (February 20 - April 17 and November 20 to January 30 respectively). A second work in the greenhouse at the University, determined the effect of nutritional factors on the quality of the leaf. Chemical analysis of the works was performed in the Soil Laboratory of the National University of Colombia and the Quality Control Laboratory of Prodalya Company of Chile Ltda. This document compiles the adaptation work's made in the Colombian Caribbean with this species and presented in five chapters: the first deals with an introduction covering the main aspects of stevia, its origin, history, economic importance, Touched approaches the problems of the Colombian Caribbean and as stevia may help to overcome it, presents the main developments in research that developed the University of Cordoba in crop management and lists the objectives that emerged from this research. In the second chapter presents the results of the recruitment and use of radiation Morita 1 (M1) and Morita 2 (M2) genotypes as a function of the two planting seasons of 2007. A mathematical model was used to calculate the daily accumulation rate of dry matter (DM) in leaves and stems after the photosynthetic active radiation (PAR), the fraction of intercepted PAR by the canopy ($FLINT$) and the radiation use efficient (RUE). In the planting of February 2007 showed a mean radiation of $3 \text{ MJ m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ higher than November planting. Independently of the genotype or population, leaf area index LAI stevia grown in February (3.12 ± 0.02), was almost three times longer than planting in November; the highest coefficient light extinction through the canopy (k), as recorded M2 (0.21), upon cultivation in February with a population of 25 plants/ m^2 . At this time there were higher values of the RUE (2.04 g MJ PAR). The third chapter records the results of the analysis of phenotypic stability of genotypes (M1 and M2) and populations (25, 12.5 and 6.25 plants/ m^2) in the three seasons. We used the phenotypic stability criteria proposed by Lin and Binns (1988) and Carneiro (1998). The

results showed that M2, recorded the highest levels of stability in the dry leaf yield per hectare ($p \leq 0.01$), greater leaf /stem ratio ($p \leq 0.01$) and higher content of total glycosides GT ($p \leq 0.05$) when the supply radiation is higher and populations are between 12.5 and 25 plants/m². The fourth chapter addresses the impact of nutritional deficiencies of N, P, K, Ca, S, Mg, Fe, B, Cu and Zn on the concentration of total glycosides and RebA in M2. It also presents results of the N, P, K, Ca and Mg content of roots, stems and leaves of M1 and M2, at the time of harvest (beginning of flowering) and the estimation of the extraction of these elements in a commercial planting. The results showed that the concentration of total glycosides (RebA and St) was not affected by nutrient deficiencies, although the concentration of RebA was reduced only to deficiencies of P, S and Cu. Regarding the distribution of major elements, there was a trend difference between genotypes. The extraction for M1 and M2 were respectively 24.9 and 30.8 (N), 4.8 and 6.3 (P), 23.7 and 29.9 (K), 9.7 and 10.8 (Ca), 6.7 and 6.3 (Mg).

Finally the fifth chapter determines the effect of the PAR and maximum (Tmax) and minimum (Tmin) temperatures on the concentration of GT in M1 and M2, and the proportion of its two main components (St and RebA). The results revealed that the concentration of GT, is spread between M1 and M2 to vary the supply of PAR and temperatures. In M1, PAR increases affecting positively the concentration of GT and this increase occurs similarly for St and RebA, the temperatures have the same effect on the GT but is more related to increases of St. In M2 there is also a positive correlation between PAR and GT and apparently the temperatures do not affect this concentration, however, the concentration of RebA is negatively affected in this genotype when increased levels of PAR and temperatures (maximum and minimum).

Key words: Genotype environment interaction, Steviol glycosides, *Stevia rebaudiana*, Mineral nutrition, Radiation use efficient.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. CAPITULO 1. INTRODUCCION GENERAL.....	17
1.1.Introducción.....	17
1.2.Planteamiento del problema.....	18
1.3.Información sobre <i>Stevia rebaudiana</i> Bert.....	20
1.3.1. Historia.....	20
1.3.2. Características de la especie.....	20
1.3.3. Clasificación sistemática.....	20
1.3.4. Descripción botánica.....	21
1.4.Estevia, alternativa de producción en el Caribe colombiano.....	22
1.5.Objetivos.....	23
1.5.1. Objetivo general.....	23
1.5.2. Objetivos específicos.....	23
1.6.Literatura citada.....	24
2. CAPITULO II. ESTABILIDAD FENOTÍPICA DE GENOTIPOS Y POBLACIONES DE ESTEVIA (<i>Stevia rebaudiana</i> Bert.) EN EL CARIBE COLOMBIANO.....	26
2.1. Resúmen.....	26
2.2. Abstract.....	26
2.3. Introducción.....	27
2.4. Materiales y métodos.....	28
2.4.1. Localización y material experimental.....	28
2.4.2. Análisis de la información.....	29
2.5. Resultados y discusión.....	30
2.5.1. Relación hoja/tallo.....	31
2.5.2. Rendimiento de hoja seca por hectárea.....	33
2.5.3. Glucósidos totales.....	35
2.6. Conclusiones.....	36
2.7. Agradecimientos.....	36
2.8. Literatura citada.....	37
3. CAPITULO III. CAPTACIÓN Y USO DE LA RADIACIÓN EN PLANTAS DE <i>Stevia rebaudiana</i> Bert. EN EL CARIBE HÚMEDO COLOMBIANO.....	44
3.1. Resúmen.....	44

3.2.	Abstract.....	44
3.3.	Introducción.....	45
3.4.	Materiales y métodos.....	46
	3.4.1. Localización y material experimental.....	46
	3.4.2. Muestras del material vegetal.....	46
	3.4.3. Componentes del modelo.....	46
	3.4.4. Análisis de la información.....	47
3.5.	Resultados y discusión.....	47
	3.5.1. Radiación fotosintéticamente activa.....	47
	3.5.2. Fracción de luz interceptada.....	47
	3.5.3. Coeficiente de explotación de la radiación.....	49
3.6.	Conclusiones.....	51
3.7.	Literatura citada.....	51
4. CAPITULO IV. CONTENIDO DE GLUCÓSIDOS EN FUNCIÓN DE DEFICIENCIAS NUTRICIONALES EN <i>Stevia rebaudiana</i> Bert.....		55
4.1.	Resumen.....	55
4.2.	Abstract.....	55
4.3.	Introducción.....	56
4.4.	Materiales y métodos.....	56
	4.4.1. Localización y material experimental.....	56
	4.4.2. Glucósidos en función de deficiencias nutricionales.....	56
	4.4.3. Distribución de nutrientes en función del órgano y la edad.....	57
4.5.	Resultados y discusión.....	58
	4.5.1. Glucósidos en función de deficiencias nutricionales.....	58
	4.5.2. Distribución de nutrientes en función del órgano y la edad....	61
	4.5.2.1. Nitrógeno.....	61
	4.5.2.2. Fósforo.....	61
	4.5.2.3. Potasio.....	61
	4.5.2.4. Calcio.....	62
	4.5.2.5. Magnesio.....	63
	4.5.3. Exportación de nutrientes.....	62
4.6.	Conclusiones.....	64
4.7.	Agradecimientos.....	64
4.8.	Literatura citada.....	64
5. CAPITULO V. TEMPERATURAS Y RADIACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE GLUCÓSIDOS EN <i>Stevia rebaudiana</i> EN EL CARIBE HÚMEDO COLOMBIANO.....		68
5.1.	Resumen.....	68

5.2.	Abstract.....	68
5.3.	Introducción.....	69
5.4.	Materiales y métodos.....	70
	5.4.1. Localización y material experimental.....	70
	5.4.2. Contenido de glucósidos.....	71
5.5.	Resultados y discusión.....	71
	5.5.1. Glucósidos totales.....	73
	5.5.2. Rebaudiósido A y relación rebaudiósido A/esteviósido.....	74
5.6.	Conclusiones.....	75
5.7.	Literatura citada.....	75
6.	DISCUSION GENERAL.....	80
7.	CONCLUSIONES GENERALES.....	83
8.	Literatura general citada.....	85

LISTA DE TABLAS

TABLA 1.1. Clasificación sistemática de <i>Stevia rebaudiana</i> Bert.....	20
TABLA 2.1. Promedios diarios de radiación fotosintéticamente activa RFA ($\text{MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$), temperaturas máximas y mínimas ($^{\circ}\text{C}$) y totales de precipitación y evaporación (mm), en tres épocas de siembra de estevia en el Caribe colombiano.....	29
TABLA 2.2. Significancia estadística de variables de producción de estevia en función de la época, el genotipo y la población por hectárea. Montería – Córdoba, 2006-2007.....	30
TABLA 2.3. Relación hoja/tallo de estevia en función de la época, el genotipo y la población por hectárea. Montería – Córdoba, 2006-2007.....	31
TABLA 2.4. Rendimiento de hoja seca de cultivares de estevia (kg/ha), parámetros de estabilidad para condiciones generales (Pig) según Lin y Binns (1988) y para condiciones ambientales favorables (Pif) y desfavorables (Pid), según Carneiro (1998).....	33
TABLA 3.5. Rendimiento de hoja seca de poblaciones de estevia (kg ha^{-1}), parámetros de estabilidad para condiciones generales (Pig) según Lin y Binns (1988), y para condiciones ambientales favorables (Pif) y desfavorables (Pid), según Carneiro (1998).....	33
TABLA 3.1. Promedios diarios de radiación fotosintéticamente activa RFA ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), temperaturas máximas y mínimas ($^{\circ}\text{C}$) y totales de precipitación y evaporación (mm), en dos épocas de siembra de estevia en el Caribe colombiano.....	46
TABLA 3.2. Significancia estadística de variables ecofisiológicas de estevia en función de la época, el genotipo y la población por hectárea. Montería – Córdoba, 2007.....	49
TABLA 3.3. Comparación de medias de parámetros fisiológicos de estevia en función de la época, el genotipo y la población por hectárea. Montería – Córdoba, 2007.....	50
TABLA 4.1. Solución madre de Johnson (adaptada por De Lima y Malavolta en 1997).....	57
TABLA 4.2. Significancia estadística de variables de calidad de la hoja de estevia en función de 11 tratamientos de deficiencias nutricionales. Montería – Córdoba, 2006-2007.....	58

TABLA 4.3. Relación RebA/St en hojas de estevia sometidas a deficiencias nutricionales. (Montería - Córdoba, 2008).....	60
TABLA 4.4. Masa seca hojas (g/planta) y concentración de elementos mayores (g/kg de masa seca) en plantas de dos genotipos de estevia (Montería - Córdoba, 2008).....	63
TABLA 5.1. Promedios diarios de radiación fotosintéticamente activa RFA ($\text{MJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$) y temperaturas máximas y mínimas ($^{\circ}\text{C}$) en tres épocas de siembra de estevia en el Caribe Húmedo colombiano. Montería – Córdoba, 2006-2007.....	71
TABLA 5.2. Significancia estadística de los cuadrados medios de glucósidos totales (g/g hoja seca), rebaudiósido A (g/g GT) y relación rebaudiósido A /estaviósido de dos genotipos de estevia sembrados en tres épocas del Caribe Húmedo colombiano. Montería – Córdoba, 2006-2007.....	72
TABLA 5.3. Análisis de la interacción Época x Genotipo de promedios de variables de calidad de la hoja de dos genotipos de estevia sembrados en tres épocas del Caribe Húmedo colombiano. Montería – Córdoba, 2006-2007.....	72
TABLA 5.4. Coeficientes de correlación de Pearson $N=36$ y $\text{Pr} > r $ de variables ambientales y de calidad de la hoja de dos genotipos de estevia cultivados en tres ambientes del Caribe Húmedo colombiano. Montería – Córdoba, 2006-2007.....	73

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1. Glucósidos totales de estevia (g/g de masa seca de hoja) en función de los factores época (E1, E2 y E3) y genotipo (M1 y M2). Montería – Córdoba, 2006-2007.....	35
FIGURAS 3.1 y 3.2. Índice de área foliar (IAF) y fracción de luz interceptada (FLINT) por dos genotipos de estevia cultivados entre febrero y abril de 2007 (2.1), y entre noviembre de 2007 y enero de 2008 (2.2), bajo tres densidades de población (A, B y C = Morita 1 a 25, 12,5 y 6,25 plantas/m ² respectivamente; D, E y F = Morita 2 a 25, 12,5 y 6,25 plantas/m ² respectivamente).....	48
FIGURA 4.1. Concentración de rebaudiósido A en hojas de estevia sometidas a deficiencias nutricionales (Montería-Córdoba, 2008).....	59
FIGURA 4.2. Concentración de elementos mayores (g/kg de masa seca) en tres órganos de dos genotipos de estevia en función del tiempo. Líneas continuas: Morita 1; Líneas discontinuas: Morita 2. (Montería – Córdoba, 2008).....	62

SÍMBOLOS Y ABREVIACIONES

IAF	Índice de área foliar ($m^2 \cdot m^{-2}$)
RFA	Radiación fotosintéticamente activa
M1 y M2	Morita 1 y Morita 2
E1, E2 y E3	Época 1, Época 2 y Época 3
MS	Masa seca
FLINT	Fracción de la RFA interceptada por el dosel
k	Coefficiente de extinción de la luz en el dosel de la planta
MJ	Mega Joules
UER	Uso eficiente de la radiación
SD	Desviación estándar de la muestra
δW_t	Incremento diario del crecimiento ($g m^{-2} d^{-1}$)
Reb-A	Rebaudiósido A
St	Esteviósido
GT	Glucósidos totales
P_{ig}	Estadístico del parámetro de estabilidad del cultivar i
X_{ij}	Respuesta de la variable dependiente del i – <i>ésimo</i> cultivar o población en la j – <i>ésima</i> época
M_j	Respuesta máxima observada entre todos los cultivares y poblaciones en la época j
P_{if}	Estadístico de P_{ig} para cultivares y poblaciones favorables
P_{id}	Estadístico de P_{ig} para cultivares y poblaciones desfavorables
RHS	Rendimiento de hoja seca (kg/ha)
RHT	Relación hoja/tallo
UE	Unidad experimental
EAA	Espectrofotometría de absorción atómica
ANAVA	Análisis de varianza
DMS	Diferencia mínima significativa
TE	Testigo experimental
AMV	Ácido mevalónico
IPP	Isopentenil-pirofosfato
FPP	Farnesil-pirofosfato

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 INTRODUCCIÓN

Stevia rebaudiana Bert., es una planta herbácea perenne que pertenece a la familia de las Asteráceas. Esta familia incluye plantas tan conocidas como el Diente de León, girasol, achicoria y crisantemo. Crece como arbusto salvaje en el suroeste de Brasil y zona norte del Paraguay, donde ha sido ampliamente utilizada durante siglos en sus prácticas nutricionales y medicinales, por los indios Guaraníes los cuales la llamaron Ka`a He`e o “hierba dulce”. Cobra un alto valor entre los vegetales nativos de estos países, debido a que contiene un glucósido 100% natural, no tiene calorías y puede llegar a ser hasta 300 veces más dulce que la sacarosa y, comparativamente, es similar al aspartame pero sin peligro para la salud humana (Prakash *et al.* 2008). Se distingue de los edulcorantes artificiales por no tener sabor metálico y no ser cancerígeno. El esteviósido puede utilizarse como edulcorante en mermeladas, caramelos, chicles, helados, jugos de frutas, salsas agrídulces, gaseosas y dentríficos, entre otros. También tiene uso medicinal, pues posee propiedades terapéuticas para diabetes por ser hipoglucemiante; obesidad, por no aportar calorías al ser metabolizado; acidez estomacal, por ser antiácido; anticaries, por no ser fermentado por las bacterias orales (Schewebel, 2005; Tadhani *et al.* 2007). Adicionalmente, las labores que demanda el cultivo (siembras, podas, controles fitosanitarios, beneficio, etc.), se convierten en un sistema altamente generador de empleos rurales (Jarma, 2008).

Síntesis de los glucósidos. Los componentes edulcorantes de las hojas de Stevia son glucósidos de diterpeno sintetizados, al menos en los estados iniciales, usando la misma ruta del ácido giberélico. Estos diterpenos se sintetizan a partir de unidades de acetato del acetyl coenzima A en la ruta del ácido mevalónico (MVA). Este último ingresa al cloroplasto y se convierte en pirofosfato de isopentenilo (IPP), luego en pirofosfato de geranylgeranilo (un compuesto de 20 carbonos, sirve como donador de todos los átomos de carbono de las giberelinas), más tarde se convierte en pirofosfato de copalillo (con dos sistemas de anillos) y por último en kaureno, un compuesto que tienen 4 sistemas de anillos. El kaureno es el compuesto donde divergen los glucósidos de esteviol y las giberelinas; en estevia el kaureno es convertido a esteviol (espina dorsal de los glucósidos de diterpeno) en el retículo endoplásmico; dicho esteviol puede ser glucosilado o rhamnosilado en el aparato de golgi, para formar los principales edulcorantes como el esteviósido, rebaudiósido A y C, y dulcósido A, los cuales van finalmente a las vacuolas (Brandle y Telmer, 2007). El propósito de estos compuestos en la planta de estevia no está todavía claro, pero su alta concentración en la hoja y la conservación de la ruta dentro de las especies indicaría que, en algún momento del proceso evolutivo, su presencia confirió una ventaja significativa en los individuos que los poseyeron. Algunos investigadores afirman que actúan para rechazar ciertos insectos y otros especulan que es un mecanismo detallado para controlar los niveles de ácido giberélico (Brandle, 2005).

Comercialización en Colombia. En el país no existe una información cuantitativa respecto a los volúmenes de comercialización de estevia, sin embargo actualmente se vende en cadenas de almacenes, herboristerías y tiendas naturistas. En el medio existen pocas marcas, donde la tecnología utilizada una de otra dista bastante (color, olor, sabor y presentación del producto). Son escasas (1 o 2) las marcas que han logrado un

producto medianamente competitivo a nivel internacional, por las características y presentación. En datos aislados en Internet, se muestra interés de compradores por hojas secas de estevia, en volúmenes que van hasta las 100 ton (comercializadores, productores y transformadores como Bioestevia en el Valle del Cauca y Dulceestevia en Santander). Así mismo, no existen datos estadísticos sobre importaciones del producto. Se sabe, mas no existen cifras concretas, que por no haber suficiente oferta nacional hay importación de la hoja desde Brasil y Paraguay principalmente (Eafit, 2004).

Comercialización en el mundo. El mayor productor de hojas del mundo es Brasil, seguido por China, Tailandia, Paraguay, Uruguay e Israel. También hay sembrados en Centroamérica, Estados Unidos, Canadá, España, Japón, Taiwán, Singapur, Laos, Malasia, Nueva Guinea, Corea del sur, Sri-Lanka, Filipinas e Indonesia. Esta dispersión de cultivos señala la adaptabilidad asombrosa de la planta sembrada a diversas condiciones de clima. Según Eafit (2004), el consumo internacional se concentra en la Unión Europea, EE.UU., China, Australia y especialmente Japón, que a pesar de tener fábricas para la extracción del esteviósido, es insuficiente para satisfacer su mercado interno (se estima que el consumo anual de esteviósidos en el Japón es de 50 Toneladas año con un valor aproximado de \$240 millones de dólares americanos).

Universidad de Córdoba. En Colombia, la Universidad de Córdoba ha venido desarrollando durante ocho años, trabajos de investigación con esta especie, que apuntan a definir los paquetes tecnológicos de manejo agronómico (requerimientos nutricionales, respuesta a la radiación, tipos de suelo, entre otros) y, aunque es consciente que aún faltan muchos aspectos por cubrir, los resultados obtenidos permiten estimar como viable la posibilidad de cultivarse en la Costa Atlántica Colombiana (Jarma, 2008).

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Caribe Colombiano presenta una diversidad de zonas agroecológicas que la hacen apta para la explotación de diversos cultivos. Sin embargo, la pérdida de competitividad de los sistemas de producción tradicionales por causa del equívoco manejo de los cultivos, tales como el impacto negativo causado a las propiedades físico químicas de los suelos que traen como consecuencia la pérdida de la fertilidad, el alto costo que tiene el uso de los agroquímicos y la baja rentabilidad que ofrecen los cultivos tradicionales en los mercados, han generado la reducción del área cultivada en aproximadamente 382.428 hectáreas y la pérdida de más de 100.000 empleos rurales directos.

Se calcula que el área de los cuatro departamentos costaneros es de 6.4 millones de hectáreas, de las cuales más de 3.4 millones se encuentran en pastos (53%) y sólo alrededor de 550.000 hectáreas (9.4%), están dedicadas a la explotación agrícola, principalmente a cultivos transitorios sin planes adecuados de manejo sostenible y ambientales tales como algodón, arroz, sorgo y maíz y en menor proporción, a cultivos permanentes entre los que se destacan algunos frutales, yuca, plátano, cacao y ñame. El resto corresponde a bosques naturales, rastrojos, pastos no mejorados, vegetación de pantano, etc.

En la región la pobreza medida por el nivel de ingresos mostró un aumento significativo en la década de los noventa. En efecto, de 5.101.506 personas en estado de pobreza en 1997 (60% de la población total), se pasó a 5.772.782 en el 2000 (63.8% de la población), lo que significa que en el año 2000, 2 de cada 3 habitantes de la región se encuentran bajo la línea de pobreza. Solamente en cuatro años, la región incrementó el número de pobres en 13.2%, es decir, alojó 671.276 nuevas personas en estado de pobreza. De forma similar, la miseria se ha incrementado significativamente. De 1997 a 2000, la región Caribe pasó de albergar 2.103.714 personas en condiciones de miseria (25% de la población total) a tener 2.347.615 (26% de la población). Dicho de otra manera, en este lapso, el número de personas en estado de miseria se incrementó en 12% (243.901 nuevas personas en condiciones de miseria). En el Caribe colombiano, 1 de cada 4 personas se encuentra en condiciones de miseria. De acuerdo a la clasificación por distribución del ingreso, el Caribe colombiano registra una desigualdad muy grande, comparable con países como Honduras y Senegal (Aarón y Kruscalla, 2004).

Los departamentos de la región que tienen el mayor porcentaje de su población en estado de pobreza son Córdoba y Sucre, donde cerca del 70% de su población se encuentra en condiciones de pobreza. En general, los registros de pobreza por nivel de ingresos (líneas de pobreza y miseria) para la región en todos los años analizados han sido superiores al promedio nacional.

Entre los departamentos de la región, solamente Atlántico ostenta un Índice de Desarrollo Humano (IDH) cuyo resultado iguala en la mayoría de los años el registro obtenido a nivel nacional. Por su parte, en el último año de análisis, los departamentos de Sucre (0.70), Córdoba (0.71), Magdalena (0.72), se encuentran en la frontera más baja del rango de desarrollo humano medio. A nivel internacional, el IDH de la región Caribe colombiana en 1999 se iguala a los índices de países como Sri Lanka, Paraguay y Jamaica, y se sitúa por debajo de países como Costa Rica, Panamá y Venezuela (PNUD, 2001).

El sector agropecuario regional pasó de representar 20.7 de la producción bruta regional en 1990 a 16.7% en 1998, es decir, en nueve años este sector pierde 4 puntos porcentuales de participación, situación que se ha reflejado en el aumento de la pobreza rural, degradación del medio ambiente y la forzada migración de la mano de obra desplazada hacia los principales centros urbanos de la región.

Es de anotar que más del 50% del gasto total de las familias de la región se destina al consumo de alimentos. La composición de la dieta alimentaria se fundamenta en el consumo de carbohidratos procedentes del plátano, yuca, ñame y arroz (LACEA/BID/BIRD, 2005). El uso y la sobre-explotación de los agro ecosistemas caribeños, por parte de las 18.500 familias campesinas de escasos recursos económicos que cultivan áreas entre 0,5 y 2,0 hectáreas, se caracteriza por la producción estacionaria y la atomización de la oferta, alta permeabilidad de los productos, pérdida post cosecha, alto grado de deterioro en los recursos. El suelo tiene en su mayoría pendientes fuertes y se observan altos niveles de contaminación de fuentes naturales de agua, además, bajo uso de tecnologías sostenibles y escasa infraestructura de la producción, lo cual se

agrava por la débil estructura organizacional entre ellos. Lo anterior requiere de un nuevo patrón de uso racional de los agro ecosistemas e implica la búsqueda de nuevas especies promisorias que se puedan establecer como una alternativa para el pequeño campesino y para la agroindustria, y obliga a considerar nuevas estrategias de producción más sostenibles para las regiones agrícolas de esta zona del país. Estas actividades además de conservar los recursos naturales, deben ser lo suficientemente rentables para sustituir aquellos cultivos que no satisfagan las necesidades básicas de los pequeños productores y contribuir a reducir las migraciones del campo a la ciudad, disminuyendo así problemas sociales en áreas urbanas con efectos positivos en la reducción de la tasa de desempleo, que supera el 20% y afecta el desarrollo agrícola e industrial del país.

1.3 INFORMACIÓN SOBRE *Stevia rebaudiana* Bert.

1.3.1. Historia

El Ka'a He'ê es una planta fanerógama, dicotiledónea, del orden de las campanulares de la familia de las Asteraceae (anteriormente compositaseas), clasificada por primera vez en el año 1899 por Moisés S. Bertoni, quien partiendo de una pequeña muestra de inflorescencia muy deficiente e incompleta hace un primer estudio sistemático de la planta denominada "*Empatorium rebaudianum* Bert." (Aranda, 1946). Esta denominación fue en homenaje al químico paraguayo Ovidio Rebaudi, quien realizó los primeros análisis químicos en el año 1905 en posesión de una planta viva que florece. Bertoni hace revisión de su primer estudio hallando que efectivamente se trataba de una Eupatorae, pero del género *Stevia* y como tal la publicó (Bertoni, 1905). Desde entonces se la conoce con el nombre *Stevia rebaudiana* Bertoni.

1.3.2. Características de la especie

Estevia es una planta obligada de días cortos con una duración crítica del día de aproximadamente 13 h y una extensa variabilidad dentro de las poblaciones (Valio y Rocha 1966). Las plantas pueden iniciar floración después de tener un mínimo de cuatro hojas verdaderas (Carneiro, 1990). Sumida (1980), en estudios genéticos de cruces dialélicos con 8 padres, encontró que el porcentaje de autopolinización fue entre 0 y 0.5%, mientras los porcentajes de polinización cruzada fueron de 0.7 a 68.7%, sugiriendo que existe alguna forma de auto incompatibilidad. La anatomía reproductiva de los gametofitos masculino y femenino es típica para las angiospermas (Shaffert y Chetobar, 1994). Estevia es diploide y tiene 11 cromosoma apareados, lo cual es característico para la mayoría de los miembros suramericanos del género (Frederico *et al.* 1996).

1.3.3. Clasificación sistemática

TABLA 1.1. Clasificación sistemática de *Stevia rebaudiana* Bert.

Clasificación Botánica	Angiospermas
Subdivisión	Spermatophyta (plantas de semilla)
Grupo de Clasificación	Dicotyledoneae
Serie:	Multiaristae.
Tribu:	Eupatorieas.
Familia:	Compuestas: Asteraceae de Monochlamydeae
Orden	Campanulales
Género:	<i>Stevia</i> .
Especie:	<i>Rebaudiana</i> .
Sinónimos:	<i>Rebaudianum de Eupatorium</i> .
Nombres comunes:	<i>Stevia</i> , hoja dulce de Paraguay, caa él éé, jheéé de kaa, ca un jhei, Ka'a He'ê ca un yupi, azucacaa, caa de eira, doce de capim, doce de erva, hierba de dulce, yerba de miel, honeyleaf, waan de yaa, hoja de dulces.

1.3.4 Descripción botánica

Es una planta subfruticosa, con tallo anual, subleñosa, levemente piloso en las extremidades, es ramificado formando múltiples brotes con tendencia a inclinarse pudiendo alcanzar hasta 80 cm. de altura.

- La raíz es perenne, fibrosa, filiforme, abundante, formando cepa.
- Las hojas son pequeñas, lanceoladas, muy dulces, festoneadas, opuestas en verticilos alternados, sésiles. La parte más ancha de la hoja se encuentra en la mitad de la parte superior.
- Las flores se hallan dispuestas en capítulos pequeños terminales o axilares, agrupados en panículas corimbosas, de lóbulos blancos.
- El fruto es un aquenio delgado y plumoso

1.4 Importancia económica de la especie

Según la F.A.O el mundo consume anualmente en endulzantes (Eafit, 2004):

- Azúcar (80 %): 135.000.000 Ton
- Derivados Maíz (8 %): 13.500.000 Ton
- Edulcorantes químicos (12 %): 20.250.000 Ton

Los economistas estiman que a mediano plazo, estevia podría participar del uno por mil del mercado de edulcorantes químicos, lo que equivaldría a 20.250 Ton anuales que demandarían 202.500 Ton de hojas secas.

Según Eafit (2004), El mercado total de edulcorantes de alto poder y bajo contenido calórico, es equivalente a entre 12 a 15 millones de kg de esteviósido por año. La conquista de una pequeña fracción de este volumen, por el esteviósido, representaría cifras significativas.

Teniendo en cuenta que los tres productos edulcorantes que dominan el mercado mundial, especialmente en los países occidentales, cuentan con serios cuestionamientos por sus propiedades nocivas para la salud, las posibilidades del esteviósido como sustituto de los mismos son buenas, presentándose como su principal limitación la imposibilidad de provisión de materia prima en tan gran escala. Además, antes de entrar a competir en el mundo occidental industrializado, deberá pasar por todas las pruebas previas a su aprobación, especialmente las de la Food and Drug Administration de EE.UU.

Como se mencionó anteriormente, el consumo se concentra en Japón, la Unión Europea, EE.UU., China, Australia. Las posibilidades de expansión se dan en los actuales mercados de consumo, siendo Japón el país con mayores posibilidades de expansión del consumo. Se estima el consumo anual de esteviósidos en el Japón es de 50 Toneladas año con un valor aproximado de \$240 millones de dólares americanos y se sabe, que este país ha realizado algunas operaciones comerciales con vecinos de Colombia como Brasil (Mato Grosso do Sul) y Paraguay.

La inclusión que hizo Gran Bretaña del producto en el manual de la *Royal Pharmaceutical Society of Great Britain*, así como la aprobación por la FDA como producto medicinal, son datos que demuestran la existencia de posibilidades en ambos mercados (Eafit, 2004).

En Centroamérica, la población de diabéticos y personas con problemas de peso, asciende a 3.5 millones de un total de 30 millones. Si se considera que el consumo promedio por persona es de 300 mg de estevia como edulcorante por día, la demanda total del edulcorante se calcula en 1,050 kg por día. Si se llega a alcanzar un 20% de este mercado, se necesitarían aproximadamente 200 kg de esteviósidos al día. Por otra parte, al estimar como rendimiento promedio 2,500 kg de hoja por hectárea al año (se necesitan alrededor de 10 kg de hoja para producir 1 kg de esteviósidos), se propone sembrar alrededor de 292 hectáreas de estevia para satisfacer tal demanda (Eafit, 2004).

1.5 Estevia, alternativa de producción en el Caribe colombiano

Dentro de los trabajos de investigación que ha realizado la Universidad de Córdoba resaltan:

- a) Requerimientos nutricionales del cultivo. Se evaluó la respuesta de la planta a la aplicación de diferentes dosis de nitrógeno, fósforo y potasio. Los resultados más importantes indicaron que las dos variedades de estevia evaluadas (Morita 1 y Morita 2), respondieron de manera diferencial a la aplicación de los nutrientes individuales y sus combinaciones, siendo Morita 2 la de mejor respuesta en rendimiento de masa seca de hojas (Galván *et al.* 2003). Sin embargo, en este trabajo no se consideraron las curvas de absorción o la distribución de los elementos dentro de la planta.

- b) Comportamiento de dos variedades *Stevia rebaudiana* Bert., bajo diferentes niveles de radiación incidente. Se sometieron las plantas a 100%, 62%, 57% y 20% de radiación incidente y se encontró que los rendimientos de masa seca de la especie, responden positiva y proporcionalmente al aumento de la radiación (Rengifo *et al.* 2003).
- c) Crecimiento y desarrollo de dos variedades de *Stevia rebaudiana* Bert., en tres tipos de suelos. Las plantas fueron establecidas en suelo arenoso, franco y arcilloso. Los resultados indicaron que no se presentan diferencias significativas entre los tipos de suelo, sin embargo es necesario reevaluar ya que se reporta por literatura internacional un mejor comportamiento en suelos de textura liviana (Vergara *et al.* 2003).
- d) Estudios de reconocimiento de enfermedades limitantes en el cultivo de *Stevia* en el departamento de Córdoba, permiten concluir que estas varían de acuerdo a las condiciones de humedad, temperatura, tipo de suelo, riego reportándose como los factores más esenciales. Así mismo, los principales agente causales de bajos rendimientos en el cultivo son: *Sclerotium*, *Fusarium*, *Choanephora*, *curvularia* y *corynespora* (Jarma, 2008).

En la Universidad de Córdoba, adicionalmente se han realizado otros trabajos en la utilización de estevia como edulcorante en la elaboración de néctares, mermeladas y conservas con los siguientes resultados:

- Es posible obtener productos vegetales como néctar y mermelada de guayaba dulce edulcorados con estevia, en los cuales se sustituye un porcentaje de sacarosa por estevia con adecuadas características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales. La estabilidad y conservación del néctar depende en gran proporción de su contenido de sólidos solubles, pero debido a la baja concentración de estos, sus grados Brix no serán suficientes para mantenerlo estable en un periodo largos de tiempo.
- Con la utilización de estevia se podrá reemplazar los edulcorantes artificiales como Sacarina y el Aspartame, los cuales son empleados comúnmente para endulzar alimentos procesados, logrando incursionar en el mercado con un producto que cumple con la misma función de forma natural. Ambos productos, mermelada y néctar de guayaba dulce, fueron satisfactoriamente aceptados por los consumidores.

En la costa Atlántica no se tienen reportes de estudios de densidad de población. En países como Honduras, se emplean densidades de siembra de 80.000 a 100.000 plantas/ha según el sistema de siembra. Los sistemas de siembra que emplean son: hileras simples: a una distancia de 60 cm entre hileras y 20 cm entre plantas (80.000 plantas/ha); hileras dobles: consiste en efectuar hileras dobles a 40 cm una de otra, separadas por una distancia de 60 cm entre cada hilera doble. La distancia de planta a planta sobre las hileras dobles se mantiene a 20 cm (100.000 plantas/ha).

De otra parte, en el Alto Uruguay se está llevando a cabo un proyecto que movilizó la creación de más de 10 cooperativas de productores con miras a desarrollar una fábrica de edulcorantes naturales; en este proyecto están utilizando densidades de 100 mil

plantas por hectárea, según los estudios preliminares realizados.

En Colombia, la estevia se cultiva principalmente en los departamentos de Antioquia, Córdoba, Cauca, Valle del Cauca, Tolima, Huila y Putumayo, que suman alrededor de 150 ha. Las densidades de siembra que se emplean oscilan entre 80.000 y 160.000 plantas por hectárea; sin embargo, estas poblaciones no han sido escogidas como consecuencia de resultados de investigaciones en las zonas de producción, sino a las recomendaciones técnicas de otros países que se encuentran disponibles en Internet.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo general

Evaluar la adaptabilidad y el comportamiento fisiológico de *Stevia rebaudiana* Bert., a través de la producción y calidad de los esteviósidos, en tres ambientes del Caribe Colombiano, con el propósito de ofrecer una nueva alternativa de producción, que contribuya a mejorar la calidad de vida de los pequeños agricultores.

1.6.2 Objetivos específicos

- Analizar la captación y el uso de la radiación de dos clones de *Stevia rebaudiana*, en tres ambientes del Caribe, bajo tres poblaciones de planta por hectárea.
- Evaluar la estabilidad fenotípica de dos clones de *Stevia rebaudiana* en tres ambientes del Caribe Colombiano, a través del índice de selección di, propuesto por Eskdridge en 1990.
- Determinar las curvas de extracción de nutrientes y el efecto de las deficiencias nutricionales en *Stevia rebaudiana*.

1.7 Literatura citada

1. Aarón E. y N. Kruscalla. 2004. Estudio de Calidad de Vida para la Costa Caribe 1997-2003. En: Economía y Cultura del Caribe colombiano. En: <http://www.ocaribe.org/investigacion/investigacion.php?i=56>. Consulta: Abril 2010.
2. Aranda J. B. 1946. Revista de Agricultura, Asunción. 5 p. Paraguay.
3. Bertoni, M. S. 1905. Anales Científicos Paraguayos, Serie N° 5. Asunción. Paraguay.
4. Brandle, J. E. y P.G. Telmer. 2007. Steviol glycoside biosynthesis. Phytochemistry 68, 1855-1863.

5. Brandle, J. 2005. Stevia, Natures Natural Low Calorie Sweetener. En: www.certinedorganicfoodsteviaFAQ. Consulta: junio 2005.
6. Carneiro, J.W.P. 1990. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, production of seed. M.Sc Thesis, State University of Maringa, Brazil (English abstr).
7. Carneiro, P. 1998. Novas metodologias de análise da adaptabilidade e estabilidade de comportamento. Tese (Doutorado). 168p. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG Brasil.
8. Chatsudthipong, V. y C. Muanprasat. 2009. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & Therapeutics*. 121, 41-54.
9. Eafit, Escuela de Administración y Finanzas. 2004. Inteligencia de mercados internacionales de *S. rebaudiana*. Departamento de Negocios Internacionales, Medellín, Colombia.
10. Frederico, A.P., P.M. Ruas, M.A. Marinmorlaes, C.F. Ruas y J.N. Nakajima. 1996. Chromosome studies in some Stevia (Compositae) species from southern Brazil. *Braz. J. Genet.* 19, 605-609.
11. Galván, L., J. Guzmán, A. Jarma y E. Combatt. 2003. Determinación de los requerimientos nutricionales de *Stevia rebaudiana*, en el Medio Sinú. En: Memorias XXXIII Congreso Anual de Comalfi. Montería, Colombia
12. Geuns, J. M. 2003. Stevioside. *Phytochemistry*. 64, 913-921.
13. Jaitak, V., A. Gupta, V. Kaul y P. Ahuja. 2008. Validated high-performance thin-layer chromatography method for steviol glycosides in *Stevia rebaudiana*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 47, 790-794.
14. Jarma, A. 2008. Estudios de adaptación y manejo integrado de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.): nueva alternativa agroindustrial del Caribe colombiano. Una revisión. *Rev. Colomb. Cienc. Hortíc.* 2(1), 109-120.
15. Kim, J., Y.H., Choi y Y. Choi. 2002. Use of stevioside and cultivation of *Stevia rebaudiana* in Korea. En: Kinghorn, A.D. (Ed.), *Stevia, the Genus Stevia. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles*, Vol. 19. Taylor y Francis, Londres y NY, pp. 196–202.
16. LACEA/BID/BIRD. 2005. Red de Pobreza y Desigualdad de América Latina y el Caribe: Capítulo Colombiano. En: http://lacea.org/LACEA_Copy/htdocs/capcolomb.htm. Consulta: junio 2005.
17. Lin, C. y M. Binns. 1988. A method for analyzing cultivar x location x year experiments: A new stability parameter. *Theoretical Applied Genetics*. 76(3),

425-430.

18. Mizutani, K. y O. Tanaka. 2002. Use of *Stevia rebaudiana* sweeteners in Japan. En: Kinghorn, A.D. (Ed.), *Stevia, the Genus Stevia. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles*, Vol. 19. Taylor y Francis, Londres y NY, pp. 178-195.
19. PNUD, 2002. Informe Sobre Desarrollo Humano 2001. TM Editores, New York, p. 146.
20. Prakash, I., G.E. DuBois, J.F. Clos, K.L. Wilkens y L.E. Fosdick. 2008. Development of rebiana, a natural, noncaloric sweetener. *Food Chem. Toxicol.* 46, S75-S82
21. Rengifo, T., A. Jarma y J. Clavijo. 2003. Crecimiento de *Stevia rebaudiana* bajo cuatro niveles de radiación incidente. p. 66. En: Memorias XXXIII Congreso de Comalfi. Montería, Colombia.
22. Schwebel, René. 2005. Stevia, el edulcorante natural sudamericano con cero calorías. En: http://www.geocities.com/schwebel_rene/. Consulta: junio 2005.
23. Shaffert, E.E. and Chetobar, A.A. 1994. Development of the female gametophyte in *Stevia rebaudiana* (English translation). *Buletinul Academiei de Shtintse A Republica Moldova.* 6, 10-18.
24. Sumida, T. 1980. Studies on *Stevia rebaudiana* Bertoni as a new possible crop for sweetening resource in Japan (English summary). *J. Cent. Agric. Exp. Stn.* 31,1-71.
25. Tadhani, M., V. Patel y S. Rema. 2007. In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *J. Food Compos. Anal.* 20, 323-329.
26. Valio, I.F.M. y R.F. Rocha. 1966. Effect of photoperiod and growth regulators on growth and flowering of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Jap. J. Crop Sci.* 46,243-248.
27. Vergara, C.; A. Jarma; J. Polo y L. Pastrana. 2003. Crecimiento y desarrollo de dos variedades de *Stevia rebaudiana* en tres tipos de suelo del Medio Sinú. p. 68. En: Memorias XXXIII Congreso Anual de Comalfi. Montería, Colombia.

2 Estabilidad fenotípica de genotipos y poblaciones de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) en el Caribe colombiano

Phenotypic stability of genotypes and populations of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) in the Colombian Caribbean

Alfredo Jarma Orozco, Hermes Aramendiz Tatis, Juana Robles G¹.

2.1 RESUMEN

Los estudios de estabilidad fenotípica son determinantes para recomendar la siembra de genotipos que muestran un adecuado comportamiento en una o varias zonas. Estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.), una especie de reciente introducción en Colombia con carentes estudios de adaptación a las áreas productoras, se caracteriza por sintetizar glucósidos de diterpeno altamente edulcorantes con bajo aporte calórico. Sin embargo, aunque la oferta ambiental define en gran parte la producción, la relación hoja/tallo en el dosel y la cantidad de glucósidos totales, pocos estudios de adaptación se han realizado en el país. El presente estudio se realizó en Montería-Colombia (8°52' N y 76°48' W), con el propósito de determinar la estabilidad fenotípica de dos genotipos de estevia, (Morita 1 y Morita 2) y de tres poblaciones (25; 12,5 y 6,25 plantas/m²) bajo un diseño de bloques completos al azar, en tres épocas de siembra en el Caribe Húmedo colombiano. Se utilizaron los criterios de estabilidad fenotípica propuestos por Lin y Binns (1988) y Carneiro (1998). Los resultados más importantes señalan que Morita 2, en poblaciones de 25 plantas/m², registra los mejores índices de estabilidad para el rendimiento de hoja seca/hectárea ($p \leq 0.01$). Por su parte, éste mismo genotipo presentó una mayor relación hoja/tallo ($p \leq 0.01$) y mayor contenido de glucósidos totales ($p \leq 0.05$) cuando la oferta de la radiación es mayor y las poblaciones están entre 12,5 y 25 plantas/m².

Palabras clave: Interacción genotipo-ambiente, glucósidos, densidad de siembra, relación hoja/tallo, rendimiento de biomasa.

2.2 ABSTRACT

Phenotypic stability studies are significant to recommend objectively the planting of genotypes showing appropriate behavior in one or more areas. Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.), a species of recent cultivation in Colombia, is characterized by the synthesize of highly sweeteners diterpene glycosides with low calorie. However, while defining the environmental supply much of the production, leaf /stem ratio in the canopy and the amount of total glycosides, few studies of adaptation have been made in the country. This study was carried in Monteria-Colombia (8°52' N and 76°48' W) to determine the phenotypic stability of two genotypes of stevia (Morita 1 and Morita 2) and three populations (25; 12,5 and 6,25 plants/m²) to be established under design randomized complete block, in three seasons in the Caribbean Colombian Humid. We used phenotypic stability criteria proposed by Lin and Binns (1988) and Carneiro (1998). The results revealed that Morita 2, established populations of 25 plants/m², recorded the

¹ Profesores Investigadores Universidad de Córdoba. Montería. Correo: ajarma@sinu.unicordoba.edu.co

highest levels of stability for the dry leaf yield per hectare ($p \leq 0.01$). For its part, the same genotype showed a higher leaf/stem ratio ($p \leq 0.01$) and higher content of total glycosides ($p \leq 0.05$) when the supply of radiation is higher and populations are between 12,5 and 25 plants/m².

Key words: Genotype-environment interaction, glycosides, plant density, leaf/stem ratio, biomass yield.

2.3 Introducción

Stevia rebaudiana Bert., es una planta herbácea perenne que pertenece a la familia de las Asteráceas. Crece como arbusto salvaje en el suroeste de Brasil y Paraguay y cobra un alto valor entre los vegetales nativos de estos países, debido a que contiene glucósidos bajos en calorías llamados comúnmente esteviósidos, cuyo poder edulcorante en estado puro y cristalino puede ser 300 veces mayor que el del azúcar de caña (Cleuza, *et al.* 2005).

Los edulcorantes, en su mayoría concentrados en las hojas, son glucósidos de diterpeno sintetizados, al menos en los estados iniciales, usando la misma ruta del ácido giberélico a partir del mevalonato (Hsieh y Goodman, 2005; Guevara-García *et al.* 2005; Kasahara *et al.* 2002). Varios autores han indicado que la diferencia radica que en estevia, el kaureno, precursor de dichas hormonas, se convierte a esteviol en el retículo endoplásmico (Geuns, 2003; Totté *et al.* 2000; Totté *et al.* 2003; Brandle *et al.* 2002; Brandle, 2005).

Al variar la época de siembra y la población, la incidencia de los factores ambientales como radiación solar, precipitación, temperatura, etc., pueden afectar las expresiones fenotípicas y fisiológicas de las plantas, puesto que afecta los procesos de fotosíntesis, transpiración, alargamiento de células, crecimiento y competencia entre especies (Jarma, 2008; Montemayor, 2006). Jaitak *et al.* (2008), al cuantificar los efectos ambientales de 10 localidades contrastantes en la India, sobre la producción de edulcorantes de estevia, encontraron valores entre 3,3 y 6.7% de esteviósidos (St) y de 1,2 a 2,3% de rebaudiósido A (RebA).

Los cultivos de estevia en Colombia se vienen estableciendo sin criterios científicos que consideren la estabilidad fenotípica de los cultivares, lo cual puede ser riesgoso dada su base genética estrecha (solo dos genotipos), la alta variabilidad ambiental del país y la tecnología de manejo aplicada.

En la actualidad hay registros de la siembra de esta especie en los departamentos de Antioquia, Córdoba, Tolima, Huila, Valle del Cauca, Caquetá y Meta. En Colombia se cultivan dos genotipos, Morita 1 (M1) y Morita 2 (M2), principalmente en los departamentos de Antioquia, Valle del Cauca, Tolima, Huila y Meta (Jarma *et al.* 2005), los cuales presentan condiciones agroecológicas variables, siendo M2 la más cultivada, aunque autores como Maya (2000), reportan a M1. Gran parte de la producción se exporta a Europa y Asia aunque recientemente ha aumentado el consumo interno debido al surgimiento de empresas nacionales de procesamiento que producen un edulcorante de excelente calidad y al potencial del cultivo (Guerrero y Jarma, 2009).

Adicionalmente, las labores que demanda el cultivo (siembras, podas, controles fitosanitarios, beneficio, etc.), lo convierten en un sistema altamente generador de empleos rurales, sin contar los beneficios que su uso trae a la salud. En Colombia, trabajos adelantados en la región Caribe han sugerido su posible adaptación a la oferta ambiental de esta parte del país, lo que podría convertirla en una nueva alternativa de producción para el sector agroindustrial (Jarma, *et al.* 2005; Jarma, *et al.* 2006). Es una especie que se reproduce sexual y asexualmente, pero esta última condición es el medio más importante en la producción de plántulas para el establecimiento de cultivos, siendo una práctica frecuente en diversos países (ambientes), tales como Colombia (Jarma, 2009), Brasil (Dacome *et al.* 2005; Yoda *et al.* 2003; Campos, R. 2007), Paraguay (Casaccia y Álvarez, 2006), India (Jaitak *et al.* 2008) y Australia (Hearn y Subedi, 2008). Lo anterior redundo, en una alta variabilidad de la calidad y producción de los glucósidos.

La estabilidad fenotípica ha tenido varias interpretaciones. Becker (1981), propuso dos conceptos; el biológico, cuyo ideal es el genotipo de mínima variación a través de ambientes, mostrando un rendimiento constante en cualquier condición de producción (varianza estadística mínima), y el agronómico, que representa una mínima interacción genotipo ambiente, lo cual está asociado a la pretensión de obtener un incremento del rendimiento en respuesta a mejoras ambientales.

Existen muchos métodos que se han aplicado para analizar la interacción genotipo ambiente; entre estos, están los que se basan en el análisis de regresión, análisis multivariado, análisis de componentes principales, componentes de varianza y análisis no paramétricos. La escogencia del método depende principalmente del número de ambientes, la precisión requerida para la discriminación genotípica y tipo de información deseada (Aramendiz *et al.* 2007).

La metodología de Lin y Binns (1988), es una buena alternativa para la evaluación de cultivares con relación a la interacción genotipo ambiente. Esta metodología se sustenta en las variaciones pequeñas de un genotipo en una misma localidad pero en diferentes años. Sobre este método, Atroch *et al.* (2000) y Scapim *et al.* (2000), señalan que no tiene las limitaciones de la regresión cuya interpretación es más difícil; es simple, fácil de aplicar y caracteriza los genotipos en un solo parámetro P_i (estimativo estadístico de adaptabilidad y estabilidad del comportamiento), que asocia la estabilidad con el rendimiento y, que a menor valor, mayor será su estabilidad. Además, la inclusión o retirada de uno o pocos cultivares no causa grandes variaciones en la estimación de los parámetros y permite la clasificación de los genotipos para su selección en procesos de mejoramiento genético. Esta metodología ha sido aplicada en alfalfa (Ferreira *et al.* 2004), papa (Pérez-López *et al.* 2007), algodón (Aramendiz *et al.* 2007), trigo (Rodríguez *et al.* 2002) y frijol (Elías, *et al.* 2005) entre otros.

La metodología de Lin y Binns (1988) fue modificada por Carneiro en 1998, para identificar los genotipos superiores en ambientes favorables y desfavorables, siendo aplicada en diversas especies como frijol (Oliveira *et al.* 2006; Morais *et al.* 2001), maíz (Murakami *et al.* 2004), alfalfa (Ferreira *et al.* 2004) y algodón (Aramendiz *et al.* 2007), entre otros.

Considerando que es necesario desarrollar avances tecnológicos en el cultivo de la estevia, el objetivo del presente trabajo fue determinar la estabilidad fenotípica de dos

genotipos (Morita 1 y Morita 2), en función de tres poblaciones y tres épocas de siembra en el Caribe colombiano.

2.4 Materiales y Métodos

2.4.1. Localización y material experimental

El estudio se realizó en el área experimental de la Universidad de Córdoba (Montería-Colombia), ubicada a una altura de 13 m.s.n.m. Sus coordenadas geográficas corresponden a los 8° 52' de latitud norte y 76° 48' latitud oeste, respecto al meridiano de Greenwich. La zona de vida a la cual corresponde la capital del departamento, Montería, se denomina bosque seco tropical (bs-T), según la clasificación de Holdrige (1967), con precipitación anual de 1200 mm, temperatura media del aire de 28°C, humedad relativa de 84% y brillo solar anual de 2108.2 horas (Palencia *et al.* 2006).

Se establecieron tres experimentos (épocas de siembra) durante el primer semestre agrícola de 2006 (abril 2 - junio 13) y los dos semestres agrícolas de 2007 (febrero 20 - abril 17 y noviembre 20 - enero 30/08 respectivamente). Las principales variables ambientales en cada época se muestran en la Tabla 2.1. En cada experimento se utilizó un arreglo factorial de 2 (genotipos) x 3 (poblaciones) bajo un diseño experimental de bloques completamente al azar con 4 repeticiones. Los genotipos estudiados fueron Morita 1 (M1) y Morita 2 (M2) en poblaciones de 6,25; 12,5 y 25 plantas/m² establecidas bajo arreglos de 0,4 x 0,4; 0,2 x 0,4 y 0,2 x 0,2 m entre plantas y surcos respectivamente, bajo unidades experimentales de 210 plantas cada una.

TABLA 2.1. Promedios diarios de radiación fotosintéticamente activa RFA (MJ m⁻² d⁻¹), temperaturas máximas y mínimas (°C) y totales de precipitación y evaporación (mm), en tres épocas de siembra de estevia en el Caribe colombiano.

Factor	Época 1 (Sem A 2006)			Época 2 (Sem A 2007)			Época 3 (Sem B 2007)		
	Abr-06	May-06	Jun-06	Feb-07	Mar-07	Abr-07	Nov-07	Dic-07	Ene-08
RFA	16,64	14,25	14,28	22,36	21,85	20,62	16,87	18,66	19,32
Temp. Máx.	31,88	31,65	31,37	34,68	33,85	32,79	31,41	32,42	33,88
Temp. Mín.	23,83	23,47	24,13	23,84	24,81	24,63	23,75	23,47	23,85
Precipitación	109,7	315,5	175,7	0,0	78,0	0,0	22,8	53,3	8,8
Evaporación	122,3	113,8	94,3	117,3	152,0	113,3	101,1	128,0	131,6

Las variables dependientes fueron relación hoja / tallo (RHT), medido como la relación en masa seca de hojas y tallos por planta, rendimiento de hoja seca por hectárea (RHS), medido como la masa seca de las hojas de cada unidad experimental en g y convertido a kg ha⁻¹ de acuerdo a cada área cosechada al momento de floración, y contenido de glucósidos totales GT (St y RebA), medidos en porcentaje de peso seco de la hoja por el método de cromatografía líquida de alta eficacia, utilizando en la fase móvil una mezcla de Acetonitrilo y agua (80:20), con una columna Kromasil 100-5HN₂ (Método isocrático) y un patrón de un 90% de pureza. Estos análisis fueron realizados por el Laboratorio de Control de Calidad de la empresa Prodalysa Ltda (Chile).

2.4.2 Análisis de la información

Análisis de varianza individuales y combinados fueron realizados para identificar la importancia de los efectos de los componentes experimentales del modelo mixto,

considerándose los genotipos y las poblaciones como efectos fijos y como aleatorio las épocas; las interacciones se descompusieron con tablas de doble entrada, realizando las comparaciones a través de una prueba de F (5%); se utilizó el programa SAS (versión 9.1).

En el método de Lin y Binns (1988), el desempeño general de los genotipos es definido como el cuadrado medio de la distancia entre la media del cultivar y la respuesta media máxima para todas las épocas de tal modo que los genotipos y poblaciones con menores valores corresponden a los de mayor estabilidad. De acuerdo con esta definición el estimador P_{ig} es determinado por la siguiente fórmula:

$$P_{ig} = \frac{\sum_{j=1}^n (X_{ij} - M_j)^2}{2n}$$

donde:

P_{ig} = estadístico del parámetro de estabilidad del cultivar i ;

X_{ij} = respuesta de la variable dependiente del i – ésimo cultivar o población en la j – ésima época;

M_j = respuesta máxima observada entre todos los cultivares y poblaciones en la época j ;

n = número de épocas.

Carneiro (1998) descompuso el estadístico P_{ig} , con el fin de identificar los genotipos superiores en ambientes favorables y desfavorables, utilizando la misma metodología de clasificación de ambientes de Eberhart y Russell (1966). En esta descomposición, los siguientes estadísticos son estimados:

$$P_{if} = \frac{\sum_{j=1}^f (X_{ij} - M_j)^2}{2f} \quad \text{y} \quad P_{id} = \frac{\sum_{j=1}^d (X_{ij} - M_j)^2}{2d},$$

donde:

P_{if} = estadístico de P_{ig} para cultivares y poblaciones favorables;

P_{id} = estadístico de P_{ig} para cultivares y poblaciones desfavorables;

f = número de épocas favorables;

d = número de épocas desfavorables;

X_{ij} y M_j como fueron definidos anteriormente.

De esta manera, la selección de los cultivares y poblaciones puede ser realizada para las diferentes épocas (general y específica), siendo mucho más completa que la propuesta original.

2.5 Resultados y Discusión

El análisis de varianza combinado para las variables consideradas está consignado en la Tabla 2.2. Los resultados revelan que la RHT y RHS, fueron afectados de manera altamente significativa ($P \leq 0,01$) por los efectos individuales de la época, el genotipo y la población, en tanto que los GT sólo fueron afectados por la época y el genotipo, confirmando que las condiciones ambientales en el trópico son variables al cambiar la fecha de siembra, los genotipos son genéticamente diferentes y las poblaciones difieren

de manera importante en su número. Resultados similares fueron reportados por Carbonell y Pompeu (2000) y Prado *et al.* (2001), cuando estudiaron el efecto de cinco y tres épocas de siembra en soya y frijol, respectivamente.

TABLA 2.2. Significancia estadística de variables de producción de estevia en función de la época, el genotipo y la población por hectárea. Montería – Córdoba, 2006-2007.

Fuente de Variación	gl	Cuadrado Medio del Error		
		Relación hoja/tallo	Rendimiento hoja seca (kg/ha)	Glucósidos totales (%)
Época (E)	2	3.46 **	17940487 **	84.38 **
Genotipo (G)	1	3.84 **	6795755 **	15.12 *
Población (P)	2	0.10 **	2120759 **	1.84 NS
E x G	2	0.055 NS	895744 **	7.16 NS
E x P	4	0.018 NS	390492 **	1.95 NS
G x P	2	0.002 NS	81160 NS	1.54 NS
E x G x P	4	0.035 NS	97064 NS	1.77 NS
Error	51	0.01853	102187.6	4.3646
Total	71			
Media		0.94	1481	15.4
CV (%)		14.4	21.5	13.5
R ²		0.60	0.92	0.60

CV = Coeficiente de variación y gl = Grados de Libertad. NS, * y ** = no significativo, significativo ($p \leq 0.05$) y altamente significativo ($p \leq 0.01$) respectivamente.

A excepción de las interacciones genotipo por época y población por época que registraron variaciones significativas para la RHS ($p \leq 0.01$), las demás combinaciones no acusaron significancia. Esto señala que para esta variable, los genotipos y poblaciones presentaron un comportamiento diferencial en función de las épocas de siembra (por la alteración en la posición en una época y otra), y denota la dificultad de recomendar de manera general cultivares y poblaciones, al alterarse sus expresiones fenotípicas en los ambientes del Caribe colombiano; resalta además la importancia de recurrir a estudios detallados de la interacción genotipo ambiente con el fin de realizar recomendaciones mucho más precisas y confiables para cultivares de esta especie. La presencia de una interacción significativa con el ambiente obedece en parte a la ocurrencia de algún tipo de estrés (Carbonell y Pompeu, 2000), el cual puede estar ocasionado entre otros factores, por temperaturas, radiación solar, humedad relativa, precipitación, etc., tal como lo sostienen Calviño y Sadras (1999); Montemayor *et al.* (2006) y Jaitak *et al.* (2008). La interacción de segundo orden resultó no significativa ($p \geq 0.05$), indicando que una gran porción de los efectos de ésta pueden ser explicados por las épocas, como lo sustentaron en caña de azúcar Rea y de Sousa-Vieira (2001).

Los coeficientes de variación experimental oscilaron entre 13,5 y 21,5%, lo que evidencia buena precisión de los datos experimentales (Pimentel-Gomes, 1985); los coeficientes de determinación fueron considerados como altos para RHS (0,92) y aceptables para RHT (0,60) y GT (0,60), por lo que el modelo puede ser usado para interpretar la estabilidad (Prado *et al.* 2001).

2.5.1 Relación hoja/tallo

La relación hoja/tallo indica la eficiencia del genotipo en el envío de asimilados a la lámina foliar respecto a la formación de tejidos de sostén (tallo), probablemente como una respuesta a condiciones favorables, especialmente la temperatura del suelo como lo destacan Stone *et al.* (1999), lo que le permitiría a la planta alcanzar de manera rápida mayor área foliar, interceptación de la radiación solar, mayor producción de biomasa y consecuentemente aumentar las tasas de fotosíntesis. Los efectos individuales altamente significantes ($P \leq 0.01$) de la época, el genotipo y la población sobre la RHT indican que esta relación en estevia respondió de manera diferencial al variar cada uno de estos factores (Tabla 2.3).

TABLA 2.3. Relación hoja/tallo de estevia en función de la época, el genotipo y la población por hectárea. Montería – Córdoba, 2006-2007.

Factor	Promedio \pm SD
Época (E)	
E1 (Mayo 2006)	0,55 \pm 0,2 c
E2 (Febrero 2007)	1,31 \pm 0,2 a
E3 (Noviembre 2007)	0,97 \pm 0,3 b
Genotipo	
Morita 1	0,71 \pm 0,3 b
Morita 2	1,17 \pm 0,3 a
Población (plantas/m²)	
25	1,00 \pm 0,4 a
12,5	0,94 \pm 0,4 ab
6,25	0,88 \pm 0,4 b

Promedios con la misma letra dentro de un factor son iguales estadísticamente según la prueba de DMS (5%). SD=desviación estándar.

Al considerar el efecto de la época, los resultados indicaron que la RHT se favoreció significativamente ($P \leq 0.01$) cuando estevia se sembró en febrero de 2007 (E2), llegando a registrar 1,3 y 2,3 veces el valor de la RHT respecto a la siembra de noviembre del mismo año (E3) y mayo de 2006 (E1) respectivamente.

Los valores de radiación fotosintéticamente activa (RFA) mostrados en la Tabla 2.1, indican que en las tres épocas de siembra, se recibieron respectivamente en promedio 15,05; 21,61 y 18,28 MJ m² d⁻¹ de RFA para E1, E2 y E3. A pesar que existen otros factores que ayudarían a revelar el comportamiento de la RHT, tales como las diferencias en la temperatura media (27,7; 29,1 y 28,1 °C para la E1, E2 y E3 respectivamente) y que no se discutirán en este artículo para efectos de simplificar la discusión de los resultados, la oferta de RFA podría ser determinante para explicar las ventajas de la siembra en febrero de 2007 (E2), indicando que esta especie favorece la distribución de asimilados hacia la hoja en ambientes de mayor radiación, tal como lo reportaron otros autores en estevia (Midmore y Rank, 2002; Jarma *et al.* 2006; Jarma, 2008).

La eficiencia fisiológica en función de la radiación podría estar soportada en el hecho que Morita 2 ha registrado consistentemente en diversos ensayos, mayor índice de área foliar IAF que Morita 1 (datos no mostrados), cuando se aumentan los niveles de radiación (Jarma *et al.* 2005) y a su vez explicaría las diferencias observadas entre genotipos en este trabajo, confirmando que presentan sensibilidad diferencial a los cambios de la luz y

a la fotosíntesis.

Los efectos diferenciales de la radiación y el genotipo sobre el área foliar y la distribución de biomasa han sido reportadas en pepino (Blanco y Folegatti, 2005), maíz (Lizaso *et al.* 2003), algodón (Tewolde *et al.* 2005), soya (Mansab *et al.* 2003) y otras especies (Squire, 1990; Gower *et al.* 1999).

Los resultados observados para el efecto de la población indican que la RHT es directamente proporcional al número de plantas/m², al menos hasta las densidades evaluadas en el estudio. En estevia cultivada en el Caribe Húmedo colombiano, poblaciones entre 12,5 y 25 plantas/m² han mostrado consistentemente aumentos importantes en el IAF (Jarma, 2008; Espitia *et al.* 2009), lo que puede significar que estas poblaciones favorecen un balance de biomasa hacia el tejido asimilatorio respecto al tallo, tal como lo indican Bruggink y Heuvelink (1987). Estos autores determinaron que en varias especies, la razón de área foliar RAF, relación entre área foliar y masa seca de la planta, aumenta cuando la oferta de luz decrece (lo que puede suceder a mayores poblaciones), probablemente por un aumento del AF; sin embargo, esto puede variar con la edad del cultivo (Lafarge y Hammer, 2002) y la relación fuente-demanda antes del inicio de la etapa reproductiva (Vieira *et al.* 2009).

Probablemente la RHT observada en altas poblaciones en estevia, sea una respuesta a la competencia intra-específica que promueve una variación de la arquitectura del dosel, el cual se adaptaría plásticamente a altas poblaciones y/o ambientes (Barot y Gignoux, 2004; Vance, y Nevai, 2007; Combatt *et al.* 2008). Aunque aumentos del IAF también han sido demostrados al aumentar la población en especies anuales como quinua (Ruiz y Bertero, 2008) o perennes como palmito (Chaimsohn, 2006), es probable que en plantas individuales, aunque puede mantenerse la RHT, la biomasa total por planta puede decrecer (Gan *et al.* 2002; Francescangeli *et al.* 2006).

2.5.2 Rendimiento de hoja seca por hectárea

Siendo la región Caribe colombiana un área geográfica extensa y contrastante, la presencia de interacción del genotipo por las épocas de siembra para el RHS (kg ha⁻¹), amerita minimizar los efectos de las épocas, lo que es posible a través de la identificación de cultivares con estabilidad fenotípica (Tabla 2.4). El análisis de estabilidad fenotípica, de acuerdo a la metodología de Lin y Binns (1988), la cual define como genotipo superior aquel que registre el menor valor P_{ig} indica que Morita 2 ($P_{ig}=0$), sería el de mayor interés para los productores debido a que dicho valor se atribuye a la poca desviación genética a través de los ambientes. Por su parte Morita 1 acusó un valor de $P_{ig} = 238533$, probablemente debido a su alta desviación genética, como lo argumentan en otras especies Scapim *et al.* (2000).

TABLA 2.4. Rendimiento de primer corte de hoja seca de cultivares de estevia (kg/ha), parámetros de estabilidad para condiciones generales (P_{ig}) según Lin y Binns (1988) y para condiciones ambientales favorables (P_{if}) y desfavorables (P_{id}), según Carneiro (1998).

Cultivares	Media (kg/ha)	P_{ig}	Clasif.	P_{if}	Clasif.	P_{id}	Clasif.
Morita 1	1174	238533	2	562436	2	76582	2
Morita 2	1789	0	1	0	1	0	1
Media general	1481						

Los resultados antes anotados son corroborados con la aplicación de la metodología de Carneiro (1998), la cual, al descomponer el comportamiento de los genotipos en ambientes favorables (P_{if}) y desfavorables (P_{id}), indica que Morita 2 fue estable y de superior comportamiento a Morita 1 en cualquiera de estos dos ambientes. Por lo tanto, en la producción de hoja seca por hectárea, Morita 2 representa la mejor alternativa para los agricultores de la región Caribe.

La Tabla 2.5 muestra la respuesta diferencial del rendimiento de hoja seca (kg ha^{-1}) de las poblaciones, en función de las condiciones edafoclimáticas de los períodos de estudio. De acuerdo a la metodología de Lin y Binns (1988), la densidad de población de 25 plantas/ m^2 , fue la de mayor estabilidad por registrar un $P_{ig}=0$, seguida de la densidad de 12,5 plantas/ m^2 con un $P_{ig}=83783$ y por último la densidad de 6,25 plantas/ m^2 , que resultó ser la más inestable a las condiciones de la oferta ambiental.

TABLA 2.5. Rendimiento de primer corte de hoja seca de poblaciones de estevia (kg ha^{-1}), parámetros de estabilidad para condiciones generales (P_{ig}) según Lin y Binns (1988), y para condiciones ambientales favorables (P_{if}) y desfavorables (P_{id}), según Carneiro (1998).

Población (plantas/ m^2)	Media (kg ha^{-1})	P_{ig}	Clasif.	P_{if}	Clasif.	P_{id}	Clasif.
6,25	1188	235342	3	582012	3	62007	3
12,5	1474	83783	2	237222	2	7063	2
25	1782	0	1	0	1	0	1
Media general	1481						

Según la metodología de Carneiro (1998), la densidad de población de 25 plantas/ m^2 , fue la más estable tanto para ambientes favorables como desfavorables, por haber acusado un $P_{if}=0$ y $P_{id}=0$, seguido de las densidades de 12,5 y 6,25 plantas/ m^2 . Considerando lo discutido en los acápite anteriores, los resultados de estabilidad encontrados, señalan que Morita 2 asociado a una densidad de 25 plantas/ m^2 , representa una buena perspectiva para su aplicación en diferentes épocas de siembra en el Caribe Húmedo. Sin embargo, es necesario considerar si las diferencias en rendimiento y calidad de la hoja entre 12,5 y 25 plantas/ m^2 , son lo suficientemente importantes al compararse con los costos de semilla, considerando que este insumo es uno de los más significativos dentro de los costos de producción de una hectárea y que no se detectaron diferencias entre poblaciones para los GT.

Los resultados de estabilidad observados en el estudio no son divergentes con los que registra el comportamiento fisiológico de los genotipos y las poblaciones en otros trabajos, donde se ha reportado mayor producción de hoja por hectárea con Morita 2 (Jarma *et al.* 2006) y/o con altas poblaciones (Espitia *et al.* 2009). En efecto, Morita 2 ha sido consistentemente un recurso genético que ha expresado mayor potencial de rendimiento respecto a Morita 1 en varios ambientes evaluados en el Caribe colombiano y principalmente cuando se establece en altas poblaciones (Jarma, 2008). Probablemente esta ventaja genética de Morita 2 sea producto de un comportamiento diferencial en la sensibilidad a cambios en la intercepción de la luz por las hojas y consecuentemente en las tasas de fotosíntesis, lo cual finalmente podría conducir a las respuestas observadas a altas densidades de plantas o en ambientes con mayor oferta de RFA.

De acuerdo a lo anterior, Ramesh *et al.* (2006), informaron que, en concordancia con la mayoría de las especies vegetales, el comportamiento de estevia es afectado por la radiación, longitud del día, temperaturas, agua disponible en el suelo y el viento en lugares expuestos. Los autores concluyen que estevia es una planta amante del sol, probablemente debido a que evolucionó en un ambiente cálido, húmedo y soleado.

Tal como se mencionó anteriormente, la mayor oferta de luz en E2 (Tabla 2.1) y la eficiencia en la captación de este recurso a altas poblaciones, serían factores definitivos para potenciar el rendimiento de Morita 2 respecto a Morita 1, y de paso explicaría las interacciones E x G y E x P. En este sentido, Gan *et al.* (2002), indicaron que además del genotipo, altos rendimientos en altas poblaciones en los cultivos, generalmente son atribuidos a altas interceptaciones de la luz y consecuentemente altas tasas de fotosíntesis. Sin embargo, no se debe dejar de lado la importancia que estas altas radiaciones tienen sobre el ciclo de vida del cultivo, el cual, tiende a reducirse en la medida en que temperatura y radiaciones son mayores (Jarma, 2008).

Es importante considerar que incrementos en las poblaciones de plantas afectan la composición de la luz percibida por las hojas en los diferentes estratos. La luz penetra el dosel sufriendo una reducción en la densidad del flujo de fotones fotosintéticos y una significativa alteración en su composición espectral. Dado que la absorción de los tejidos verdes es más intensa en las longitudes de onda de azul (400-500 nm) y el rojo (600-700 nm) y la reflexión es más intensa en las longitudes del rojo-lejano (700-800 nm), la tasa de absorción rojo:rojo-lejano es altamente reducida en la base del cultivo con altos índices de área foliar, los cuales están normalmente asociados a altas poblaciones (Borrás, *et al.* 2003). Ahora bien, si la exportación de N desde las hojas bajas es promovida por bajas tasas de la relación rojo:rojo-lejano, como lo demostraron Rousseaux *et al.* (1999) en girasol, entonces la alta migración de N hacia tejidos jóvenes en altas poblaciones podría contribuir a explicar las altas tasas de fotosíntesis y rendimientos de biomasa observadas en estas poblaciones.

Ha sido demostrado que el sombreado reduce el crecimiento de estevia (Slamet y Tahardi, 1988; Jarma *et al.* 2005; Jarma *et al.* 2006), aunque en China se han reportado rendimientos altos en latitudes medias (32 °LN), en una zona húmeda donde en términos generales, las horas de sol son limitadas por la excesiva cubierta de nubes durante la mayor parte del ciclo del cultivo de crecimiento (Shu, 1989). Por lo anterior, es muy probable que otros factores distintos de la latitud y la radiación solar limiten la producción, lo cual evidentemente precisa de mayores estudios, principalmente en las condiciones del Caribe colombiano.

2.5.3. Glucósidos totales

En la Tabla 2.2 se indicó que sólo el genotipo ($p \leq 0.05$) y la época de siembra ($p \leq 0.01$) tuvieron un efecto significativo sobre el contenido total de glucósidos en la hoja. Las pruebas de comparación de medias revelaron mayor contenido de glucósidos totales (GT) en las épocas E2 y E3 y en el genotipo M2 (Fig. 2.1).

Al considerar el efecto de las épocas, la Figura 2.1 muestra que los mayores valores de glucósidos totales se observaron cuando los genotipos se cultivaron en la E3 (0,173 g/g de masa seca de hoja), la cual no difirió de la E2, pero sí de la E1 (0,148 y 0,134 g/g de

masa seca de hoja respectivamente). En acápite anteriores, se discutieron las diferencias en la oferta ambiental entre épocas y, aunque no se obvió el efecto que pueden tener las temperaturas, se hizo especial énfasis en la RFA, la cual siguió la siguiente tendencia decreciente: E2>E3>E1 (Tabla 2.1).

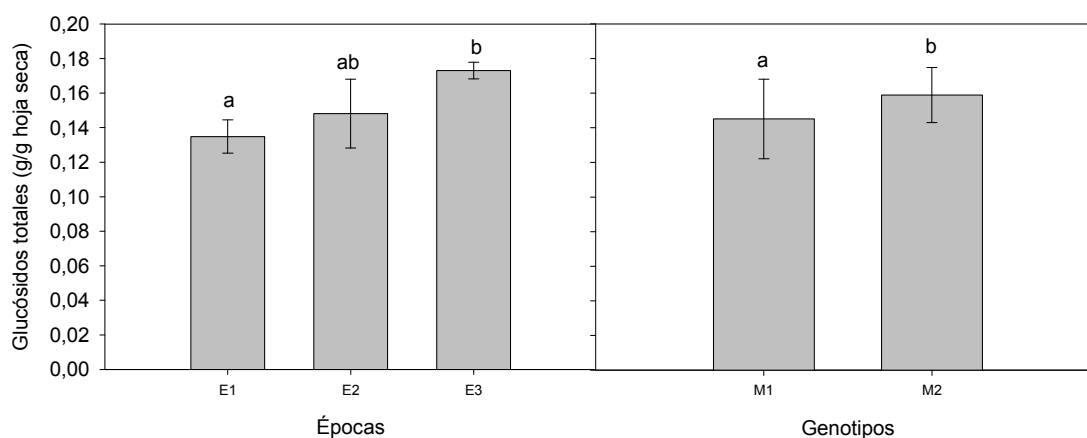


FIGURA 2.1. Glucósidos totales de estevia (g/g de masa seca de hoja) en función de los factores época (E1, E2 y E3) y genotipo (M1 y M2). Montería – Córdoba, 2006-2007. Barras con la misma letra dentro de un factor, son iguales estadísticamente según la prueba de DMS (5%). I=desviación estándar.

Las variables ambientales, principalmente la luz, tienen un efecto directo y positivo sobre la síntesis del isopentenil pirofosfato IPP (Guenther, *et al.* 1994), una molécula de cinco carbonos que es denominada regularmente como el isopreno activo, dada su importancia en el alargamiento de la cadena terpenica. Esta ruta es la misma del ácido giberélico que, a partir del ácido mevalónico (Guevara-García *et al.* 2005), conduce a la síntesis de las giberelinas y de los glucósidos de esteviol. Con base en ello, es posible deducir que los altos niveles de luz observados en la E2 y E3 favorecieron esta ruta y por consiguiente la concentración de glucósidos totales.

Aunque los valores de días a floración no son mostrados en esta investigación, en las tres épocas de siembra se encontró que entre mayor RFA, los genotipos fueron más precoces, coincidiendo con otras especies hortícolas donde se ha reportado una correlación lineal positiva entre temperatura y precocidad (Real-Rosas *et al.* 2002; Ortegón *et al.* 2006). En este sentido, estos resultados coincidirían con los reportados por Sumida (1980), quien indicó que genotipos de floración temprana tienden a tener un contenido de esteviósido superior, aunque menor rendimiento de biomasa. Contrariamente, otros autores han indicado que períodos de floración más tardíos permiten mayor tiempo de acumulación de glucósidos (Ramesh *et al.* 2006); sin embargo para considerar estas dos teorías y definir el período a floración de un cultivar, deben considerarse otros factores determinantes como el genotipo, la oferta de luz y la competencia intra-específica, entre otros.

Con base en las diferencias de GT entre M1 y M2, los resultados de la presente investigación confirmarían que el proceso de mejoramiento genético de Morita 2 fue conducido para obtener un recurso con mayor contenido de GT. Esta condición se mantendría estable con el genotipo ya que la propagación de estevia se hizo a partir de esquejes (asexual), conservando por tanto las características genéticas del genotipo

donante (Lee, 1982).

Es importante recordar que la condición de especie alógama ha determinado que la mayoría de programas de mejoramiento genético hayan encausado sus objetivos a la obtención de genotipos con diferentes niveles de glucósidos, los cuales pueden variar sustancialmente (4%-16%), incluso entre plantas individuales (Nakamura y Tamura, 1985); esta variabilidad natural podría ser debida a la alta auto-incompatibilidad de la especie (Handro *et al.* 1993).

Consecuentemente con la variabilidad detectada entre genotipos en su centro de diversidad, se ha encontrado una alta heredabilidad de 75% - 83%, para rendimiento de hoja, RHT y contenido de glucósidos (Brandle, 1999). Con base en ello, la investigación en estevia también ha reportado algunas correlaciones interesantes que han contribuido con los programas de mejoramiento genético: el rendimiento de hoja/planta es proporcional al número de brácteas, número de hojas y aunque no siempre, a la altura de planta (Buana, 1989; Shu y Wang, 1988); el contenido de glucósidos totales correlaciona positivamente con la RHT (Tateo, *et al.* 1998), lo cual es consistente con lo reportado en el presente trabajo; el grosor de la hoja, área foliar, contenido de clorofilas y proteínas y la tasa de fotosíntesis neta correlacionan positivamente con la relación RebA/St (Shyu, 1994; Weng, *et al.* 1996).

2.6 Conclusiones

Los análisis de estabilidad empleados permitieron identificar a Morita 2, establecido a 25 plantas/m² como un argumento tecnológico estable para el uso de los productores en un rango de condiciones ambientales diferentes. Así mismo, se pudo determinar que la relación hoja/tallo fue mayor para Morita 2, principalmente en ambientes con mayor oferta de RFA y cultivado en altas poblaciones. La calidad de la hoja, medida como el contenido total de glucósidos, indicó que esta variable es afectada positivamente por la oferta de RFA y que Morita 2 es consistentemente el genotipo con mayor contenido de glucósidos totales respecto a Morita 1.

2.7 Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a los doctores John Alarcón y Andrés Llanos del Laboratorio de Control de Calidad de la empresa Prodalysa Ltda en Chile y Colombia respectivamente, por su colaboración decidida en el análisis de las muestras de contenido de glucósidos totales.

2.8 Literatura citada

1. Aramendiz, H., Espitia, M., Agamez, A., Cardona, C. y Robles, J. 2007. Estabilidad fenotípica de genotipos de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) en el Caribe colombiano. UDCA Actualidad y divulgación científica. 10 (2): 65-73.
2. Atroch, A., A. Soares y M. Patto. 2000. Adaptabilidade e estabilidades de linhagens de arroz de sequeiro testadas no estado de Minas Gerais. Ciencia e

Agrotecnologia. 24(3), 541-548.

3. Barot, S. y J. Gignoux. 2004. Mechanisms promoting plant coexistence: can all the proposed processes be reconciled? *Oikos*. 106, 185-192.
4. Becker, H. 1981. Correlations among some statistical measures of phenotypic stability. *Euphytica*. 30,835-840.
5. Blanco, F. y M. Folegatti. 2005. Estimation of leaf area for greenhouse cucumber by linear measurements under salinity and grafting. *Sci. Agric.* 62, 305-309.
6. Borrás, M., G.A. Maddoni y M.E. Otegui. 2003. Leaf senescence in maize hybrids: plant population, row spacing and kernel set effects. *Field Crops Research*. 82, 13-26.
7. Brandle, J. 1999. Genetic control of rebaudioside A and C concentration in leaves of the sweet herb, *Stevia rebaudiana*. *Canadian Journal of Plant Science*. 79(1), 85-92.
8. Brandle, J. E., A. Richman, A. Swanson y B. Chapman. 2002. Leaf ESTs from *Stevia rebaudiana*: a resource for gene discovery in diterpene synthesis. *Plant Mol. Biol.* 50, 613-622.
9. Brandle, J. E. 2005. Stevia, Nature's Natural Low Calorie Sweetener. En: <http://www.certinedorganicfood> Stevia FAQ. consulta: junio 2005.
10. Bruggink, G.T. y E. Heuvelink. 1987. Influence of light on the growth of young tomato, cucumber and sweet pepper plants in the greenhouse: effects on relative growth rate, net assimilation rate and leaf area ratio. *Sci. Hortic.* 31, 161-174.
11. Buana, L. 1989. Determination of the required growth variables in an agronomic experiment with Stevia [Indonesian]. *Menara Perkebunan*. 57(2), 29-31.
12. Calviño, P.A. y Sadras, V.O. 1999. Interannual variation in soybean yield: interaction among rainfall soil depth and crop management. *Field Crops Research*. 63 (3),237-246.
13. Campos, R. 2007. Experiencias de la producción de Stevia en Brasil. En: III Simposio Internacional de la Stevia. Asunción – Paraguay. 15 y 16 de Noviembre de 2007. 35 p. Ministerio de Industria y Comercio de Paraguay – Cámara Paraguaya de la Stevia – Red de inversiones y exportaciones de Paraguay. Asunción, Paraguay.
14. Estrada – Campuzano, G.; D.J. Miralles; G.A. Slafer.2008. Yield determination in Triticale as affected by radiation in different development phases. *Europ. J. Agronomy* 28 (4), 597–605.

15. Carbonell, S. y A. Pompeu. 2000. Estabilidade fenotípica de linhagens de feijoeiro em três épocas de plantio no estado de São Paulo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 35(2), 321-329.
16. Carneiro, P. 1998. Novas metodologias de análise da adaptabilidade e estabilidade de comportamento. Tese (Doutorado). 168p. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG Brasil.
17. Casaccia, J y E. Álvarez. 2006. Recomendaciones técnicas para la producción sustentable del Ka'a He'e (*Stevia rebaudiana*) Bertoni en el Paraguay. Manual No. 8. p. 43. Caacupe Ministerio de Agricultura y Ganadería, Dirección de Investigación Instituto Agronómico Nacional Agrícola. Asunción-Paraguay.
18. Chaimsohn, F. 2006. Producción y calidad del palmito al natural, en función de la población, del arreglo de plantas y del tipo de fertilización. Tesis doctoral. 205 p. Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica.
19. Cleuza A, J. Fontana y S. da Costa. 2005. Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods. *Process Biochemistry*. 40, 3587-3594.
20. Combatt, E., A. Jarma y L. Maza. 2008. Crecimiento de *Brachiaria decumbens* Stapf y *Cynodon nlemfuensis* Vandyerst, en suelos sulfatados ácidos de Córdoba. *MVZ Córdoba*. 13, 1380-1392.
21. Dacome, A., C. C. da Silva, C. E. M. da Costa, J. D. Fontana, J. Adelman y S. C. da Costa. 2005. Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods. *Process Biochemistry*. 40, 3587-3594.
22. Eberhart, S. y W. Russell. 1966. Stability parameters for comparing varieties. *Crop Science*. 6(1), 36-40.
23. Elias, H., S. Hemp, C. Scapim, M. Rodovalho, M. Royer, F. Mora y R. Barreto. 2005. Análise de estabilidade de genótipos de feijoeiro no Estado de Santa Catarina. *Acta Sci. Agron*. 27(4), 623-628.
24. Espitia, M., R. Montoya y L. Atencio. 2009. Rendimiento de *Stevia rebaudiana* Bert., bajo tres arreglos poblacionales en el Sinú Medio. *U.D.C.A.* 12 (1), 151-161.
25. Francescangeli, N., M. A. Sangiacomo y H. Martí. 2006. Effects of plant density in broccoli on yield and radiation use efficiency. *Scientia Horticulturae*. 110, 135-143.

26. Ferreira, R., M. Botrel, A. Ruggieri, A. Pereira, A. Coelho, F. Lédo y C. Cruz. 2004. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de alfafa em relação a diferente épocas de corte. *Ciência Rural*, Santa Maria. 34(1), 265-269.
27. Gan, Y., I. Stulen, H. van Keulen y P.J.C. Kuiper. 2002. Physiological response of soybean genotypes to plant density. *Field Crops Research*. 74, 231-241.
28. Geuns, J. M. 2003. Stevioside. *Phytochemistry*. 64, 913-921.
29. Guenther A., P. Zimmerman y M. Wildermuth. 1994. Natural Volatile Organic Compound Emission Rate Estimates for U.S. Woodland Landscapes. *Atmospheric Environment*. 28(6), 1197-1210.
30. Guerrero, F., y A. Jarma. 2009. Actualidad de la Stevia a nivel mundial y oportunidades de negocio para Colombia. En: 3er Congreso Colombiano de Horticultura. p. 122. Libro de resúmenes. Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas. ISBN: 978-958-98678-1-5. Bogotá-Colombia.
31. Guevara-García, A.; C. San Román; A. Arroyo; M. Cortes; M. de la Luz Gutiérrez-Nava y P. León. 2005. Characterization of the Arabidopsis *clb6* Mutant Illustrates the Importance of Posttranscriptional Regulation of the Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Pathway. *Plant Cell*. 17(2), 628-643.
32. Gower, S., C. Kucharik y J. Norman. 1999. Direct and indirect estimation of leaf area index, f_{APAR} and net primary production of terrestrial ecosystems. *Remote Sensing Environ*. 70, 29-51.
33. Handro, W., C.M. Ferreira, y E.I.S. Floh. 1993. Chromosomal variability and growth rate in cell suspension cultures of *Stevia rebaudiana*. *Plant Science*. 93, 1-2.
34. Hearn, L. K. y P. P. Subedi. 2008. Determining levels of steviol glycosides in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis*. 22(2), 165-168.
35. Holdridge, L. R. 1967. Life Zone Ecology. Tropical Science Center. San José, Costa Rica. Traducción del inglés por Humberto Jiménez Saa: *Ecología Basada en Zonas de Vida*, 1ª. ed. IICA, 1982. San José, Costa Rica.
36. Hsieh, M. y H. Goodman. 2005. The Arabidopsis *IspH* Homolog Is Involved in the Plastid Nonmevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis *Plant Physiology*. 138(2), 641-653.
37. Jaitak, V., A. Gupta, V. Kaul y P. Ahuja. 2008. Validated high-performance thin-layer chromatography method for steviol glycosides in *Stevia rebaudiana*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 47, 790-794.

38. Jarma, A., T. Rengifo y H. Aramendiz. 2005. Aspectos fisiológicos de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en el Caribe colombiano. I. Efecto de la radiación incidente sobre el área foliar y la distribución de biomasa. *Agronomía Colombiana*. 23(2), 207-216.
39. Jarma, A., T. Rengifo y H. Aramendiz. 2006. Aspectos fisiológicos de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en el Caribe colombiano. II. Efecto de la radiación incidente sobre los índices de crecimiento. *Agronomía Colombiana*. 24(1), 38-47.
40. Jarma, A. 2008. Estudios de adaptación y manejo integrado de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.): nueva alternativa agroindustrial del Caribe colombiano. Una revisión. *Rev. Col. Sc. Hort.* 2(1),109-120.
41. Jarma, A. 2009. Avances de la investigación en Stevia en Colombia. En: Memorias IV Simposio internacional de la Stevia – Ka’a He’ê. 12 y 13 de Marzo de 2009. 38 p. Ministerio de Industria y Comercio de Paraguay – Cámara Paraguaya de la Stevia – Red de inversiones y exportaciones de Paraguay. Asunción, Paraguay.
42. Kasahara, H.; A. Hanada; T. Kuzuyama; M. Takagi; Y. Kamiya y S. Yamaguchi. 2002. Contribution of the Mevalonate and Methylerythritol Phosphate Pathways to the Biosynthesis of Gibberellins in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 277 (47), 45188-45194.
43. Lafarge, T.A. y G.L. Hammer. 2002. Predicting plant leaf production: shoot assimilate accumulation and partitioning and leaf area ratio, are stable for a wide range of sorghum population densities. *Field Crops Research*. 77, 137-151.
44. Lee, J.I. 1982. New high Rebaudioside-A Stevia variety Suweon 11. p. 4. Research Reports, Office of Rural Development. S. Korea.
45. Lin, C. y M. Binns. 1988. A method for analyzing cultivar x location x year experiments: A new stability parameter. *Theoretical Applied Genetics*. 76(3), 425-430.
46. Lizaso, J., W. Batchelor y M. Westgate. 2003. A leaf area model to simulate cultivar-specific expansion and senescence of maize leaves. *Field Crops Res.* 80, 1-17.
47. Mansab A., D.L. Jeffers y P.R. Henderlong. 2003. Interrelationship between leaf area, light interception and growth rate in a soybean-wheat system. *Asian J. Plant Sci.* 2(8), 605-612.
48. Maya, D. 2000. *Stevia rebaudiana*-Bertoni. Primera edición. Corpoica. Bogotá, D.C. Colombia. 16 p.

49. Midmore, D. y A. Rank. 2002. A new rural industry - Stevia - to replace imported chemical sweeteners. p. 55. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation RIRDC. Kingston, AU.
50. Montemayor, J., J. A. Zermeño, J. Olague, R. Aldaco, M. Fortis, E. Salazar, J. Cruz y C. Vázquez-Vázquez. 2006. Efecto de la densidad y estructura del dosel de maíz en la penetración de la radiación solar. *PHYTON*. 75, 47-53.
51. Morais, S., J. de Azevedo Filho, L. Dias, C. Gonçalves y C. Antonio. 2001. Adaptabilidade e estabilidade de produção de cultivares e linhagens de feijoeiro no estado de São Paulo. *Bragantia*, 60(2): 69-77.
52. Murakami, D., A. Cardoso, C. Cruz y N. Bizao. 2004. Considerações sobre duas metodologías de análise de estabilidade e adaptabilidade. *Ciencia Rural*. 34(1),71-78.
53. Nakamura, S. y Y. Tamura. 1985. Variation in the main glycosides of stevia. *Japanese Journal of Tropical Agriculture*. 29(2), 109-115.
54. Oliveira, G., P. Carneiro, J. Carneiro y C. Cruz. 2006. Adaptabilidade e estabilidade de linhagens de feijão comum em Minas Gerais. *Pesq. agropec. bras.* 41(2), 257-265.
55. Ortegón, A., F. Díaz, J. González e I. Garza. 2006. La temperatura en la etapa reproductiva del cultivo de canola (*Brassica napus* L.). *Agric. Téc. Méx.* 32(3), 259-265.
56. Palencia, G., T. Mercado, y E. Combatt. 2006. Estudio Agro-meteorológico del Departamento de Córdoba. 126 p. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba. Gráficas del Caribe. Montería – Córdoba.
57. Pérez-López, D., L. Vásquez y J. Sahagún. 2007. Estabilidad del rendimiento de genótipos de papa (*Solanum tuberosum* L.). *Fitotecnia Mexicana*. 30(3),279-284.
58. Pimentel-Gomes, F. 1985. Curso de estatística experimental. 8ª ed. 450p. Nobel. Sao Paulo – Brasil.
59. Prado, E., D. Hiromoto, V. Campos, M. Utumi y A. Rostand. 2001. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de soja em cinco épocas de plantio no cerrado de Rondônia. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília. 36(4), 625-635.
60. Ramesh, K., V. Singh y N. W. Megeji. 2006. Cultivation of stevia [*Stevia rebaudiana* (bert.) Bertoni]: A comprehensive review. En: *Advances in Agronomy* Vol. 89. 360 p. Academic Press. San Diego, California - USA.
61. Rea, R. y O. de Sousa-Vieira. 2001. Interacción genotipo x ambiente y análisis de estabilidad en ensayos regionales de caña de azúcar en Venezuela. *Caña de*

azúcar. 19, 3-15.

62. Real-Rosas, M., A. Lucero-Arce, M. Toyota, R. López-Aguilar y B. Murillo-Amador. 2002. Variedades precoces de brécol para la diversificación agrícola en zonas áridas. INCI. 27(5), 247-251.
63. Rodríguez, J.; Sahagún, J.; Villaseñor, H.; Molina, J. y Martínez, A. 2002. Estabilidad de siete variedades comerciales de trigo (*Triticum aestivum* L.) de temporal. Fitotecnia Mexicana. 25(2),143-151.
64. Rousseaux, M.C., A.J. Hall y R.A. Sánchez. 1999. Light environment, nitrogen content and carbon balance of basal leaves of sunflower canopies. Crop Sci. 39, 1093-1100.
65. Ruiz, R. y H. Bertero. 2008. Light interception and radiation use efficiency in temperate quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) cultivars. Europ. J. Agron. 29, 144-152.
66. Scapim, C., V. Rodrigues, A. Braccini, C. Cruz, C. Bastos-Andrade y M. Conçalves. 2000. Yield stability in maize (*Zea mays* L.) and correlations among the parameters of the Eberhart and Russell, Lin and Binns, and Huehn models. Genetics and Molecular Biology. 23(2), 387-393.
67. Shu, S. 1989. *Stevia rebaudiana* variety trials. [Chinese]. Zuowu Pinzhong Ziyuan. 1, 17-18.
68. Shu, S. Z. y W.Z. Wang. 1988. Variation in quantitative characters in *Stevia*. Acta Agronomica Sinica. 14(2), 167-173.
69. Shyu, Y.T. 1994. Effects of harvesting dates on the characteristics, yield, and sweet of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Journal of Agricultural Research of China. 43(1), 29-39.
70. Slamet, I.H. y S. Tahardi. 1988. The effect of shading and nitrogen fertilization on the flowering of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Menara Perkebunan. 56(2), 34-37.
71. Squire, G. 1990. The Physiology of Tropical Crop Production. p. 236. CAB International, Wallingford, UK.
72. Stone, P.J., I.B. Sorensen y P. D. Jamieson. 1999. Effect of soil temperature on phenology, canopy development, biomass and yield of maize in a cool-temperature climate. Field Crops Research 63 (2), 169-178
73. Sumida, T. 1980. Studies on *Stevia rebaudiana* Bertoni as a possible new crop for sweetening resource in Japan. J. Central Agricultural Exp. Stn. 31, 1-71.
74. Tateo, F., M. Mariotti, M. Bononi, E. Lubian, S. Martello y L. Cornara. 1998.

- Stevioside content and morphological variability in a population of *Stevia Rebaudiana* (Bertoni) Bertoni from Paraguay. Italian Journal of Food Science. 10(3), 261-267.
75. Tewolde H., K. Sistani, D. Rowe, A. Adeli y T. Tsegaye. 2005. Estimating cotton leaf area index nondestructively with a light sensor. Agron. J. 97, 1158-1163.
76. Totté, N.; L. Charon; M. Rohmer; F. Compennolle; I. Baboeuf y J. Geuns. 2000. Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an entkaurene derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni, via the methylerythritol phosphate pathway. Tetrahedron Letters. 41, 6407-6410.
77. Totté, N.; W. Van den Ende; E. Van Damme; F. Compennolle; I. Baboeuf y J. Geuns, J. 2003. Cloning and heterologous expression of early genes in gibberellin and steviol biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway in *Stevia rebaudiana* Bertoni. Can. J. Bot. 81(5), 517-522.
78. Vance, R.R. y A.L. Nevai. 2007. Plant population growth and competition in a light gradient: A mathematical model of canopy partitioning. Journal of Theoretical Biology. 245, 210-219.
79. Vieira, M., J. de Melo-Abreu, M. Ferreira y A. Monteiro. 2009. Dry matter and area partitioning, radiation interception and radiation-use efficiency in open-field bell pepper. Scientia Hort. 121, 404-409.
80. Weng, X.Y., J.Y. Sun, y R.C. Zang. 1996. Study on the growth and physiological characteristics of *Stevia rebaudiana* SM4 [Chinese]. Journal of Zhejiang Agricultural University. 22(5), 538-540.
81. Yoda, S. K., M. O. Marques, A. J. Petenate y A. A. Meireles. 2003. Supercritical fluid extraction from *Stevia rebaudiana* Bertoni using CO₂ and CO₂ + water: extraction kinetics and identification of extracted components. Journal of Food Engineering. 57, 125-134.

3 Captación y uso de la radiación en plantas de *Stevia rebaudiana* Bert. en el Caribe Húmedo Colombiano

Light captation and use in plants of *Stevia rebaudiana* Bert. in the Humid Colombian Caribbean

Alfredo Jarma O.², Carlos Carranza G.³ y Jairo Clavijo P.⁴

3.1. RESUMEN

La captación y uso eficiente de la radiación en estevia, especie productora de edulcorantes no calóricos, es un aspecto fundamental para su explotación en regiones cálidas del Neotrópico colombiano; sin embargo, trabajos sobre estos aspectos son escasos. Este trabajo se realizó durante dos épocas de la estación seca 2007-2008 (E2 y E3), para determinar el efecto de la radiación fotosintéticamente activa (RFA) sobre la producción de biomasa de los genotipos Morita 1 (M1) y Morita 2 (M2), establecidos a 25,0; 12,5 y 6,25 plantas/m², en Montería, Córdoba. En cada época se usó un diseño experimental de bloques completos al azar con arreglo factorial 2 x 3. Se usó un modelo matemático que calculó la tasa de acumulación diaria de masa seca (MS) en hojas y tallo (simulada con el método de integración de Euler), a partir de la radiación fotosintéticamente activa (RFA), la fracción de la RFA interceptada por el dosel (*FLINT*) y el uso eficiente de la radiación (UER). En E2 se presentaron en promedio 3 MJ m⁻² día⁻¹ más que en E3, y un desarrollo del índice de área foliar IAF (3,12±0,02), que fue casi tres veces el registrado en E3. Consecuentemente, el valor más alto del coeficiente de extinción de luz a través del dosel (*k*), lo registró M2 (0,21), al cultivarse a 25 plantas/m² en E2. En esta misma época se observaron los valores más altos del UER (2,04 g MJ RFA).

Palabras clave: densidad de siembra, intercepción de luz, modelo de simulación, coeficiente de extinción, estevia.

3.2. ABSTRACT

The interception and efficient use of the radiation in stevia, species that it produces not caloric sweetener, it is a fundamental aspect for his development in warm regions of the Colombian Neotrópic; nevertheless, works on these aspects are scarce in the Country. The study was carried out in Montería, Córdoba during two periods of the dry season 2007-2008 (E2 y E3), to determine the effect of the photosynthetically active radiation (PAR) over the dry matter production of Morita 1 (M1) and Morita 2 (M2) genotypes, established at 25,0; 12,5 and 6,25 plants/m². A complete block randomized experimental design with 2 x 3 factorial arrangement was established for each season, using a mathematical model for each block to calculate the daily dry mass accumulation

² Departamento de Agronomía, Facultad Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba, Montería (Colombia). Autor de correspondencia. ajarma@sinu.unicordoba.edu.co

³ Departamento de Agronomía, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

⁴ Asesor particular. Bogotá (Colombia).

rate for leaves and stem (simulated with the Euler's integration method) using the PAR, the PAR fraction intercepted by the canopy (*FLINT*), and the efficient use of radiation (EUR). During E2, in which 3 MJ m⁻² day⁻¹ more than E3 appeared on average, and the IAF (3.12 ±0.02) that was almost three times higher than on E3. Consequently, the highest value for the light extinction coefficient (*k*) was registered in M2 (0.21), when cultivated at 25 plants/m² during the first sowing season. During the same sowing season the highest values for EUR (2.04 g MJ PAR) were observed.

Key words: crop density, light interception, simulation model, extinction coefficient, stevia.

3.3. Introduccion

Estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) es una especie cultivada en varios países debido a su poder edulcorante que puede ser hasta 300 veces más potente que la sacarosa (Jarma, 2008). Sus dos principales edulcorantes Esteviósido y Rebaudiósido A, son altamente consumidos, no sólo por personas con diabetes o dietas especiales, si no por el cada vez más creciente público que consume productos naturales bajos en calorías (Fronza y Folegatti, 2003).

Algunos trabajos sobre la fisiología de la especie en el Caribe colombiano han reportado valores de área foliar entre 878 y 1700 cm² a los 225 días después de trasplante y de hasta 27 g de hoja seca por planta (Jarma, 2008). Sin embargo, después de cultivarse hace aproximadamente 10 años en Colombia, aún se desconocen aspectos básicos de su morfología y fisiología en función de la oferta ambiental, lo que ha ocasionado que se siembren de manera indistinta, en una gran diversidad de ambientes que, en algunos casos, ha llevado a fracasos en su explotación comercial (Jarma *et al.* 2005).

Factores como la alta radiación en la época seca del Caribe Húmedo colombiano, donde se pueden registrar valores de RFA de hasta 1748 µmol m² s⁻¹ (35,8 MJ m² d⁻¹) a medio día (0,45 de la radiación incidente reportada por Jarma *et al.* 2005), pueden ocasionar efectos deletéreos tales como foto inhibición y reducción del crecimiento en plantas no adaptadas. Con base en ello, las poblaciones juegan un papel importante al variar aspectos morfológicos y probablemente alterar la captación y uso eficiente de la radiación interceptada.

Hunt (2003), indica que el crecimiento, en el contexto de plantas individuales, puede definirse como un aumento irreversible en el tiempo y que estos cambios pueden ser en tamaño, forma y ocasionalmente en número. Generalmente los análisis de crecimiento se hacen con masa seca, y plantas que crecen bajo condiciones normales, han mostrado en sus primeros estados, la misma curva típica. Sin embargo, cambios en la MS total pueden variar debido al estado fisiológico de desarrollo (Ioslovich y Gutman, 2005), la relación fuente demanda (Dayan *et al.* 2004) y el uso eficiente de la radiación (Jarma *et al.* 2006) entre otros.

En ese contexto los modelos de simulación son una herramienta importante para predecir la capacidad que posee una especie o genotipo para aclimatarse a un determinado ambiente mediante su tasa de crecimiento y productividad. Los modelos de simulación incorporan los efectos del ambiente sobre el crecimiento y desarrollo del

cultivo y se pueden usar para predecir cosechas bajo diferentes condiciones ambientales (Olesen y Grevsen 2000). Sin embargo, aunque en muchos países han sido utilizados en diversas especies, estas herramientas no han sido de uso frecuente en Colombia (Salazar *et al.* 2008).

En ausencia de estrés, la acumulación de biomasa por el cultivo depende de la RFA incidente, la cual es función de la localidad, año, fecha de siembra y fenología del cultivo, y la RFA interceptada por el dosel (*FLINT*), la cual es función del IAF y del *k*. Según Monteith (1977), la relación entre biomasa y RFA incidente generalmente es descrita como UER (g MJ^{-1}); así, el éxito de un modelo de crecimiento estará fundamentado en una adecuada descripción del IAF, el *k* y el UER (Ruiz y Bertero, 2008).

En este trabajo fue evaluada la hipótesis que el aumento de la densidad de plantas por hectárea afectaría la interceptación y uso eficiente de la radiación de dos genotipos de estevia sembrados en diferentes épocas de siembra. Al considerar que los modelos de simulación generalmente son específicos para cada especie y propósito del mismo, este trabajo tuvo como objetivo evaluar la eficiencia en la captación y conversión de la energía radiante de dos genotipos de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) al establecerse en altas poblaciones y diferentes épocas de siembra.

3.4. Materiales y métodos

3.4.1. Localización y material experimental

El trabajo se realizó en la Universidad de Córdoba (Montería - Colombia), a 13 msnm, 8°52' N y 76°48' W, temperatura anual de 28°C, 80% de humedad relativa, 1.200 mm de precipitación y brillo solar de 2108,2 h año⁻¹ (Palencia *et al.* 2006). En los semestres A y B de 2007, se sembraron los genotipos Morita 1 (M1) y Morita 2 (M2) en poblaciones de 6,25; 12,5 y 25 plantas/m², a distancias entre surcos y plantas de 0,4 x 0,4; 0,4 x 0,2 y 0,2 x 0,2 m, bajo un diseño experimental de bloques completos al azar con cuatro repeticiones y arreglo factorial de 2 (épocas) x 2 (genotipos) x 3 (poblaciones). Durante la investigación no se presentaron factores externos limitantes; el riego se realizó por goteo y se mantuvo una lámina de humedad adecuada; el manejo agronómico del cultivo se realizó con base en las recomendaciones técnicas del cultivo para el Caribe colombiano, a excepción de las poblaciones que fueron precisamente objeto del presente estudio (Espitia *et al.* 2008).

3.4.2. Muestreos del material vegetal

Para determinar MS, el primer muestreo se realizó 30 días después de siembra (dds) y 15 d después de la poda de formación; los muestreos posteriores se realizaron cada 7 d en tres plantas al azar hasta floración; en E2 se realizaron nueve muestreos entre febrero 20 y abril 17 de 2007, y en E3, se realizaron 11 entre noviembre 20 de 2007 y enero 30 de 2008. El área foliar se determinó por el método gravimétrico en cada estrato del dosel y la MS en estufa a 70°C, hasta obtener peso constante. Adicionalmente se registró el brillo solar convertido a RFA mediante la metodología de Angstrom (1924), citada por Carranza *et al.* (2008). La Tabla 3.1 registra las principales variables climáticas presentadas durante cada época de evaluación.

TABLA 3.1. Promedios diarios de radiación fotosintéticamente activa RFA ($\text{MJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$), temperaturas máximas y mínimas ($^{\circ}\text{C}$) y totales de precipitación y evaporación (mm), en dos épocas de siembra de estevia en el Caribe colombiano.

Factor	Época 2 (Sem A 2007)			Época 3 (Sem B 2007)		
	Feb-07	Mar-07	Abr-07	Nov-07	Dic-07	Ene-08
RFA	22,36	21,85	20,62	16,87	18,66	19,32
Temperatura Máxima	34,68	33,85	32,79	31,41	32,42	33,88
Temperatura Mínima	23,84	24,81	24,63	23,75	23,47	23,85
Precipitación	0,0	78,0	0,0	22,8	53,3	8,8
Evaporación	117,3	152,0	113,3	101,1	128,0	131,6

3.4.3. Componentes del modelo

Para cada época, genotipo y población se usó un modelo matemático determinístico que calculó la tasa de acumulación diaria de MS (ecuación 1) a partir de RFA, fracción de luz interceptada por el follaje ($FLINT$) y UER.

$$\delta W_t = RFA_t FLINT_t UER \quad (1)$$

Donde δW_t es el incremento diario del crecimiento ($\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$), RFA_t es la radiación fotosintéticamente activa incidente en el tiempo t ($\text{MJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$), $FLINT_t$ es la fracción de luz interceptada por el cultivo en el tiempo t y UER es el uso eficiente de la luz medido en g MJ^{-1} de RFA interceptada.

UER representa la suma de procesos de fotosíntesis y respiración, por lo que cada factor que afecte estos dos procesos lo afectará consecuentemente. $FLINT_t$, un coeficiente adimensional expresado como $1 - e^{-k IAF}$, depende del k y del IAF, el cual es estimado a partir del área foliar específica (AFE) en $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ (Lee and Heuvelink, 2003; Awal *et al.* 2004).

La estimación de los parámetros k y UER se realizó por el método de optimización no lineal usando SOLVER de Excel. Este método iterativo minimiza la suma de cuadrados de la diferencia entre el valor observado y el valor simulado (Carranza, *et al.* 2008).

3.4.4. Análisis de la información

Los valores de k y UER se analizaron por Anova con el programa Statistical Analysis System (SAS)[®] versión 9.1 para Windows; como fuentes de variación se consideraron épocas, genotipos, poblaciones y sus interacciones. El efecto de los factores individuales se analizó con la prueba de Tukey (5 y 1%). Aunque no se presentaron, las interacciones que resultaran significativas se descompondrían numéricamente a través de un Anova con el estadístico F (5%).

3.5. Resultados y discusión

3.5.1. Radiación fotosintéticamente activa

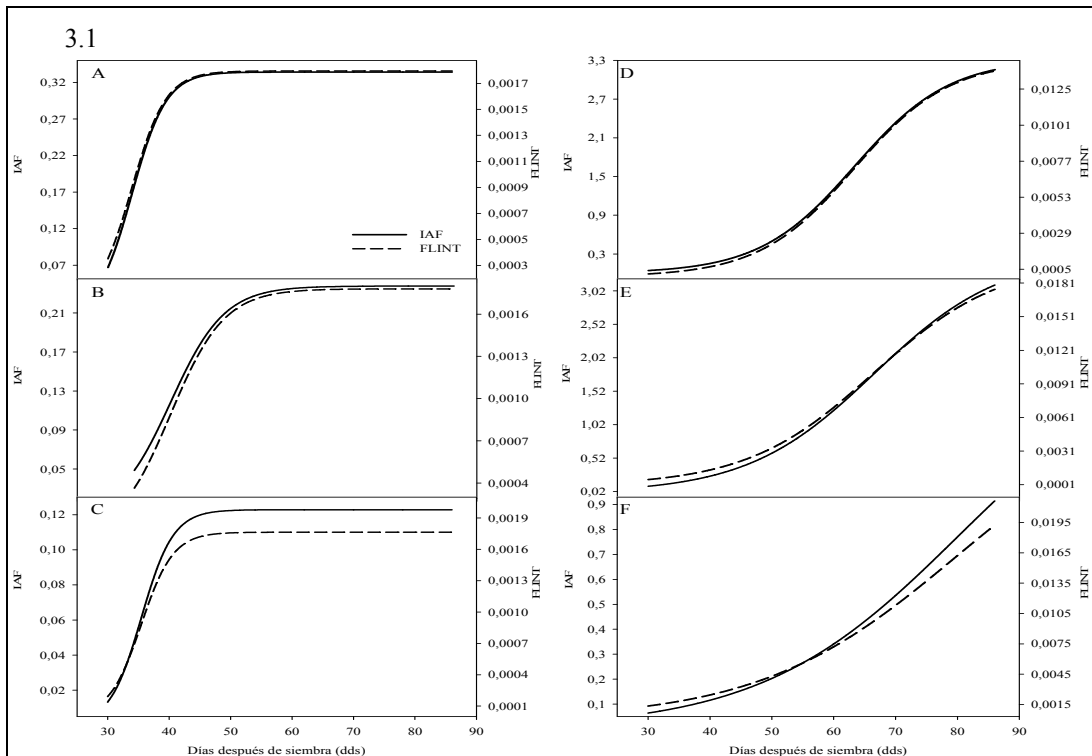
Tal como lo muestra la Tabla 3.1, en E2 y E3 se observó un promedio de RFA de 21,6 y 18,2 $\text{MJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$ respectivamente. Probablemente las diferencias en los ciclos de cultivo (datos no mostrados), podrían estar explicadas porque la mayor radiación en E2, induce temperaturas más altas, las cuales tendrían efectos sobre la velocidad de reacción enzimática (ley de Van't Hoff), que derivaría en un crecimiento más acelerado; otros efectos de la RFA entre épocas se verán reflejados en el IAF y UER, pero se discutirán

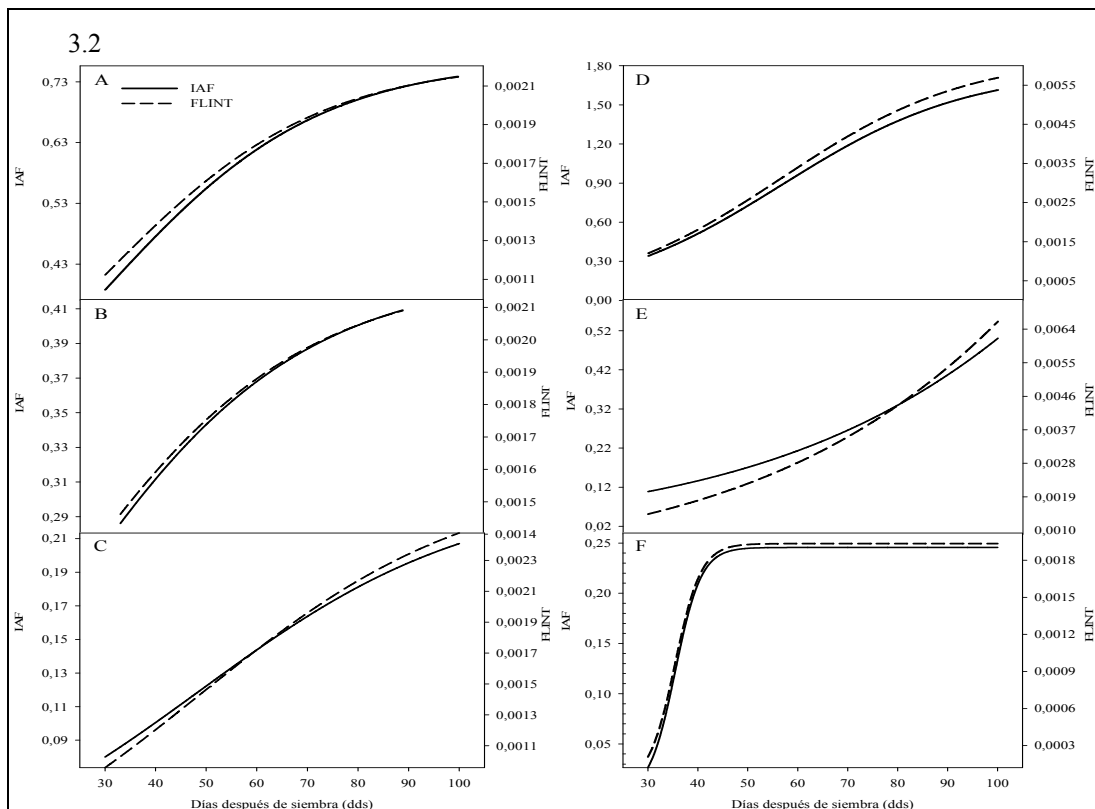
más adelante.

Aunque para estevia como especie subtropical y otras especies tropicales, estudios que relacionen efectos combinados de radiación y temperaturas son escasos (Rondon, *et al.* 2007), diversos trabajos en especies hortícolas han demostrado correlación lineal positiva entre temperatura y precocidad (Real-Rosas *et al.* 2002; Ortegón *et al.* 2006).

3.5.2. Fracción de luz interceptada

Las Figuras 3.1 y 3.2 registran respectivamente el comportamiento del IAF y la FLINT en E2 y E3; en todos los casos, los registros de M2 fueron significativamente superiores a los de M1.





FIGURAS 3.1 y 3.2. Índice de área foliar (IAF) y fracción de luz interceptada (*FLINT*) por dos genotipos de estevia cultivados entre febrero y abril de 2007 (3.1), y entre noviembre de 2007 y enero de 2008 (3.2), bajo tres densidades de población (A, B y C = Morita 1 a 25, 12,5 y 6,25 plantas/m² respectivamente; D, E y F = Morita 2 a 25, 12,5 y 6,25 plantas/m² respectivamente).

Aunque no se muestran, de manera independiente al genotipo o la época, a los 100 dds los mayores y menores valores promedios del IAF se observaron al establecer 25 y 6,25 plantas/m² (1,46 vs 0,37 respectivamente), de manera coincidente con trabajos que demuestran correlación lineal positiva del IAF con la población (Chaimsohn, 2006; Ruiz y Bertero, 2008); esto probablemente sea consecuencia de una distribución más equitativa del dosel cuando los espacios entre surcos son más angostos y un mayor número de hojas (datos no mostrados). Sin embargo, es importante considerar que, aunque la interceptación de la radiación solar incidente que asegura las máximas tasas de crecimiento del cultivo se encuentra cuando el IAF aumenta hasta el valor crítico, un excesivo autosombreamiento, podría ocasionar decrecimientos en la tasa fotosintética media por unidad de área foliar con detrimentos en la biomasa total por planta. El IAF crítico se presenta cuando se intercepta el 95 % de la RFA incidente (Andrade *et al.* 1993), por lo que se podría concluir que, dados los valores observados de la *FLINT*, el IAF crítico de estevia estuvo lejos de ser hallado en la presente investigación.

Por otra parte, los resultados evidencian un comportamiento diferencial del IAF de los genotipos en función de la época a los 100 dds, tal como lo reportó Jarma *et al.* (2005). Al pasar de E2 a E3, M2 aumentó el IAF en un 95% en tanto que M1 lo redujo en 45%. Esto podría estar explicado en parte porque M1 sería más eficiente en reducir su fotorrespiración y/o aumentar su fotosíntesis a radiaciones menores como las de E3 (menor temperatura interna de la hoja), como lo proponen Taiz y Zeiger (2006),

traduciendo esta ventaja en mayor desarrollo de su IAF en E3. Los máximos valores de IAF observados por genotipo fueron de 3,15 para M2 (E2) y 0,73 para M1 (E3), que estarían dentro del rango de IAF reportados para estevia, 0,35 (Lima-Filho, 2004) a 4,83 (Fronza y Folegatti, 2003).

Tal como se reporta para otras especies hortícolas, la *FLINT* siguió una tendencia paralela al IAF (Carranza *et al.* 2008); independientemente a la población, estos valores fueron inferiores para M1 (0,001) respecto a M2 (0,01). En Colombia no existen reportes de *FLINT* en estevia por lo que estos resultados, que pueden considerarse como muy bajos respecto a otras especies, no tienen referencias; el rango de luz interceptada por el dosel demuestra muy baja eficiencia en la captación de luz de estos genotipos bajo las condiciones del estudio. Valores de *FLINT* en otros cultivos (0,6 en brócoli o 0,9 en repollo al final del ciclo) han sido reportados por Carranza *et al.* (2008).

3.5.3 Coeficiente de extinción y uso eficiente de la radiación

No se presentaron efectos significativos de las interacciones para ninguna de las variables (*k* y UER), aunque sí para factores individuales (Tabla 3.2). El coeficiente de extinción fue afectado por la población y el UER por la época ($P \leq 0,01$).

TABLA 3.2. Significancia estadística de variables ecofisiológicas de estevia en función de la época, el genotipo y la población por hectárea. Montería – Córdoba, 2007.

Parámetro	Fuente de Variación				Estadísticos	
	E	G	P	CV	CME	MEDIA
Coeficiente de extinción (<i>k</i>)	NS	NS	*	24,8	$43 \cdot 10^{-5}$	0,08
Uso eficiente de la luz UER	**	NS	NS	0,05	$1 \cdot 10^{-7}$	2,02 g MJ ⁻¹

E, época; G, genotipo; P, Población; CV, coeficiente de variación; CME, cuadrado medio del error; NS, no significativo; * significativo ($P \leq 0,05$); ** altamente significativo ($P \leq 0,01$).

Coeficiente de extinción (k).

Aunque no se tienen referencias para estevia, los valores observados de *k*, que oscilaron entre 0,03 (E3; M2; 6,25 plantas/m²) y 0,21 (E2; M2; 25 plantas/m²), pueden considerarse como bajos respecto a cultivos como maíz (0,29), papa (0,45), frijol (0,55), palma de aceite (0,66) y banano (0,68) (Rodríguez, 2009).

La Tabla 3.3, muestra las diferencias del *k* al aumentar la población ($P \leq 0,05$); el mayor valor de *k* (0,15), al establecer 25 plantas/m², sugiere que para esta población se presenta mejor interceptación de RFA como consecuencia directa de un mayor valor del IAF; esto podría estar explicado por un mejor ordenamiento espacial del dosel respecto a distancias rectangulares ó bajas poblaciones. Tendencias similares de aumento del *k* en función de la población se han reportado en café (Castillo *et al.* 1996), tomate (Heuvelink, 1996), papa (Cabezas y Corchuelo, 2005) y otras especies (Ruíz y Bertero, 2008; Flenet *et al.* 1996). Sin embargo, algunos autores han encontrado decrecimientos del *k* al aumentar la población en cebada (Kemanian *et al.* 2004), brócoli (Francescangeli *et al.* 2006) y maíz (Westgate *et al.* 1997), aunque estos últimos indicaron que el decrecimiento del *k* al aumentar la población, no se afectó por la distancia entre surcos antes del cierre del dosel. Es sabido que en general, genotipos de una misma especie con valor bajo de *k*, pueden cultivarse a densidades más altas porque, a pesar del hacinamiento en que crecen estas plantas, las estructuras de sus

doseles y disposición de sus hojas logran distribuir mejor la luz incidente.

TABLA 3.3. Comparación de medias de parámetros fisiológicos de estevia en función de la época, el genotipo y la población por hectárea. Montería – Córdoba, 2007.

Parámetro	Factor						
	Época		Genotipo		Población (plantas/m ²)		
	E2	E3	M1	M2	6.25	12.5	25
<i>K</i>	0.09 a ¹	0.07 a	0.07 a	0.09 a	0.04 b	0.05 b	0.15 a
UER (g MJ RFAI ⁻¹)	2.04 a	1.99 b	2.02 a	2.02 a	2.02 a	2.02 a	2.02 a

E2 = Época 2 y E3 = Época 3; M1 = Morita 1 y M2 = Morita 2; ¹Promedios con la letras iguales dentro de un mismo factor y parámetro, no difieren estadísticamente ($\alpha=0.05$) de acuerdo a la Prueba del rango estudentizado de Tukey.

Uso eficiente de la radiación (UER)

El valor promedio estimado de UER (2,02 g MJ⁻¹), puede considerarse como normal dentro del rango típico de cultivos C₃ (Vieira *et al.* 2009); éste valor estaría por debajo de trigo (2,70 g MJ⁻¹, Abbate *et al.* 1997) y cebada (2,63 g MJ⁻¹, Bingham *et al.* 2007), similar a maní (2,0 g MJ⁻¹, Kiniry *et al.* 2005) y pasto raygrass (2,01 g MJ⁻¹, Akmal y Janssens, 2004) y mayor que guisante (1,52 g MJ⁻¹, O'Connell *et al.* 2004) y soya (1,2–2,0 g MJ⁻¹, Egli y Bruening, 2000).

El UER fue mayor en 0,05 g MJ⁻¹ en E2 respecto a E3 (Tabla 3.3); en E2 se presentaron igualmente mayores niveles de RFA, confirmando lo propuesto por Jarma *et al.* (2005), que M1 y M2, responden positiva pero diferencialmente en la producción de biomasa al aumentar la oferta de luz. Probablemente, los mayores valores de tejido foliar por unidad de área observados en E2, principalmente de M2, contribuyan a explicar estas diferencias que traerían como consecuencia, mayores tasas fotosintéticas respecto a E3. Aunque en pimienta, Vieira *et al.* (2009), no encontraron efectos de la época de siembra sobre el UER, resultados similares a este estudio han sido reportados para otros cultivos (Squire, 1990; Gower *et al.* 1999). Es importante considerar que estevia es una planta perenne sub-tropical y que para este caso, el UER se estimó con base en la biomasa del dosel; esto puede ser relevante debido a que el UER en cultivos perennes es más complejo de interpretar respecto a cultivos anuales, ya que la biomasa producida no solo depende de la eficiencia en la conversión de la RFA interceptada, si no que también juega un papel fundamental la removilización de reservas acumuladas, probablemente en raíz (Guzmán *et al.* 2007).

Por otra parte, aunque en E2 los niveles de radiación fueron altos, al parecer no afectaron negativamente la fotosíntesis y, probablemente la radiación difusa aprovechable por el dosel, sería mayor que en E3.; en este sentido, Ruiz y Bertero (2008), indican que el UER podría incrementarse con un aumento en la fracción difusa, ya que se incrementa la proporción de área fotosintética que está operando a niveles de radiación no saturantes.

Por último, la temperatura también ayudaría a explicar las diferencias en el UER entre épocas. Aunque existirá un punto de saturación por altas temperaturas no determinado en este trabajo, la diferencia de 1,2°C/día a favor de E2, podría mejorar la eficiencia en el uso de la radiación respecto a E3, tal como se ha reportado para otros cultivos como colza de invierno (Justes *et al.* 2000) y alfalfa (Brown *et al.* 2006).

3.6. Conclusiones

El efecto diferencial de las radiaciones y su interacción con el genotipo, fueron los factores más determinantes en las respuestas de las variables evaluadas en el presente estudio. El IAF fue afectado de manera diferencial, siendo un 95% mayor para M2 en la E2. Aunque la *FLINT* siguió la misma tendencia del IAF, los valores observados para esta variable y consecuentemente para el *k*, pueden considerarse como bajos al compararlos con otras especies de crecimiento similar.

El UER fue significativamente más alto en E2, diferencia que estaría explicada por el mayor desarrollo del tejido asimilatorio de M2 respecto a M1 en E2. Este comportamiento indica una mayor eficiencia de M2 en el aprovechamiento de la RFA en E2, el cual estaría demostrado por una mejor distribución de biomasa hacia las hojas, cuyos valores pueden ser del 60 % de la biomasa total del dosel de la planta (datos no mostrados).

3.7. Literatura citada

1. Abbate, P. E, F. H. Andrade, J. P. Culot y P. S. Bindraban, 1997. Grain yield in wheat: effects of radiation during spike growth period. *Field Crops Res.* 54, 245-257.
2. Akmal, A. y M. J. Janssens. 2004. Productivity and light use efficiency of perennial ryegrass with contrasting water and nitrogen supplies. *Field Crops Res.* 88, 143-155.
3. Andrade, F., S.A. Uhart y M.I. Frugone, 1993. Intercepted radiation at flowering and kernel number in maize: shade vs. Plant density effects. *Crop Sci*, 33:482-485.
4. Awal, M.A., I. Wan, J. Endan y M. Haniff. 2004. Determination of specific leaf area and leaf area-leaf mass relationship in oil palm plantation. *Asian J. Plant Sci.* 3(3), 264-268.
5. Bingham, I., J. Blake, M. J. Foulkes y J. Spink. 2007. Is barley yield in the UK sink limited? I. Post-anthesis radiation interception, radiation-use efficiency and source-sink balance. *Field Crops Res.* 101, 198-211.
6. Brown, H., D. Moot, y E. Teixeira. 2006. Radiation use efficiency and biomass partitioning of lucerne (*Medicago sativa*) in a temperate climate. *Eur. J. Agr.* 56(4), 319-390.
7. Cabezas, M. y G. Corchuelo. 2005. Estimación de la interceptación de la radiación solar en papa criolla (*Solanum phureja* Juz. et Buk.) en tres localidades colombianas. *Agron. Colomb.* 23(1), 62-73.
8. Carranza, C., O. Lancho, D. Miranda, M. Salazar y B. Chaves. 2008. Modelo simple de simulación de distribución de masa seca en brócoli (*Brassica sp.*) variedad Coronado y repollo (*Brassica oleracea*) híbrido Delus cultivados en la

Sabana de Bogotá. Agron. Colomb. 26(1), 23-31.

9. Castillo, E., A. Jaramillo, J. Arcila y J. Sanabria. 1996. Coeficientes de extinción de la radiación fotosintéticamente activa en *Coffea arabica* L. *Atmósfera* 24, 65-70.
10. Chaimsohn, F. 2006. Producción y calidad del palmito al natural, en función de la población, del arreglo de plantas y del tipo de fertilización. Tesis doctoral. Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica.
11. Dayan, E., E. Presnov y M. Fuchs. 2004. Prediction and calculation of morphological characteristics and distribution of assimilates in the ROSGRO model. *Math. Comput. Simul. (MATCOM)* 65, (1-2), 101-116.
12. Egli, D. y W. Bruening. 2000. Potential of early-maturing soybean cultivars in late plantings. *Agron. J.* 92, 532-537.
13. Espitia, M., R. Montoya y A. Jarra. 2008. *Stevia* en el Caribe colombiano. Universidad de Córdoba, Montería, Colombia.
14. Flenet, F., J. Kiniry, J. Board, M. Westgate y D. Reicosky. 1996. Row spacing effects on light extinction coefficients of corn, sorghum, soybean, and sunflower. *Agron. J.* 88(2), 185-190.
15. Francescangeli, N., M. Sangiacomo, y H. Martí. 2006. Effects of plant density in broccoli on yield and radiation use efficiency. *Scientia Hort.* 110, 135-143.
16. Fronza, D. y M. Folegatti. 2003. Water consumption of the estevia (*Stevia rebaudiana* (bert.) Bertoni) crop estimated through microlysimeter. *Scientia Agric.* 60(3), 595-599.
17. Gower, S., C. Kucharik y J. Norman. 1999. Direct and indirect estimation of leaf area index, f_{APAR} and net primary production of terrestrial ecosystems. *Remote Sensing Environ.* 70, 29-51.
18. Guzmán, C., M. Spada y J. Mombelli. 2007. Eficiencia del uso de la radiación de cultivares de alfalfa de distinto grado de reposo en Córdoba. Vol. 8. Ediciones INTA, Córdoba, Argentina.
19. Heuvelink, 1996. Dry matter partitioning in tomato: validation of a dynamic simulation model. *Ann. Bot.* 77, 71-80.
20. Ioslovich, I. y P. Gutman. 2005. On the botanic model of plant growth with intermediate vegetative-reproductive stage. *Theor. Pop. Biol.* 68(3), 147-156.
21. Jarra, A. 2008. Estudios de adaptación y manejo integrado de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.): nueva alternativa agroindustrial del Caribe colombiano. Una revisión. *Rev. Colomb. Cienc. Hortíc.* 2(1), 109-120.

22. Jarma, A., T. Rengifo y H. Aramendiz. 2005. Aspectos fisiológicos de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en el Caribe colombiano. I. Efecto de la radiación incidente sobre el área foliar y la distribución de biomasa. *Agron. Colomb.* 23(2), 207-216.
23. Jarma, A., T. Rengifo y H. Aramendiz. 2006. Aspectos fisiológicos de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en el Caribe colombiano. II. Efecto de la radiación incidente sobre los índices de crecimiento. *Agron. Colomb.* 24(1), 38-47.
24. Justes, E., P. Denoroy, B. Gabrielle y G. Gosse. 2000. Effect of crop nitrogen status and temperature on the radiation use efficiency of winter oilseed rape. *Eur. J. Agron.* 13(2-3), 165-177.
25. Kemanian, A., C. Stöckle y D. Huggins. 2004. Variability of barley radiation-use efficiency. *Crop Sci.* 44, 1662-1672.
26. Kiniry, J., C. Simpson, A. Schubert y J. Reed. 2005. Peanut leaf area index, light interception, radiation use efficiency, and harvest index at three sites in Texas. *Field Crops Res.* 91, 297-306.
27. Lee, J. y E. Heuvelink. 2003. Simulation of leaf area development based on dry matter partitioning and specific leaf area for cut chrysanthemum. *Ann. Bot.* 91, 319-327.
28. Lima-Filho, O. 2004. Análise quantitativa do crescimento da estévia. Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS, Brasil.
29. Monteith, J. 1977. Climate and the efficiency of crop production in Britain. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B* 281, 277-294.
30. O'Connell, M., G. O'Leary, D. Whitfield y D. Connor. 2004. Interception of photosynthetically active radiation and radiation-use efficiency of wheat, field pea and mustard in a semi-arid environment. *Field Crops Res.* 85, 111-124.
31. Olesen, J. y K. Grevsen. 2000. A simulation model of climate effects on plant productivity and variability in cauliflower (*Brassica oleracea* L. *botrytis*). *Scientia Hort.* 83, 83-107.
32. Ortegón, A., F. Díaz, J. González e I. Garza. 2006. La temperatura en la etapa reproductiva del cultivo de canola (*Brassica napus* L.). *Agric. Téc. Méx.* 32(3), 259-265.
33. Palencia, G., T. Mercado y E. Combatt. 2006. Estudio Agrometeorológico del Departamento de Córdoba. pp. 126. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba. Gráficas del Caribe. Montería - Colombia.
34. Real-Rosas, M., A. Lucero-Arce, M. Toyota, R. López-Aguilar y B. Murillo-Amador. 2002. Variedades precoces de brécol para la diversificación agrícola en zonas áridas. *INCI*, 27(5), 247-251.

35. Rodríguez, W. 2009. Interceptación de la luz y fotosíntesis del dosel. En: Fisiología de la producción de los cultivos tropicales, <http://www.mgta.usm.cl/assets/Uploads/CaptuloInterceptacinLuzfotosntesis.pdf>; 228 p.; consulta: octubre de 2009.
36. Rondon, J., L. Zaidan, M. Domingos, C. Barbero y R. Figueiredo. 2007. Vegetative responses to temperature and photoperiod in saplings of brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae). *Braz. J. Plant Physiol*, 18(4), 467-474.
37. Ruiz, R. y H. Bertero. 2008. Light interception and radiation use efficiency in temperate quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) cultivars. *Europ. J. Agron.* 29, 144-152.
38. Salazar, M., J. Jones, B. Chaves y A. Cooman. 2008. A model for the potential production and dry matter distribution of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) *Scientia Hort.* 115, 142-148.
39. Squire, G. 1990. *The Physiology of Tropical Crop Production*. pp. 236. CAB International, Wallingford, UK.
40. Taiz, L. y Zeiger, E. 2006. *Plant physiology*. pp 764. 4^a ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.
41. Vieira, M., J. De Melo-Abreu, M. Ferreira y A. Monteiro. 2009. Dry matter and area partitioning, radiation interception and radiation-use efficiency in open-field bell pepper. *Scientia Hort.* 121, 404-409.
42. Westgate, M., F. Forcella, D. Reicosky y J. Somsen. 1997. Rapid canopy closure for maize production in the northern US corn belt: radiation-use efficiency and grain yield. *Field Crops Res.* 49, 249-258.

4 Contenido de glucósidos en función de deficiencias nutricionales en *Stevia rebaudiana* Bert.

Glycoside content depending on the nutritional faults in *Stevia rebaudiana* Bert.

Alfredo Jarma Orozco, Janer Polo Santos, Enrique Combatt Caballero⁵

4.1 RESUMEN

A nivel mundial, los reportes de los requerimientos nutricionales de estevia así como de los efectos que las deficiencias de los elementos minerales tienen sobre el contenido de los principales edulcorantes de la hoja, son escasos. El presente trabajo se realizó en Casa de Vegetación de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Córdoba (Montería - Colombia), durante el 2008. El objetivo del mismo fue determinar el efecto de las deficiencias nutricionales de N, P, K, Ca, S, Mg, Fe, B, Cu y Zn sobre la concentración de glucósidos totales de la hoja de estevia y en particular del rebaudiósido A (RebA) en el genotipo Morita 2. Así mismo se determinó quincenalmente el contenido de N, P, K, Ca y Mg de las raíces, el tallo y las hojas en dos genotipos, Morita 1 (M1) y Morita 2 (M2), hasta el momento de inicio de floración y se estimó la extracción de estos elementos para una siembra comercial. Los resultados más relevantes indicaron que la concentración de glucósidos totales (RebA y St) no se afectó por las deficiencias de nutrientes, aunque la concentración de RebA sólo se redujo ante deficiencias de P, S y Cu. La distribución diferencial entre genotipos de los elementos mayores en los órganos de la planta, permitió establecer la extracción de estos, que fue respectivamente para M1 y M2 de 24,9 y 30,8 (N); 4,8 y 6,3 (P); 23,7 y 29,9 (K); 9,7 y 10,8 (Ca) y 6,7 y 6,3 (Mg).

Palabras clave: Estevia, estrés nutricional, esteviósidos, rebaudiósido A, nutrición mineral.

4.2 ABSTRACT

Worldwide, there are few reports of stevia nutritional requirements, as well as the effects of deficiencies of mineral elements on the content of the main sweetener of the leaf. The study was carried at House Vegetation of the Faculty of Agricultural Sciences, University of Córdoba (Monteria - Colombia), in 2008. The objective was to determine the effect of nutritional deficiencies of N, P, K, Ca, S, Mg, Fe, B, Cu and Zn on the concentration of total glycosides of the stevia leaf, in particular of rebaudioside A (RebA) in Morita 2 genotype. Also, every 15 days, the content of N, P, K, Ca and Mg from the roots, stems and leaves in two genotypes, Morita 1 (M1) and Morita 2 (M2), until the time of onset flowering was estimated. We also evaluated the removal of these elements for commercial planting. The main results indicated that the concentration of total glycosides (RebA and St) was not affected by nutrient deficiencies, although the concentration of RebA was reduced only to deficiencies in P, S and Cu. The differential distribution among genotypes of the major elements in the plant organs, allowed to establish the extraction of these, which was respectively for M1 and M2 of 24.9 and

⁵ Profesores Investigadores Universidad de Córdoba. Montería. Correo: ajarma@sinu.unicordoba.edu.co

30.8 (N), 4.8 and 6.3 (P), 23.7 and 29.9 (K), 9.7 and 10.8 (Ca) and 6.7 and 6.3 (Mg).

Key words: Stevia, nutritional stress, steviosides, rebaudioside A, mineral nutrition.

4.3 Introducción

El género *Stevia*, es exclusivo del continente americano y se distribuye desde el sudeste de Estados Unidos hasta Argentina. *Estevia* (*Stevia rebaudiana* Bert.), es nativa del Norte de Paraguay, donde ha sido utilizada por mucho tiempo por los indígenas nativos en tés y preparaciones de alimentos (Dacome *et al.* 2005); sus principales propiedades son edulcorante y medicinal.

La información científica ha reportado que la cantidad de los constituyentes activos de la hoja, especialmente el esteviósido (St) y rebaudiósido A (RebA), los dos principales glucósidos (Brandle y Telmer, 2007; Brandle, 2005), dependen en gran medida del genotipo y las condiciones ambientales (Gardana *et al.* 2010), del paquete de prácticas agronómicas como la nutrición (Nepovim *et al.* 1998; Geuns, 2003; Das *et al.* 2007) y el riego (Fronza y Folegatti, 2003) entre otros; éste último puede llegar a aumentar los rendimientos de hoja seca por hectárea a 2000-3000 kg y el contenido de glucósidos a 15-20% (Barathi, 2002).

Los estudios que abordan el tema de la nutrición en *estevia* en el mundo son escasos (Ramesh *et al.* 2006), pudiéndose resaltar trabajos adelantados con biofertilizantes en India, en los que se demostró el efecto positivo de la combinación de bacterias solubilizadoras de fósforo, micorrizas y azotobacter sobre el incremento de la biomasa de plantas completas (Das *et al.* 2008); trabajos de fertilización de síntesis química en Brasil, en los que, para obtener una tonelada de hoja seca por hectárea, se reportan requerimientos (kg/ha) de N:130; P:18,8 K:131,5; Ca:43,7; Mg:8,3 y S:9,7 (Utumi *et al.* 1999; De Lima *et al.* 1997a; De Lima y Malavolta, 1997); trabajos de nutrición mineral en Colombia que reportan requerimientos de 70, 9.2 y 32 kg/ha de N, P y K respectivamente para obtener una tonelada de de hoja seca por hectárea (Jarma, 2008; Galván y Guzman, 2003). Desde el punto de vista del efecto de deficiencias nutricionales sobre la cantidad de glucósidos, De Lima *et al.* (1997b), reportan que solamente una deficiencia severa de calcio ocasionó reducciones significativas en la concentración de los edulcorantes.

El presente trabajo fue desarrollado con dos propósitos, *i*) determinar el efecto de las deficiencias nutricionales de N, P, K, Ca, S, Mg, Fe, B, Cu y Zn, sobre la concentración total de glucósidos de la hoja, el contenido relativo de RebA y la relación entre éste y el St (Reb-A/St) de M2; y *ii*) evaluar el contenido de elementos mayores en raíces, tallos y hojas hasta la primera cosecha de hojas de los genotipos M1 y M2.

4.4 Materiales y métodos

4.4.1 Localización y material experimental

Se desarrollaron dos trabajos durante el segundo semestre de 2008. El ensayo de deficiencias nutricionales se adelantó bajo condiciones controladas en los invernaderos experimentales y el de distribución de nutrientes en campo, ambos ubicados en la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Córdoba (Montería-Colombia), coordenadas de 8° 52' de latitud norte y 76° 48' de longitud oeste, 13 m.s.n.m. y

temperatura media anual de 28° C.

4.4.2. Contenido de glucósidos en función de deficiencias nutricionales

Se establecieron once (11) tratamientos bajo un diseño completamente al azar con tres repeticiones. Cada unidad experimental (UE) correspondió a 15 plantas de M2 sembradas con la misma edad fisiológica (esquejes con 6 pares de hojas), a las cuales se aplicó tres veces por semana una solución nutritiva con el elemento faltante y un testigo experimental (solución completa sin deficiencias de elementos), así: T1(testigo experimental TE), T2 (-N), T3 (-K), T4 (-Ca), T5 (-Mg), T6 (-P), T7 (-S), T8 (-Fe), T9 (-B), T10 (-Cu), T11 (-Zn). Aunque se incluyó el tratamiento sin Mn, no fue posible obtener lectura de glucósidos en las muestras de este tratamiento (escasez de material vegetal), por lo que éste no se considerará. Como solución nutritiva se usó la solución madre de Johnson adaptada por De Lima y Malavolta en 1997 (Tabla 4.1), a la cual se le retiraron los elementos respectivos de acuerdo a cada tratamiento. Antes de establecer el experimento, los esquejes se colocaron en agua deionizada durante siete días. La siembra se realizó en macetas plásticas de 5 L de capacidad que contenían un sustrato de arena inerte lavada (6.92 de pH; 0.0% de M.O.; 22, 5.6, 0.9, 76, 0.4 y 79,8 ppm de S, P, Cu, Fe, Zn y Mn respectivamente; 2.1, 0.7, 0.06, 0.11 y 3.0 meq/100 g de suelo de Ca, Mg, K, Na y CIC respectivamente). El muestreo foliar se realizó a 10 plantas escogidas al azar de cada UE a los 75 días después del trasplante (ddt), justo al momento de iniciar floración.

TABLA 4.1. Solución madre de Johnson (adaptada por De Lima y Malavolta en 1997)

Solución	Compuesto	Concentración
A	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1 M (236 g.L ⁻¹)
B	KNO ₃	1 M (101 g.L ⁻¹)
C	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 M (246.5 g.L ⁻¹)
D	K ₂ HPO ₄	1 M (136 g.L ⁻¹)
E	FeSO ₄	25 g.L ⁻¹
E	NaOH	14 g.L ⁻¹
E	Etilenodiaminetracetato de Sodio	26 g.L ⁻¹
F	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.82 g.L ⁻¹
G	H ₃ BO ₃	2.86 g.L ⁻¹
H	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.22 g.L ⁻¹
I	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.88 g.L ⁻¹
J	NaNO ₃	1 M (85.01 g.L ⁻¹)
K	MgCl ₂	1 M (95.23 g.L ⁻¹)
L	Na ₂ SO ₄	1 M (142.06 g.L ⁻¹)
M	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	1 M (138.01 g.L ⁻¹)
N	CaCl ₂	1 M (110.99 g.L ⁻¹)
O	KCl	1 M (74.55 g.L ⁻¹)

La concentración de glucósidos totales se estimó en porcentaje de peso seco de la hoja por el método de cromatografía líquida de alta eficacia, se calculó utilizando en la fase móvil una mezcla de Acetonitrilo y agua (80:20), con una columna Kromasil 100-5HN₂ (método isocrático) y un patrón de un 90% de pureza. Estos análisis fueron realizados por el Laboratorio de Control de Calidad de la empresa Prodalysa Ltda (Chile). Solo se consideró la presencia de RebA en función de los glucósidos totales (GT), por ser el de

mayor importancia económica (Liu *et al.* 2010). La diferencia entre GT y RebA se asumió como contenido de St para efectos de establecer la relación RebA/St. Los datos obtenidos fueron analizados bajo el software estadístico *Statistical Analysis System* (SAS) versión 9.1 y las pruebas de comparación de media se estimaron al 5% bajo la prueba de DMS.

4.4.3 Distribución de nutrientes en función del órgano y la edad

En este experimento se determinaron quincenalmente los contenidos nutricionales de hojas, tallos y raíces de plantas completas de M1 y M2 hasta el momento de inicio de floración; este estado se alcanzó a los 60 y 75 ddt para M1 y M2 respectivamente. Para ello, se establecieron 1260 plantas de cada genotipo sembrados a 0.4 x 0.2 m entre surcos y plantas respectivamente. Los muestreos destructivos se realizaron cada vez sobre 10 plantas de cada genotipo escogidas al azar y en competencia intra-específica. Para cuantificar Ca, K, Mg y P, inicialmente se calcinaron las muestras de tejido foliar para obtener los óxidos o sales de los elementos, los cuales fueron posteriormente disueltos con ácido clorhídrico 1:1 y llevados a un volumen conocido. La determinación se realizó por espectrofotometría de absorción atómica (EAA), que para el caso del Ca, K y Mg se realizó una dilución previa en la que se adiciona lantano y sodio como supresores de ionización. Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Suelos de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá.

4.5 Resultados y discusión

4.5.1 Contenido de glucósidos en función de deficiencias nutricionales

Los resultados indicaron que la concentración total de glucósidos presentes en las hojas, que puede considerarse como bajo respecto a otros reportes (Hearn y Subedi, 2006), no se vio afectado significativamente ($p > 0.05$) por ninguno de los tratamientos en los que se indujo deficiencia nutricional (Tabla 4.2). Aunque existen pocas referencias mundiales, resultados similares reportaron De Lima y Malavolta (1997), quienes al evaluar el efecto de las deficiencias de N, P, K, Ca, Mg, S, B y Zn sobre la concentración de glucósidos, sólo encontraron efectos importantes en la reducción del edulcorante ante deficiencias severas de Ca; sin embargo, los autores no discuten sus resultados.

Por su parte, Utumi *et al.* (1999), encontraron que sólo las deficiencias de K, Ca y S disminuyeron la concentración de glucósidos (dag/kg hoja seca), pero todas las deficiencias, a excepción de la de P, disminuyeron el contenido total de estos en la planta; los autores concluyeron que esto último fue una consecuencia directa de la reducción en la biomasa de la misma.

TABLA 4.2. Significancia estadística de variables de calidad de la hoja de estevia en función de 11 tratamientos de deficiencias nutricionales. Montería – Córdoba, 2006-2007.

Fuente de Variación	gl	Cuadrado Medio del Error		
		GT (dag/kg hoja seca)	RebA (% de GT)	Relación RebA/St
Tratamientos	10	4,12 NS	8,97**	0,2593**
Media		8,57	76,2	3,39
CV (%)		23,6	3,9	15,0

GT=Glucósidos totales; Reb-A=Rebaudiósido A; St=Esteviósido; CV = Coeficiente de variación y gl = Grados de Libertad. NS, * y ** = no significativo, significativo

($p \leq 0.05$) y altamente significativo ($p \leq 0.01$) respectivamente.

Aunque sin duda la nutrición juega un papel definitivo en la síntesis de estas moléculas edulcorantes (Epstein y Bloom, 2005; Jarma, 2008; Das *et al.* 2008), es posible que factores no considerados en el estudio como luz (Ramesh, 2006; Allam *et al.* 2001), temperatura (Mizukami *et al.* 1983), agua (Fronza y Folegatti, 2003), técnicas de manejo (Geuns, 2003) y edad de las plantas (De Lima y Malavolta, 1997), entre otros, probablemente jugaron un papel más determinante que las respuestas observadas en este trabajo por efecto de las deficiencias.

Un resultado interesante del presente trabajo permite establecer que, a pesar de no encontrarse variaciones en la concentración de GT, la concentración del RebA sí varió significativamente ($p \leq 0.01$) cuando se indujeron las deficiencias (Figura 4.1). Estos resultados pueden considerarse como novedosos ya que, los pocos estudios publicados de nutrición y cantidad de glucósidos, siempre se refieren a glucósidos totales sin discriminarlos.

La Figura 4.1 indica que la concentración de RebA se redujo significativamente ($p \leq 0.05$) respecto al TE, cuando se indujeron deficiencias de P, S y Cu, pero que las deficiencias de N, K, Ca, Mg, Fe, B y Zn, al parecer, no causan decrecimientos importantes en este glucósido. Resultados similares reportaron Bondarev *et al.* (2003), al no encontrar efecto de los elementos nutricionales sobre el balance de glucósidos en las hojas de estevia a nivel *in vitro*. Los resultados del S son coincidentes con los de Utumi *et al.* (1999). Sin embargo, es importante considerar que los autores citados, evaluaron la concentración total de glucósidos, donde además de RebA y St, estarían presentes otras moléculas edulcorantes en menor proporción y lo que haría diferencia con los resultados observados en este estudio.

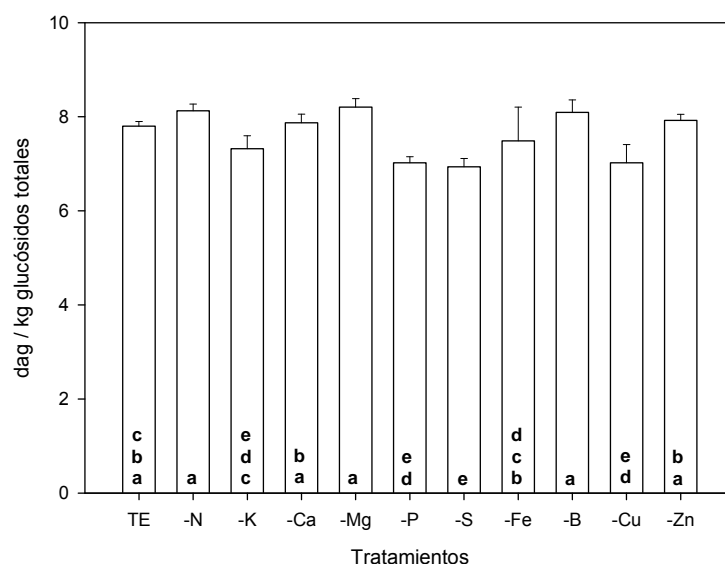


FIGURA 4.1. Concentración de rebaudiósido A en hojas de estevia sometidas a deficiencias nutricionales (Montería-Córdoba, 2008). Barras con la misma letra no difieren estadísticamente de acuerdo al test protegido de DMS (5%); I = Desviación estándar.

Uno de los criterios mundiales para determinar la calidad de la hoja está dado por la cantidad de RebA presente en las hojas, ya que los extractos considerados como más valiosos, son aquellos que tienen RebA como el principal componente (Dacome *et al.* 2005); esto es debido a sus características organolépticas y fisicoquímicas, al presentar el mejor perfil de sabor respecto a los otros glucósidos y tener una mayor solubilidad en el agua, lo que permite una mayor variedad de formulaciones (Brandle, 1999; Brandle *et al.* 2002).

Al considerar la relación RebA/St, los resultados indicaron que se presentaron diferencias estadísticas ($p \leq 0.01$), en función de las deficiencias nutricionales (Tabla 4.3).

TABLA 4.3. Relación RebA/St en hojas de estevia sometidas a deficiencias nutricionales. (Montería - Córdoba, 2008).

Tratamiento	Promedio \pm SD
- Mg	4,61 \pm 0,53 a
- N	4,35 \pm 0,42 ab
- B	4,31 \pm 0,81 ab
-Zn	3,82 \pm 0,31 abc
- Ca	3,72 \pm 0,42 bc
TE	3,55 \pm 0,20 bcd
- Fe	3,17 \pm 1,02 cde
- K	2,75 \pm 0,37 def
- Cu	2,39 \pm 0,43 ef
- P	2,36 \pm 0,15 ef
- S	2,27 \pm 0,19 f

TE= Testigo experimental (solución sin deficiencias nutricionales). SD=desviación estándar. Promedios con la misma letra son iguales estadísticamente según la prueba de DMS (5%).

Con base en los reportes mundiales, la relación RebA/St observada en el presente estudio ($3,39 \pm 0,3$), se considera como alta, ya que generalmente se informan relaciones RebA/St de 0,2 a 0,4 (Erkucuk, 2009); 0,5 (Dacome *et al.* 2005); 0,5 a 0,6 (Midmore y Rank, 2002). Estos últimos autores indican que la relación RebA/St es muy importante ya que el St imparte una característica un poco amarga al sabor de los extractos crudos, lo cual no es sentido cuando el RebA está en igual o mayor cantidad que el St.

Los resultados de la Tabla 4.3 muestran que las deficiencias de Cu, P y S, redujeron significativamente ($p \leq 0.05$) la relación RebA/St, sugiriendo que estas carencias reducirían el contenido de RebA, aumentarían el de St, ó ambos, aunque con base en las respuestas discutidas en acápite anteriores, es probable que la reducción del RebA ante deficiencias de estos elementos sea lo más probable. Adicionalmente, no ha sido demostrado que la deficiencia de un elemento derive en el aumento de cualquiera de los glucósidos presentes en la hoja, máxime si se considera su similitud estructural, pues su diferencia radica solamente en la presencia de una glucosa (Carakostas *et al.* 2008). Por su parte, al parecer ninguna de las deficiencias estudiadas registró cambios positivos en la relación RebA/St respecto al TE, a excepción de la de Mg.

Aunque no existen referencias para comparar los resultados de esta investigación, es probable que las deficiencias nutricionales generen un efecto diferencial indirecto sobre

la síntesis de RebA o St, ya que la presencia o ausencia de los elementos está ligada a constituirse como cofactores enzimáticos de varias glucosil-transferasas, cuya actividad deriva en la elaboración de las moléculas de los diferentes glucósidos de esteviol por glucosilaciones diferenciales (Richman *et al.* 2005); estas glucosilaciones derivan en propiedades organolépticas distintas; por ejemplo, se reporta que St es 143 veces más dulce que la sacarosa con base en el peso y que el RebA es 242 veces (Brandle y Telmer, 2007).

No sorprende el consistente efecto mostrado por el P, dado su papel definitivo como constituyente de la mayoría de moléculas que intervienen en la síntesis del kaureno, estructura molecular precursora de los glucósidos por la ruta del metil-eritritol fosfato, a partir del ácido pirúvico y del glicer-aldehído 3 fosfato (Azcón-Bieto y Talón, 2008; Álvarez-García *et al.* 2005).

4.5.2 Distribución de nutrientes en función del órgano y la edad

En este acápite se muestra la tendencia de la distribución de los elementos mayores en función del genotipo y la edad fisiológica de hojas, tallos y raíces (Figura 4.2).

Nitrógeno. La dinámica de este elemento fue similar para M1 y M2, aunque las eficiencias en el uso de este elemento difieren de manera importante entre especies y dentro de estas (Fan, *et al.* 2005). En los tres órganos se observó una tendencia decreciente en el tiempo, a excepción de las hojas donde, en promedio para los dos genotipos, a los 30 ddt, se presenta un leve incremento de alrededor del 111%, que posteriormente decrece hasta el inicio de la floración llegando a un 65% del N inicial (Fig. 4.2). Probablemente, esta disminución sea debida a una redistribución hacia las estructuras reproductivas, de próxima aparición, pero que no fueron consideradas en el trabajo, donde sólo se evaluó la distribución de nutrientes hasta el momento de cosecha comercial (inicio de primordios florales). Tendencias similares reportaron De Lima *et al.* (1997a), en un trabajo con estevia en Brasil, aunque estos autores sí condujeron la investigación hasta la presencia de flores, e incluso semillas, órganos que determinaron de manera importante una migración del N desde las hojas.

Fósforo. La Figura 4.2 muestra que, en términos generales, la concentración tisular de P se mantuvo relativamente constante a través del tiempo, siendo la hoja el órgano de mayor concentración del elemento. Al final del ciclo, los niveles foliares de P fueron de 3,9 y 3,1 g kg⁻¹ de masa seca para M1 y M2 respectivamente. M1 registró valores más altos de P en hoja y tallo en tanto que en la raíz fueron más bajos respecto a M2. De Lima *et al.* (1977a), reportaron concentraciones de P en el tallo de 2,5 g kg⁻¹ a los 45 ddt, valores que son similares a los encontrados en este estudio en la misma época (2,7 y 2,3 g kg⁻¹ para M1 y M2 respectivamente). De manera similar, el estudio de Brasil encontró concentraciones de P de 1,6 g kg⁻¹ en raíz al final del experimento (90 ddt), coincidiendo con los de M1 (1,3 g kg⁻¹) y M2 (1,9 g kg⁻¹) reportados en este estudio. Siendo las hojas un órgano de mayor tasa de división y expansión celular que el tallo, así como de mayores tasas de fotosíntesis y respiración, es probable que, dados los requerimientos de energía en estas, la concentración del P en estas sea mayor respecto al tallo (Su *et al.* 2006).

Potasio. En ambos genotipos y en todos los órganos del vegetal, la concentración de K decreció con el tiempo, registrándose solamente un leve incremento hacia los 60 ddt,

que luego bajó para el caso de M2 a los 75 ddt (Figura 4.2). Respecto a las concentraciones iniciales por órgano (hoja 17,5; tallo 25,5 y raíz 15,0 g kg⁻¹), y de manera independiente al genotipo, los niveles de K cayeron en un 24% (hoja), 48% (tallo) y 33% (raíz), siendo el tallo el órgano con mayores eflujos de este elemento. La disminución en la concentración de K en la planta a través del tiempo también fue reportada por De Lima *et al.* (1977a). Es probable que esta migración del K, paralelamente a la del N, se de hacia flores y semillas que estarían a punto de aparecer. Consecuentemente, la hoja sería el órgano que menores niveles de migración presentaría dada la alta actividad fotosintética en pre-floración, donde es requerida una alta eficiencia de K en la apertura y cierre estomático para mantener el estado hídrico de la planta y para la activación de muchas enzimas esenciales para la fotosíntesis y la respiración (Taiz y Zeiger, 2006).

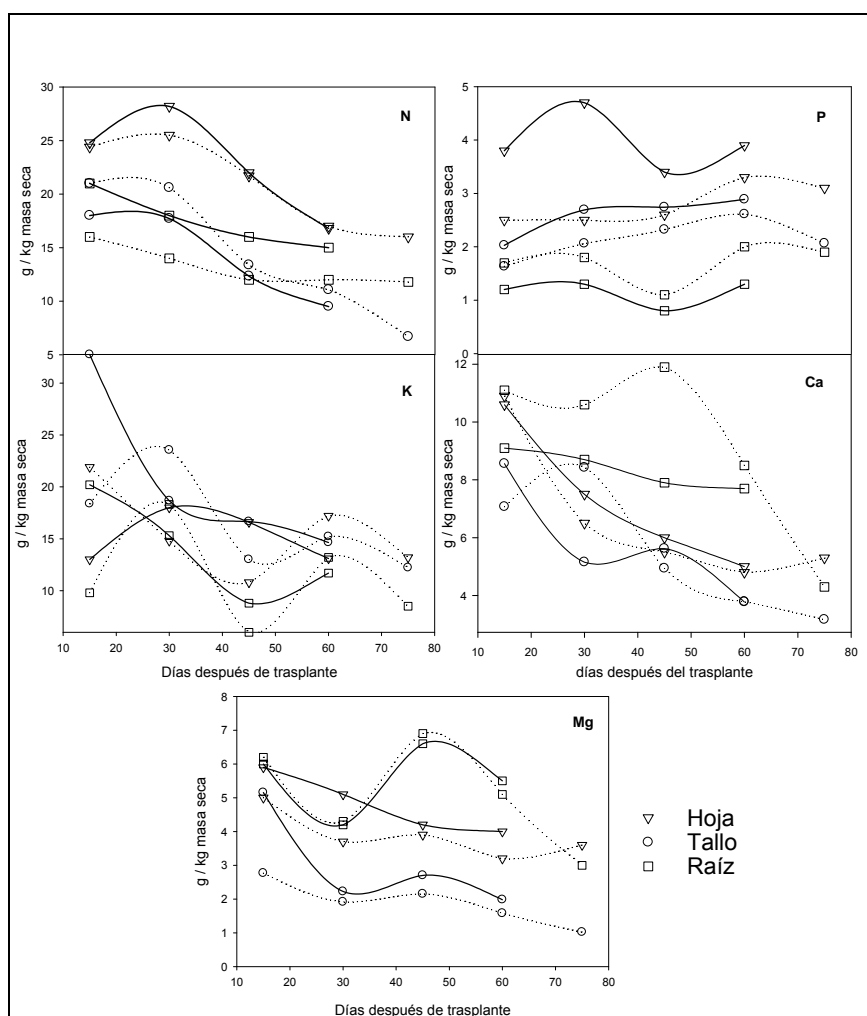


FIGURA 4.2. Concentración de elementos mayores (g/kg de masa seca) en tres órganos de dos genotipos de estevia en función del tiempo. Líneas continuas: Morita 1; Líneas discontinuas: Morita 2. (Montería - Córdoba, 2008).

Calcio. De manera similar a los elementos descritos anteriormente, el contenido de Ca en el tejido vegetal registró una tendencia decreciente en el tiempo para M1 y M2, tal como lo registra la Figura 4.2. Los niveles iniciales fueron de alrededor de 9 g kg⁻¹ en promedio para todos los órganos y de 4 g kg⁻¹ al final del ciclo. Sin embargo, al

momento de cosecha, la concentración en la raíz fue mayor que en el resto de la planta, llegando a representar el 50% del Ca presente a los 60 ddt, seguido de las hojas (30%) y por último del tallo (20%). En 1997, De lima *et al.* también encontraron una alta presencia de Ca en raíces al final del ciclo y una migración importante desde el tallo; los autores argumentaron que esto era debido probablemente a una redistribución hacia órganos reproductivos. De todas maneras, conociendo la dificultad que este elemento tiene para ser cargado en el floema (White y Broadley, 2003), la migración desde el tallo ocurriría a partir del Ca intercambiable en el xilema y en el apoplasto de las células del tallo, dirigiéndose principalmente a las hojas (Marschner, 2002). En la raíz, los altos niveles de concentración de Ca podrían ser explicados por una más eficiente captación de este elemento por raíces más desarrolladas desde la fracción disponible en el suelo.

Magnesio. Al observar la concentración del Mg en los tres órganos de la planta (Figura 4.2), se observa un comportamiento similar para los genotipos y para los órganos, en los que se registra una leve tendencia decreciente (a excepción del final del ciclo en las hojas), siendo la raíz, a los 60 ddt, el órgano donde mayor se concentra este elemento ($5,3 \text{ g kg}^{-1}$) seguido de la hoja ($3,6 \text{ g kg}^{-1}$) y por último del tallo ($1,8 \text{ g kg}^{-1}$). Las concentraciones de Mg en los órganos de estevia encontrados en el presente trabajo, son más altos que los reportados por De Lima *et al.* (1997a), quienes informaron concentraciones de 0,7; 1,4 y $0,6 \text{ g kg}^{-1}$ en raíz, hoja y tallo respectivamente a los 60 ddt. La concentración de Mg en las hojas, que tiende levemente a crecer al final del ciclo en los dos genotipos, podría indicar que este elemento se concentra para desempeñar un papel importante en la síntesis de los glucósidos de esteviol. En efecto, el Mg se combina con el ATP, permitiéndole participar en muchas reacciones, como la fosforilación del ácido mevalónico AMV para formar isopentenil-pirofosfato IPP, primer compuesto isoprenoide en la síntesis de estos glucósidos; seguidamente, en la misma ruta de síntesis, actúa como cofactor de la enzima citoplasmática *farnesil pirofosfato sintasa*, que cataliza la formación del FPP (Srivastava, 2002).

Exportación de nutrientes. La Tabla 4.4 registra la masa seca por planta de las hojas a los 60 ddt para M1 y a los 75 ddt para M2. En la misma Tabla se muestran las concentraciones totales por planta de cada elemento.

TABLA 4.4. Masa seca hojas (g/planta) y concentración de elementos mayores (g/kg de masa seca) de dos genotipos de estevia (Montería - Córdoba, 2008).

Nutriente	Genotipo	Días después del trasplante				
		15	30	45	60	75
Masa seca hojas/planta (g)	M1	0,88	1,67	3,22	6,08	
	M2	0,91	1,93	3,68	7,65	9,06
Concentración de elementos (g/kg masa seca)						
N	M1	63,8	63,9	50,3	41,3	
	M2	61,4	60,1	47,1	40,1	34,5
P	M1	7,0	8,7	6,9	8,1	
	M2	5,8	6,4	6,0	7,9	7,1

Ca	M1	32,3	21,4	19,5	16,5	
	M2	29,1	25,5	22,3	17,1	12,8
K	M1	66,0	52,0	42,1	39,4	
	M2	50,1	56,7	29,8	45,6	33,9
Mg	M1	17,1	11,5	13,5	11,5	
	M2	14,0	9,9	13,0	9,9	7,6

Con base en la concentración de los elementos nutricionales en la planta, la producción de hoja seca/planta de M1 y M2 desde el trasplante hasta la primera cosecha de hojas y considerando una población de 100 mil plantas/ha, se estimaría una extracción de nutrientes en la época de cosecha de cada genotipo así: 24,9 (N); 4,8 (P); 23,7 (K); 9,7 (Ca) y 6,7 (Mg) para M1 y 30,8 (N); 6,3 (P); 29,9 (K); 10,8 (Ca) y 6,3 (Mg) para M2. Obviamente es necesario considerar que en las cosechas sucesivas de la planta estos valores serán más altos.

4.6 Conclusiones

La concentración de los dos principales glucósidos de esteviol Rebaudiósido A (RebA) y esteviósido (St), presentes en las hojas del genotipo de estevia Morita 2, no se afectó por las deficiencias de N, K, Ca, Mg, P, S, Fe, B, Cu o Zn al momento de la cosecha de hojas (75 ddt). Sin embargo, la concentración del RebA, que no varió ante deficiencias nutricionales de N, K, Ca, Mg, Fe, B y Zn, sí se afectó negativamente cuando se indujeron deficiencias de P, S y Cu. La relación RebA/st (3,39), que puede considerarse como alta respecto a la mayoría de reportes mundiales, solo se vio afectada negativamente por deficiencias de Cu, P y S.

En términos generales, la tendencia de la concentración de los elementos mayores considerados en el estudio (N, P, K, Ca y Mg), fue decreciente hasta el momento de la cosecha (inicio de primordios florales), que se presentó a los 60 ddt para Morita1 (M1) y a los 75 ddt para Morita 2 (M2). Considerando una población media de 100 mil plantas/ha, la extracción de estos elementos para el primer corte de hojas, fue respectivamente para M1 y M2 de 24,9 y 30,8 (N); 4,8 y 6,3 (P); 23,7 y 29,9 (K); 9,7 y 10,8 (Ca) y 6,7 y 6,3 (Mg).

4.7 Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a los doctores John Alarcón y Andrés Llanos del Laboratorio de Control de Calidad de la empresa Prodalysa Ltda en Chile y Colombia respectivamente, por su colaboración decidida en el análisis de las muestras de contenido de glucósidos totales.

4.8 Literatura citada

1. Allam, A.I., A.M. Nassar y S.Y. Besheit. 2001. Nitrogen fertilizer requirements of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni under Egyptian conditions. Egypt. J. Agric. Res. 79 (3), 1005-1018.

2. Álvarez-García, R., J. Torres-Valencia, L. Román; J. Hernández, C. Cerda-García-Rojas y P. Joseph-Nathan. 2005. Absolute configuration of the *a*-methylbutyryl residue in longipinene derivatives from *Stevia pilosa*. *Phytochemistry*. 66, 639-642.
3. Azcon-Bieto, J. y M. Talon. 2008. Capítulo 17. Giberelinas. p. 399. En: *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Ed. McGraw-Hill Interamericana de España. Madrid. 651 p.
4. Barathi, N. 2002. *Stevia*-A way to sweeten life. En "The Hindu". Fecha: 19.09.02. Citado: 08-02-08. Growmore Biotech Ltd. Disponible en: <http://www.growmorebiotech.com/article1.htm>
5. Bondarev, N., O. Reshetnyak y A. Nosov. 2003. Effects of nutrient medium composition on development of *Stevia rebaudiana* shoots cultivated in the roller bioreactor and their production of steviol glycosides. *Plant Science*. 165, 845-850
6. Brandle, J. E. y P.G. Telmer. 2007. Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry* 68, 1855-1863.
7. Brandle, J. E. 1999. Genetic control of rebaudioside A and C concentration in leaves of the sweet herb, *Stevia rebaudiana*. *Canadian Journal of Plant Science*. 79(1), 85-92.
8. Brandle, J.E., A. Richman; A. Swanson y B.Chapman. 2002. Leaf ESTs from *Stevia rebaudiana*: a resource for gene discovery in diterpene synthesis. *Plant Mol. Biol.* 50, 613–622.
9. Brandle, Jim. 2005. *Stevia*, Natures Natural Low Calorie Sweetener. En: <http://www.certinedorganicfood.com/stevia-FAQ>. consulta: junio 2009.
10. Carakostas, M.C., L.L. Curry, A.C. Boileau y D.J. Brusick. 2008. Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food and Chemical Toxicology*. 46, S1–S10.
11. Dacome, A., C. da Silva, C. da Costa, J. Fontana, J. Adelman y S. da Costa. 2005. Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods. *Process Biochemistry*. 40, 3587-3594.
12. Das, K., R. Dang, T.N. Shivananda y N. Sekeroglu. 2007. Influence of bio-fertilizers on the biomass yield and nutrient content in *Stevia* (*Stevia rebaudiana*. Bert) grown in Indian subtropics. *Journal of Medicinal Plants Research*. 01(01), 005-008.
13. Das, K., R. Dang y T.N. Shivananda. 2008. Influence of bio-fertilizers on the

availability of nutrients (N, P and K) in soil in relation to growth and yield of *Stevia rebaudiana* grown in South India. International Journal of Applied Research in Natural Products. 1(1), 20-24.

14. De Lima, O., E. Malavolta, J. De Sena y J. Carneiro. 1997a. Absorção e Acumulação de Nutrientes em Estévia *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: I. Macronutrientes. Sci. agric., Piracicaba. 54(1/2), 23-30.
15. De Lima, O., E. Malavolta y H. Yabico. 1997b. Influência de estresses nutricionais no teor e produção de esteviosídeo durante o desenvolvimento da *Stevia*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília. 32(5), 489-494.
16. De Lima, O. y E. Malavolta. 1997. Sintomas de Desordens Nutricionais em Estévia *Stevia Rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Sci. agric., Piracicaba. 54(1/2), 53-61.
17. Epstein, E. y Bloom, A. 2005. Mineral nutrition of plants: principles and perspectivas. Sinauer Associates (EUA). 400p.
18. Erkucuk, A., I.H. Akgun, O. Yesil-Celiktas. 2009. Supercritical CO₂ extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves: Identification and optimization. J. of Supercritical Fluids. 51, 29–35.
19. Fan, X., Q. Shen, H. Zhu, Z. Ma, X. Yin y A. Miller. 2005. A comparison of nitrate transport in four different rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. Science in China (Series C). 48, 897-911.
20. Fronza, D. y M. Folegatti. 2003. Water consumption of the estevia (*Stevia rebaudiana* (bert.) Bertoni) crop estimated through microlysimeter. Scientia Agricola. 60(3), 595-599.
21. Galvan, L. y J. Guzman. 2003. Determinación de los requerimientos nutricionales de *stevia rebaudiana*, Bert. en el Sinú Medio. Tesis. Ingeniero Agrónomo. Universidad de Córdoba. Montería. 106 p.
22. Gardana, C., M. Scaglianti y P. Simonetti. 2010. Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, doi:10.1016/j.chroma.2009.12.036.
23. Geuns, J. M. 2003. Stevioside. Phytochemistry. 64, 913-921.
24. Hearn, L.K. y P.P. Subedi. 2006. Determining levels of steviol glycosides in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy. Journal of Food Composition and Analysis. 22, 165-168.
25. Jarma, A. 2008. Estudios de adaptación y manejo integrado de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.): nueva alternativa agroindustrial del Caribe colombiano. Una revisión. Rev Col Sc. Hort. 2(1),109-120.

26. Liu, J., L. Jin-wei y T. Jian. 2010. Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from *Stevia rebaudiana* Bertoni and identification of extracts, Food Bioprod Process. doi:10.1016/j.fbp.2009.12.005.
27. Marschner, H. 2002. Mineral nutrition of higher plants. Second edition. Academic press. 889 p.
28. Midmore, D. y A. Rank. 2002. A new rural industry - Stevia - to replace imported chemical sweeteners. Rural Industries Research and Development Corporation (RIRDC), Kingston, Australia.
29. Mizukami, H., K. Shiba y H. Ohashi. 1983. Effect of temperature on growth and Stevioside formation of *Stevia rebaudiana*. Shoyakugaku Zasshi. 37, 175-179.
30. Nepovim, A., H. Drahosova, P. Valicek y T. Vanek. 1998. The effect of cultivation conditions on the content of stevioside in *Stevia rebaudiana* Bertoni plants cultivated in the Czech Republic. Pharmaceut Pharmacol Lett. 8, 19-21.
31. Ramesh, K., V. Singh y N. W. Megeji. 2006. Cultivation of stevia [*Stevia rebaudiana* (bert.) Bertoni]: A comprehensive review. En: Advances in Agronomy Vol. 89. 360 p. Academic Press. San Diego, California – USA.
32. Richman, A., A. Swanson, T. Humphrey, R. Chapman, B. McGarvey, R. Pocs y J. Brandle. 2005. Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of *Stevia rebaudiana*. Plant J. 41, 56-67.
33. Srivastava, L. 2002. Gibberellins. En: Plant Growth and Development. Hormones and Environment. Academic Press. 772 p. Weimar, TX. USA.
34. Su, J., Y. Xiao, M. Li, Q. Liu, B. Li y Y. Tong. 2006. Mapping QTLs for phosphorus-deficiency tolerance at wheat seedling stage. En: Plant and Soil. Springer. Netherlands. 281(1-2), 25-36.
35. Taíz, L. y E. Zeiger. 2006. Essensial nutrients, deficiencies and plant disorders. En : Plant Physiology. IV ed. Sinauer Associates, Inc. p. 75-83.
36. Utumi, M., P. Monnerat, P. Gomes, P. Resende y V. Campos. 1999. Deficiência de macronutrientes em estévia: Sintomas visuais e efeitos no crescimento, Composição química e produção de esteviosídeo. Pesq. agropec. Bras. 34(6), 1039-1043.
37. White, P. y M. Broadley. 2003. Calcium in plants. Ann. Bot. 92, 487-511.

5 Temperaturas y radiación en la producción de glucósidos en *Stevia rebaudiana* en el Caribe Húmedo colombiano

Temperatures and radiation in the glycosides production in *Stevia rebaudiana* in the Humid Colombian Caribbean

Alfredo Jarma Orozco⁶, Carlos Cardona Ayala⁶, John Alarcón⁷

5.1. RESUMEN

Temperaturas y luz son dos factores importantes que regulan el crecimiento y la síntesis de muchos metabolitos secundarios en plantas. Estevia, una planta herbácea semi-perenne nativa de Paraguay, ha demostrado su versatilidad de adaptación a diversos ambientes en el mundo (Ramesh *et al.* 2006); se caracteriza por poseer glucósidos de diterpeno que pueden ser hasta 300 veces más dulces que la sacarosa, sintetizados en la misma ruta de las giberelinas, por lo que factores como luz y temperaturas, que afectan la síntesis de la hormona, también tienen un efecto importante sobre la síntesis de los glucósidos. La investigación se realizó en Montería-Córdoba, durante tres épocas de siembra entre 2007 y 2008 (E1, E2 y E3), para determinar el efecto de la radiación fotosintéticamente activa (RFA) y las temperaturas máximas (Tmax) y mínimas (Tmin), sobre la concentración de los principales glucósidos (GT) de los genotipos Morita 1 (M1) y Morita 2 (M2). Se usó un arreglo factorial de 3 (épocas) x 2 (genotipos) con 12 repeticiones bajo un diseño experimental completo al azar. De manera general se observó que las respuestas de los genotipos variaron en función de la época de siembra; los efectos de la RFA y las temperaturas indicaron que existe una correlación positiva ($p \leq 0.05$) entre estos y la síntesis de GT para M1; en M2 la RFA también afectó positivamente la concentración de GT, pero no las temperaturas. Los aumentos en la concentración de GT fueron determinados por aumentos del esteviósido (St) pero no del rebaudiósido (RebA).

Palabras clave: Estevia, rebaudiósido A, esteviósido, RFA, disponibilidad de luz.

5.2. ABSTRACT

Temperature and light are two important factors that regulate growth and synthesis of many secondary metabolites in plants. Stevia, a semi-perennial herbaceous plant native of Paraguay, has demonstrated its versatility to adapt in different environments in the world (Ramesh *et al.* 2006), is characterized by diterpene glycosides that can be up to 300 times sweeter than sucrose, synthesized in the same pathway of gibberellins, so that factors such as light and temperature, which affect hormone synthesis, also have a significant effect on glycoside synthesis. The research was carried in Montería-Córdoba, for three seasons between 2007 and 2008 (E1, E2 and E3) to determine the effect of photosynthetic active radiation (PAR) and maximum (Tmax) and minimum (Tmin) temperatures, on the concentration of the main glycosides (GT) of Morita 1 (M1) and Morita 2 (M2) genotypes. We used a factorial arrangement of 3 (seasons) x 2 (genotypes) with 12 repetitions in a complete randomized experimental design. In general terms, the genotypes responses varied according to planting season, the effects of RFA and the temperatures indicated a positive correlation ($p \leq 0.05$) between them and synthesis of GT to M1. In M2 the RFA also positively affected GT concentration,

⁶ Profesores Investigadores Universidad de Córdoba. Montería. Correo: ajarma@sinu.unicordoba.edu.co

⁷ Laboratorio de Control de Calidad. Prodalysa Ltda. Chile. Correo: jalarcon@prodalysa.cl

but not temperatures. Increases in the GT concentration was determined by increases in stevioside respect to rebaudioside A.

Key words: Stevia, rebaudioside A, stevioside, PAR, light availability.

5.3 Introducción

Estevia, *Stevia rebaudiana* Bert., es una especie originaria de Paraguay donde es conocida por los amerindios guaraníes desde tiempos ancestrales como ka'a he'e (Alonzo-Torres, 2007). En sus hojas posee moléculas denominadas glucósidos de esteviol, con potencial edulcorante de hasta 300 veces más potente que la sacarosa (0,4% en volumen) y cuyo contenido puede variar entre un 4 y 20% dependiendo del genotipo y las condiciones ambientales y de cultivo (Geuns, 2003; Brandle y Telmer, 2007; Gardana *et al.* 2010). Tanto las hojas, como los extractos se han usado por muchos años en Suramérica, Asia, Japón, China y diferentes estados de EEUU. En Brasil, Korea y Japón, el edulcorante refinado es usado oficialmente como edulcorante bajo en calorías (Mizutani y Tanaka, 2002; Kim *et al.* 2002); su uso se ha incrementado dramáticamente en la primera década del siglo, debido a la conciencia que ha despertado el uso de la sacarosa sobre la salud, en aspectos como caries dental, obesidad, diabetes, entre otros (Chatsudthipong y Muanprasat, 2009).

La información científica ha reportado que los mayores glucósidos son esteviósido St (5-10% del peso seco), rebaudiósido A RebA (2-4%), rebaudiósido C (1-2%) y dulcósido A (0,4-0,7), de los cuales, el St (300 veces más potente que la sacarosa) y RebA (250-400 veces), son los que mayormente dominan el mercado de los GT (Chatsudthipong y Muanprasat, 2009; Hearn y Subedi, 2006). Uno de los criterios importantes para determinar la calidad de la hoja, es la concentración relativa de cada uno de ellos a través de la relación RebA/St, que normalmente en el mundo está alrededor de 0,4 (De Oliveira *et al.* 2007), y que define a un producto de alta calidad (mayor potencial edulcorante y menor sabor amargo), en la medida en que esta relación sea igual o mayor de 1 ya que el RebA es más dulce y no tiene sabor amargo (Dacome *et al.* 2005; Carakostas *et al.* 2008).

Estevia se ha cultivado al parecer con éxito bajo una gran variedad de localidades geográficas de todo el mundo (Brandle *et al.* 2000); reportes de diversas condiciones de latitud y longitud donde se ha cultivado se presentan en el documento de Ramesh *et al.* (2006). Aunque se encuentran informes de cultivos en condiciones extremas como en el invierno de San Petersburgo, estevia se adapta mejor a ambientes que están entre los 35 y 45° de latitud a cada lado del Ecuador (Midmore and Rank, 2002). En Suramérica, existen diversos reportes de la producción exitosa de estevia en países con diferencias ambientales como Paraguay, Brasil, Argentina, Colombia, Perú y Ecuador (Jarma, 2008; Landázuri y Tigero, 2009).

En su hábitat natural en el nororiente paraguayo (21-22° S), estevia se encuentra de manera silvestre entre 200 y 700 m.s.n.m., temperatura media anual de 22,5 °C con un mínimo y un máximo de 17°C y 26°C respectivamente y 1600 mm/año de precipitación (Soejarto, 2002). Sin embargo, algunos autores como Hoyle (1992), han informado que cuando se establece como cultivo, los requerimientos climáticos de longitud del día y temperatura, pueden variar significativamente entre regiones.

Según Brandle (2004), la floración en estevia es fotoperíodo-dependiente y es mayor al reducirse la duración del día; sin embargo las respuestas de la floración y del contenido de esteviósidos a la longitud del día, parecen ser variables; algunos genotipos son plantas obligadas de día corto, aunque a su vez, algunas líneas parecen ser insensibles al fotoperíodo. Sumida (1980), indicó que genotipos de floración temprana, producto del efecto de días cortos, tienen un contenido de esteviósido superior, pero menor rendimiento de biomasa. En ese mismo sentido, Brandle y Rosa (1992), reportaron que la alta relación hoja/tallo fue una función del genotipo cuando se sometieron a días largos. Por su parte Ramesh *et al.* (2006), afirmaron que el crecimiento vegetativo, área foliar, peso seco de hojas y rendimiento de glucósidos variaron de acuerdo a la duración del día, y que estos parámetros fueron mayores en días largos al compararlos con días cortos, principalmente la concentración de esteviósidos que aumentó en un 50%. Algunos de los pocos trabajos de investigación realizados en el tema, han reportado que el crecimiento vegetativo de estevia se reduce cuando las temperaturas están por debajo de 20°C y cuando la longitud del día es menor a 12 horas (Metivier y Viana, 1979; Yermakov y Kochetov, 1996). Los mismos autores reportaron que al aumentar la longitud del día a 16 horas y la intensidad de la misma, se incrementan el crecimiento vegetativo y los niveles de esteviósidos.

La temperatura influencia la disponibilidad de nutrientes del suelo, la germinación, el crecimiento de los nuevos brotes, la fotosíntesis, la respiración y muchos otros procesos metabólicos en la planta. Los primeros trabajos en estevia adelantados por Sumida (1980), citados por Sakaguchi y Kan (1982), indican que el rango óptimo de temperaturas de esta planta es de 15-30 °C, y puede soportar temperaturas críticas de 0-2 °C, aunque Miyasaki *et al.* (1978) demostraron que el límite absoluto era -3 °C. El efecto de las temperaturas y la producción de los glucósidos en estevia es una polémica mundial. En 1983, Mizukami *et al.* postularon que la relación entre las temperaturas diurnas y nocturnas era un factor determinante en la producción del esteviósido y determinaron que la variación 25/20 °C (día/noche), indujo las mayores tasas de crecimiento y de producción de esta molécula. Sin embargo, 15 años más tarde, Nepovim *et al.* (1998), en un trabajo adelantado en República Checa donde se determinó el efecto de las condiciones de cultivo sobre el contenido de esteviósidos, reportaron que la temperatura no fue un parámetro determinante para la producción de los glucósidos de esteviól. Recientemente, Parsons (2003), concluyó que la temperatura sí tenía un efecto sobre la producción de estevia, de manera directa o a través de la variación día/noche. Reportes de rangos de temperatura donde estevia expresa su máximo crecimiento son variables; Barathi (2003), reveló que para un crecimiento favorable, las temperaturas máximas diarias no deben exceder 40 °C y en la noche no deben estar por debajo de los 10 °C, en tanto que Richard (2004), señaló que el rango de temperaturas donde estevia mejor crece es de -6 a 44 °C. Midmore y Rank (2002), en un reporte de la posibilidad de la introducción de estevia en Australia, indicaron que el crecimiento vegetativo se reducía cuando las temperaturas estaban por debajo de 20 °C.

En este trabajo se evaluó la hipótesis que la variación de los factores luz y temperaturas en el Caribe Húmedo colombiano, afectan la calidad de la hoja de dos genotipos de estevia. Para ello se planteó como objetivo principal, determinar el efecto de la RFA y de las temperaturas máximas y mínimas registradas en tres épocas de siembra, sobre la cantidad de glucósidos totales (GT), la concentración de RebA y la relación RebA/St en los genotipos de estevia M1 y M2.

5.4 Materiales y métodos

5.4.1. Localización y material experimental

Se condujeron tres experimentos (épocas), semestre A de 2006 (abril 2 - junio 13), semestre A de 2007 (febrero 20 - abril 17) y semestre B de 2007 (noviembre 20 - enero 30), consideradas en la región como épocas de lluvias, seca y transición respectivamente. Los trabajos se adelantaron en la Universidad de Córdoba (Montería-Colombia), ubicada a una altura de 13 m.s.n.m., 8° 52' N y 76° 48' W. La zona de vida se denomina bosque seco tropical (bs-T), según la clasificación de Holdridge (1967), aunque en el país se denomina Caribe Húmedo colombiano; esta zona registra precipitación promedio anual de 1200 mm, temperatura media del aire de 28°C, humedad relativa de 84% y brillo solar anual de 2108,2 horas (Palencia *et al.* 2006). En cada época se usó un diseño completamente al azar con arreglo factorial de 3 (épocas) x 2 (genotipos) y 12 repeticiones; se registraron las condiciones de radiación fotosintéticamente activa (RFA) y temperaturas máximas y mínimas (Tabla 5.1). Estas variables indicaron que, en términos generales, las épocas seca (E2) y de transición (E3) presentan los mayores niveles de RFA, Tmax y Tmin.

5.4.2. Contenido de glucósidos

El contenido de glucósidos totales GT y de RebA, se midió en porcentaje de peso seco de la hoja por el método de cromatografía líquida de alta eficacia, utilizando en la fase móvil una mezcla de Acetonitrilo y agua (80:20), con una columna Kromasil 100-5HN₂ (Método isocrático) y un patrón de un 90% de pureza. Estos análisis fueron realizados por el Laboratorio de Control de Calidad de la empresa Prodalysa Ltda (Chile). Solo se consideró la presencia de RebA en función de los glucósidos totales (GT), por ser el de mayor importancia económica (Liu *et al.* 2010). La diferencia entre GT y RebA se asumió como contenido de St para efectos de establecer la relación RebA/St.

Durante la realización del experimento no se presentaron factores externos que afectaran el desarrollo de los mismos. En cada época se suministró riego suplementario cuando fue necesario para evitar que efectos de estrés por sequía interfirieran en los resultados.

TABLA 5.1. Promedios diarios de radiación fotosintéticamente activa RFA ($\text{MJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$) y temperaturas máximas y mínimas ($^{\circ}\text{C}$) en tres épocas de siembra de estevia en el Caribe Húmedo colombiano. Montería – Córdoba, 2006-2007.

Factor	Época 1 (Sem A 2006)				Época 2 (Sem A 2007)				Época 3 (Sem B 2007)			
	Abr 06	May 06	Jun 06	- X	Feb 07	Mar 07	Abr 07	- X	Nov 07	Dic 07	Ene 08	- X
RFA	16,64	14,25	14,28	15,05	22,36	21,85	20,62	21,61	16,87	18,66	19,32	18,28
Temp. Máx.	31,88	31,65	31,37	31,6	34,68	33,85	32,79	33,7	31,41	32,42	33,88	32,5
Temp. Mín.	23,83	23,47	24,13	23,8	23,84	24,81	24,63	24,4	23,75	23,47	23,85	23,6

Para analizar los resultados, se hizo un ANAVA donde se consideró el efecto de los factores individuales época y genotipo y su interacción, las cuales se descompusieron con tablas de medias de doble entrada, realizando las comparaciones a través del test

protegido de DMS a un nivel del 5% de probabilidad; Posteriormente, se corrieron análisis de correlación por genotipo entre las principales variables dependientes e independientes. Para el ANAVA, el análisis de las interacciones y de las correlaciones, se utilizó el software estadístico *Statistical Analysis System* (SAS) versión 9.1.

5.5 Resultados y discusión

La Tabla 5.2 registra los resultados del ANAVA que evaluó los efectos individuales y la interacción de las variables consideradas en el estudio.

TABLA 5.2. Significancia estadística de los cuadrados medios de glucósidos totales (g/g hoja seca), rebaudiósido A (g/g GT) y relación rebaudiósido A/esteviósido de dos genotipos de estevia sembrados en tres épocas del Caribe Húmedo colombiano. Montería – Córdoba, 2006-2007.

Fuente de Variación	gl	Cuadrado Medio del Error		
		GT (g/g hoja seca)	RebA (% de GT)	Relación RebA/St
Épocas (E)	2	87,92 **	276,93 **	5,97 **
Genotipo (G)	1	34,72 **	401,37 **	6,96 **
E x G	2	21,09 **	85,76 *	3,93 *
Error	66	4,1287	19,7220	0,3029
Total	71			
Media		15,19	74,27	3,02
CV (%)		13,37	5,98	18,19

GT=Glucósidos totales; RebA=Rebaudiósido A; St=Esteviósido; CV = Coeficiente de variación y gl = Grados de Libertad. NS, * y ** = no significativo, significativo ($p \leq 0.05$) y altamente significativo ($p \leq 0.01$) respectivamente.

En todos los casos, se presentó una interacción de la época por el genotipo denotando las respuestas diferenciales que presenta la calidad de la hoja de los materiales genéticos (plasticidad), al variar la oferta de luz y temperaturas. Con base en ello, se descompusieron las interacciones como se mencionó en la metodología y se muestra en la Tabla 5.3.

TABLA 5.3. Análisis de la interacción Época x Genotipo de promedios de variables de calidad de la hoja de dos genotipos de estevia sembrados en tres épocas del Caribe Húmedo colombiano. Montería – Córdoba, 2006-2007.

Genotipos	Variables de calidad de la hoja								
	GT (g/100 g hoja seca)			RebA (g/100 g GT)			RebA/St		
	E1	E2	E3	E1	E2	E3	E1	E2	E3
Morita 1	13,1 b	13,0 b	17,3 a	71,2 b	77,4 a	67,1 c	2,5 b	3,5 a	2,1 b
Morita 2	13,9 b	16,5 a	17,2 a	77,5 a	77,8 a	77,5 a	3,4 a	3,6 a	2,9 b
DMS (5%)	1,65			3,61			0,4		

GT=Glucósidos totales; Reb-A=Rebaudiósido A; St=Esteviósido; Promedios con la misma letra dentro de un mismo genotipo y variable son iguales estadísticamente de acuerdo al test protegido de DMS (5%).

El análisis de las interacciones puede mirarse desde la óptica del genotipo para facilitar la comprensión de las mismas. En M1, los GT se aumentan significativamente en la E3 ($p \leq 0.05$), pero al parecer esa época no fue la más importante en cuanto a la proporción de RebA y la relación RebA/St se refiere; para estas dos últimas variables, la E2 registró los mejores valores sugiriendo que los niveles de RebA de M1 se incrementan significativamente en esta época ($p \leq 0.05$). En M2 por su parte, se registraron los mayores valores de GT indistintamente en E2 y E3 ($p \leq 0.05$), pero a diferencia de M1, los niveles de RebA se mantuvieron relativamente estables entre las épocas de siembra, indicando más estabilidad de este parámetro respecto a M1.

El análisis de correlación de variables ambientales y de calidad de la hoja se presenta en la Tabla 5.4 de manera individual por genotipo.

TABLA 5.4. Coeficientes de correlación de Pearson $N=36$ y $Pr > |r|$ de variables ambientales y de calidad de la hoja de dos genotipos de estevia cultivados en tres ambientes del Caribe Húmedo colombiano. Montería – Córdoba, 2006-2007.

	RFA (MJ m ⁻² d ⁻¹)		Tmax (°C)		Tmin (°C)		Media ± SD	
	M1	M2	M1	M2	M1	M2	M1	M2
GT (g/100 g hs)	0,624 <0,000	0,557 0,000	0,717 <0,000	NS	0,570 0,000	NS	0,14±0,0	0,15±0,0
RebA (g/g GT)	NS	-0,465 0,004	-0,502 0,001	-0,602 0,000	-0,589 0,000	-0,512 0,001	0,71±0,0	0,76±0,0
RebA/St	NS	-0,430 0,008	-0,571 0,000	-0,590 0,000	-0,656 <0,000	-0,517 0,001	2,71±0,8	3,32±0,8
Media ± SD	18,4±2,6		32,8±0,7		23,7±0,4			

GT=Glucósidos totales; hs=hoja seca; RebA=rebaudiósido A; St=esteviósido; RFA=Radiación fotosintéticamente activa; Tmax=Temperatura máxima; Tmin=Temperatura mínima; SD=Desviación estándar. NS=No significativo ($p > 0.05$).

5.5.1. Glucósidos totales.

Los resultados de la Tabla 5.4 indican que los GT de M1 tienden a variar en el mismo sentido de la RFA y las Tmax y Tmin, o sea que un incremento de los GT está asociado también a un incremento en los valores de estas tres variables ambientales; sin embargo en este genotipo, que ha mostrado menor producción de biomasa a altos niveles de RFA respecto a M2 (Jarma *et al.* 2006), aumentos extremos de éste factor podrían causar decrecimientos en los GT al reducirse la biomasa total (Tabla 5.3). Para M2, el coeficiente de correlación positivo indica que los GT y la RFA varían en el mismo sentido, o sea, que valores altos de GT corresponden a valores altos de RFA y viceversa; al parecer los GT y las temperaturas (máximas y mínimas), no están asociadas significativamente, lo que sugiere que este factor ambiental no afectaría de manera determinante la síntesis de los GT de este genotipo, como si lo haría la RFA. Es decir, para las condiciones de la región de estudio, M2 afectaría positivamente la concentración de GT, principalmente como respuesta a mayores niveles de RFA (como lo registran las épocas 2 y 3 de la Tabla 5.3) y no a la temperatura. Es importante indicar que, aunque no se muestran en este trabajo, la concentración de estas moléculas edulcorantes en M2 ha sido consistentemente mayor que en M1, al cultivarse en diversidad de ambientes y condiciones en esta región del país (Jarma, 2008).

El efecto de la luz observado en el presente trabajo ha sido reportado también por Metivier y Viana, 1979, quienes informaron de un aumento en la síntesis de GT al aumentar la oferta de luz. Al considerar que los glucósidos de esteviol son moléculas sintetizadas en la cadena de alargamiento terpénica, y con base en lo reportado por Guenther *et al.* (1994), en el sentido que la luz tiene un efecto directo y positivo sobre la síntesis del isopentenil pirofosfato IPP, una molécula de cinco carbonos que es denominada regularmente como el isopreno activo dada su importancia como precursor en el alargamiento de dicha cadena, es lógico deducir que la luz afecte también positivamente la síntesis de los glucósidos de esteviol ya que esta ruta, que es la misma del ácido giberélico a partir del mevalonato (Guevara-García *et al.* 2005), conduce a la síntesis de las giberelinas y a su vez a la de estos glucósidos. Respecto a la temperatura, aún se desconoce gran parte de cómo la planta traduce estos estímulos en señales particulares; lo cierto es que las altas temperaturas inducen cambios y adaptaciones a través de un regulador transcripcional (bHLH) denominado frecuentemente como factor interactuante del fitocromo 4 (PIF4), el cual está regulado por el genotipo e integra múltiples estímulos ambientales durante el desarrollo de la planta (Koini *et al.* 2009). Probablemente la actividad del PIF4 en estevia, indicaría que este regulador respondería mayormente a los estímulos de temperatura en M1 respecto a M2. Lo anterior podría contribuir a la discusión mundial sobre el efecto indiferente (Nepovim *et al.* 1998) o positivo (Parsons, 2003) de las temperaturas en la concentración de glucósidos, ya que este trabajo sugeriría que esta respuesta puede ser diferencial de acuerdo al genotipo.

Por otra parte es importante considerar que, aunque el rol fisiológico y la acumulación de altas cantidades de glucósidos no han sido aún bien elucidados, en la ruta de síntesis de los glucósidos de diterpeno, la hidroxilación del ácido ent-kaurenoico (*ent*-KA) a esteviol, requiere NADPH y oxígeno molecular (Kim *et al.* 1996), reacción que es catalizada por una flavoproteína *ent*-KA 13-hidroxilasa. Esto es muy importante ya que en las reacciones lumínicas del proceso fotosintético, se provee NAPH y O₂, por lo que se esperaría mayor oferta de los mismos cuando las tasas de fotosíntesis son altas en ambientes de mayor RFA. Adicionalmente, la síntesis del IPP es una consecuencia directa de las tasas de fotosíntesis al proveer el primer producto de este proceso, gliceraldehído 3-fosfato (3GAP), que dará origen al acetil coenzima A (ACoA), el cual por condensación formará el isopreno activo; con base en ello, no sorprende por tanto que exista una alta correlación entre la oferta de RFA y la síntesis de GT tanto en M1 como en M2; caso diferente sería la temperatura que, al aumentar probablemente induciría tasas diferenciales de fotosíntesis/respiración en los dos genotipos, confirmando las diferencias fisiológicas de adaptación (Jarma, 2008), y trayendo igualmente como consecuencia respuestas diferenciales en la concentración de GT para M1 (positiva) y M2 (indiferente).

Las respuestas a los estímulos de luz y temperaturas proporcionan a las plantas la capacidad de reconocer cambios ambientales y traducirlos en diversos aspectos como el crecimiento y síntesis de moléculas entre muchas otras respuestas. Probablemente la compleja integración de estas señales, a través de rutas compartidas y/o de reguladores hormonales transcripcionales (Franklin, 2009), sean hipótesis más contundentes para explicar los resultados diferenciales de M1 y M2 en este trabajo, en vez de una respuesta simple y aislada a uno de cada uno de estos dos factores.

Por lo anterior, los resultados del trabajo denotan la importancia de considerar la oferta de luz cuando se decide sembrar estevia en el Caribe Húmedo colombiano, pero que, además, es necesario también reflexionar acerca del efecto de las temperaturas máximas y mínimas que, al aumentar a niveles prudentes, favorecerían la síntesis de GT en M1 y tendrían a su vez un efecto directo sobre la inducción de la floración en ambos genotipos, que es precisamente la época donde más se concentran los glucósidos en la vacuola (Fukuda *et al.* 2009; Balasubramanian *et al.* 2006; Chatsudthipong, V. y C. Muanprasat. 2009).

5.5.2. Rebaudiósido A y relación rebaudiósido A/esteviósido.

La Tabla 5.4 muestra que, en términos generales, los contenidos de RebA y la relación RebA/St varían en sentido contrario de la RFA y las temperaturas, de tal manera que valores altos de las tres variables ambientales corresponderían a valores bajos de RebA y de RebA/St y viceversa. Lo anterior sugiere que, el aumento de los GT discutidos en el acápite anterior y los decrecimientos de RebA observados en éste, se dan como consecuencia de un aumento significativo ($p \leq 0.05$) de esteviósidos (St) pero no de RebA, cuando se aumentan los niveles de RFA y temperaturas (máximas y mínimas). Situación particular presentaría M1 que aumentaría la concentración de RebA y St en la misma proporción, al incrementarse los niveles de radiación (Tabla 3).

Los principales glucósidos de esteviol se sintetizan en la medida que se dan glucosilaciones sucesivas en la molécula de esteviol (Wang, 2009); su orden de síntesis son esteviol, esteviolmonósido, esteviolbiósido y/o rubusósido, esteviósido, rebaudiósido B y rebaudiósido A, éste último vía esteviósido o rebaudiósido B (Jones *et al.* 2003; Lim *et al.* 2003; Meßner *et al.* 2003). Las enzimas que catalizan estas glucosilaciones se denominan UDP-glucosiltransferasas (UGT), UGT74G1, UGT76G1 y UGT85C2 y los genes involucrados en su síntesis son una pequeña nueva sub-familia. Según Richman *et al.* (2005), la importancia de esto, es que cada una de estas enzimas cataliza una reacción de glucosilación diferente de acuerdo al grupo que reciba la molécula del azúcar activo; así, la transferencia de la glucosa a un grupo hidroxilo es catalizada por UGT85C2 en el paso de esteviol a esteviolmonósido; a un grupo carboxilo es catalizada por UGT74G1 en el paso de esteviolbiósido a esteviósido y a otro azúcar es catalizada por UGT76G1 en el paso de esteviósido a rebaudiósido A.

Las plantas poseen la capacidad de adaptarse a los cambios del ambiente, ajustando su morfología y fisiología a través de la variación genética. Aunque no existen referentes bibliográficos que determinen el efecto de las variables ambientales sobre la síntesis diferencial de St y RebA, los resultados de esta investigación sugerirían que los estímulos recibidos con los niveles más altos de RFA en M2 y de T_{max} y T_{min} en ambos genotipos, probablemente favorecieron entre otros factores, la actividad del gen involucrado en la síntesis de la enzima UGT74G1, sin que esto implicara la inhibición de las otras enzimas, favoreciendo entonces la síntesis en mayor proporción de esteviósidos respecto a rebaudiósido A. Consecuentemente con lo anterior, (Reyes y Martínez, 2001), indicaron que las diferencias en cuanto al tipo de respuesta, demuestran la plasticidad genotípica de los individuos en ambientes heterogéneos y que las bases genéticas de esta plasticidad pueden ser complejas al interactuar diferentes tipos de genes.

5.6 Conclusiones

En términos generales, el aumento en la concentración de GT correlaciona positivamente con la RFA en M1 y M2 y con las temperaturas (máximas y mínimas) en M1. Este aumento se expresa principalmente por un aumento en la concentración de St y no de RebA, aunque para M1, al incrementarse la oferta de RFA, el aumento en la concentración de ambos glucósidos es similar.

Los factores ambientales RFA y temperaturas, correlacionan con la concentración de RebA (negativa) y St (positiva). Esta concentración diferencial sería gobernada principalmente por características del genotipo que, ante estos estímulos ambientales codificarían diferencialmente genes involucrados en síntesis de enzimas que catalizan reacciones específicas de glucosilaciones del esteviol, principalmente UGT74G1 que transfiere UDP-glucosa a un grupo carboxilo para la formación del esteviósido.

5.7 Literatura citada

1. Alonzo-Torres, M. 2007. Uso del Kaa Hee en la horticultura. En: Producción de hortalizas todo el año. Mod. IV. Producción de Kaa Hee. 13 p. Provincia de Formosa. Argentina.
2. Balasubramanian, S., S. Sureshkumar, J. Lempe, y D. Weigel. 2006. Potent induction of *Arabidopsis thaliana* flowering by elevated growth temperature. PLoS Gen. 2, 106.
3. Barathi, N. 2003. Stevia - The calorie free natural sweetener. Natural Product Radiance. 2, 120-122.
4. Brandle, J. E. y N. Rosa. 1992. Heritability for yield, leaf: stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. Can. J. Plant Sci. 72, 1263-1266.
5. Brandle, J. E. y P.G. Telmer. 2007. Steviol glycoside biosynthesis. Phytochemistry 68, 1855-1863.
6. Brandle, J. 2004. FAQ - Stevia, Nature's Natural Low Calorie Sweetener. En: [Agriculture and Agri-Food Canada](http://res2.agr.ca/London/faq/stevia_e.htm). http://res2.agr.ca/London/faq/stevia_e.htm. Consulta: Noviembre 2006.
7. Brandle, J.E., A. N. Starratt y M. Gijzen. 2000. Stevia rebaudiana: its biological, chemical and agricultural properties. En: http://res2.agr.ca/london/pmrc/faq/stevia_rev.html. consulta: Junio 2000.
8. Carakostas, M.C., L.L. Curry, A.C. Boileau y D.J. Brusick. 2008. Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. Food and Chemical Toxicology. 46, S1-S10.
9. Chatsudthipong, V. y C. Muanprasat. 2009. Stevioside and related compounds:

- Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & Therapeutics*. 121, 41-54.
10. Dacome, A., C. da Silva, C. da Costa, J. Fontana, J. Adelman y S. da Costa. 2005. Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Berton: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods. *Process Biochemistry*. 40, 3587-3594.
 11. De Oliveira, B.H., J. F. Packer, M. Chimelli y D. A. de Jesús. 2007. Enzymatic modification of stevioside by cell-free extract of *Gibberella fujikuroi*. *Journal of Biotechnology*. 131, 92–99.
 12. Franklin, K. A. 2009. Light and temperature signal crosstalk in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*. 12,63-68.
 13. Fukuda, M., S. Matsuo, K. Kikuchi, W. Mitsuhashi, T. Toyomasu e I. Honda. 2009. The endogenous level of GA1 is upregulated by high temperature during stem elongation in lettuce through *LsGA3ox1* expression. *Journal of Plant Physiology*. 166, 2077-2084.
 14. Gardana, C., M. Scaglianti y P. Simonetti. 2010. Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, doi:10.1016/j.chroma.2009.12.036.
 15. Geuns, J. M. 2003. Stevioside. *Phytochemistry*. 64, 913-921.
 16. Guenther, A., P. Zimmerman y M. Wildermuth. 1994. Natural Volatile Organic Compound Emission Rate Estimates for U.S. Woodland Landscapes. *Atmospheric Environment*. 28(6), 1197-1210.
 17. Guevara-García, A., C. San Román, A. Arroyo, M. Cortes, M. de la Luz Gutiérrez-Nava y P. León. 2005. Characterization of the Arabidopsis *clb6* Mutant Illustrates the Importance of Posttranscriptional Regulation of the Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Pathway. *Plant Cell*. 17(2), 628-643.
 18. Hearn, L.K. y P.P. Subedi. 2006. Determining levels of steviol glycosides in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis*. 22, 165-168.
 19. Holdridge, L. R. 1967. *Life Zone Ecology*. Tropical Science Center. San José, Costa Rica. Traducción del inglés por Humberto Jiménez Saa: *Ecología Basada en Zonas de Vida*, 1ª. ed. IICA, 1982. San José, Costa Rica.
 20. Hoyle, F.C. 1992. *A review of four potential new crops for Australian agriculture*. p. 34. Department of Agriculture: Perth. Aus.
 21. Jarma, A., T. Rengifo y H. Aramendiz. 2006. Aspectos fisiológicos de estevia

- (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en el Caribe Colombiano. II. efecto de la radiación incidente sobre los índices de crecimiento. (2006) *Agronomía Colombiana*. 24(1), 38-47.
22. Jarma, A. 2008. Estudios de adaptación y manejo integrado de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.): nueva alternativa agroindustrial del Caribe colombiano. Una revisión. *Rev Col Sc. Hort.* 2(1),109-120.
 23. Jones, P., B. Messner, J. I. Nakajima, A. R. Schäffner, y K. Saito. 2003. UGT73C6 and UGT78D1, glycosyltransferases involved in flavanol glycoside biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 45, 43910-43918.
 24. Kim, K., Y. Sawa y H. Shibata. 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.
 25. Kim, J., Y. H., Choi y Y. Choi. 2002. Use of stevioside and cultivation of *Stevia rebaudiana* in Korea. En: Kinghorn, A.D. (Ed.), *Stevia, the Genus Stevia. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles*, Vol. 19. Taylor y Francis, Londres y NY, pp. 196-202.
 26. Koini, M. A., L. Alvey, T. Allen, C. A. Tilley, N. P. Harberd, G. C. Whitelam y K. A. Franklin. 2009. High temperature-mediated adaptations in plant architecture require the bHLH transcription factor PIF4. *Current Biology.* 19, 408-413.
 27. Landázuri, P. A. y J. O. Tigrero. 2009. Generalidades. 38 p. P. A. Landázuri & J. O. Tigrero (Eds.). En: *Stevia rebaudiana* Bertoni, una planta medicinal. Bol. Téc. Edición Especial. ESPE. Sangolquí, Ecuador.
 28. Lim, E.K., G.S Higgins, Y. Li y D.J. Bowles. 2003. Regioselectivity of glucosylation of caffeic acid by a UDP-glucose:glucosyltransferase is maintained in planta. *Biochem. J.* 373, 987-992.
 29. Liu, J., L. Jin-wei y T. Jian. 2010. Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from *Stevia rebaudiana* Bertoni and identification of extracts, *Food Bioprod Process.* doi:10.1016/j.fbp.2009.12.005.
 30. Metivier, J. y A. M. Viana. 1979. The effect of long and short day length upon the growth of whole plants and the level of soluble proteins, sugars and Stevioside in leaves of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Experimental Botany.* 30(119), 1211-1222.
 31. Meßner, B., O. Thulke y A.R. Schäffner. 2003. Arabidopsis glucosyltransferases with activities toward both endogenous and xenobiotic substrates. *Planta.* 217, 138-146.
 32. Midmore, D. y A. Rank. 2002. A new rural industry - Stevia - to replace imported chemical sweeteners. *Rural Industries Research and Development*

Corporation (RIRDC), Kingston, Australia.

33. Miyazaki, Y., H. Watanabe y T. Watanabe. 1978. The cultivation of *Stevia rebaudiana*. III. Yield and stevioside content of 2 year old plants. Eisei shikensho hokoku. 96, 86-89.
34. Mizutani, K. y O. Tanaka. 2002. Use of *Stevia rebaudiana* sweeteners in Japan. En: Kinghorn, A.D. (Ed.), *Stevia, the Genus Stevia. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles*, Vol. 19. Taylor y Francis, Londres y NY, pp. 178-195.
35. Mizukami, H., K. Shiba y H. Ohashi. 1983. Effect of temperature on growth and Stevioside formation of *Stevia rebaudiana*. *Shoyakugaku Zasshi*. 37, 175-179.
36. Nepovim, A., H. Drahosova, P. Valicek y T. Vanek. 1998. The effect of cultivation conditions on the content of stevioside in *Stevia rebaudiana* Bertoni plants cultivated in the Czech Republic. *Pharmaceut Pharmacol Lett*. 8, 19-21.
37. Palencia, G., T. Mercado, y E. Combatt. 2006. Estudio Agro-meteorológico del Departamento de Córdoba. 126 p. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba. Gráficas del Caribe. Montería - Córdoba.
38. Parsons, P. (2003). *Stevia-too good to be approved*. *Organic NZ*. 62, 26.
39. Ramesh, K., V. Singh y N. W. Megeji. 2006. Cultivation of stevia [*Stevia rebaudiana* (bert.) Bertoni]: A comprehensive review. En: *Advances in Agronomy* Vol. 89. 360 p. Academic Press. San Diego, California – USA.
40. Reyes, J. M. y D. Martínez. 2001. La plasticidad de las plantas. *Elementos: Ciencia y Cultura*. 8(41), 39-43.
41. Richard, D. 2004. “*Stevia rebaudiana*: Nature’s Sweet Secret,” Blue Heron Press. Bloomingdale, IL USA. pp. 1-80.
42. Richman, A., A. Swanson, T. Humphrey, R. Chapman, B. McGarvey, R. Pocs y J. Brandle. 2005. Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of *Stevia rebaudiana*. *Plant J*. 41, 56-67.
43. Sakaguchi, M. y T. Kan. 1982. As pesquisas japonesas com *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni e o esteviosideo. *Ciencia e Cultura*. Sao Oaulo, (SP) Brasil. 34, 235-248.
44. Soejarto, D. 2002. Botany of *Stevia* and *Stevia rebaudiana*. En: Kinghorn, A.D. (Ed.), *Stevia, the Genus Stevia. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles*, Vol. 19. Taylor y Francis, Londres y NY, pp. 18-39.
45. Sumida, T. 1980. Studies on *Stevia rebaudiana* Bertoni as a new possible crop for sweetening resources in Japan. *Kenkyu hokoku*. Journal of the Central Agricultural Experiment Station, Nogyo Shikenjo. 31, 1-71.

46. Wang, X. 2009. Structure, mechanism and engineering of plant natural product glycosyltransferases. *FEBS Letters*. 583, 3303-3309.
47. Yermakov, Y. I. y A. A. Kochetov. 1996. Specificities of the growth and development of stevia. *Russian Agricultural Sciences*. 1, 9-11.

6 DISCUSION GENERAL

Muchos autores han demostrado que el rendimiento de hoja seca por hectárea y el contenido de los glucósidos en estevia dependen en gran medida del genotipo, del paquete de prácticas de cultivo y del ambiente donde se cultive (Nepovim *et al.* 1998; Geuns, 2003; Das *et al.* 2008). Aunque estevia ha mostrado una gran versatilidad de adaptación en diversas localidades geográficas del mundo (Ramesh *et al.* 2006), antes de iniciar planes masivos de siembra y recomendaciones para su cultivo, es necesario evaluar el comportamiento de la especie en función de variables que intervienen directamente en el crecimiento y síntesis de glucósidos como la temperatura, radiación y la nutrición (Jarra, 2008).

En el trabajo se consideró el efecto de la oferta ambiental de tres épocas de siembra del Caribe Húmedo colombiano sobre la captación y uso de la radiación, la estabilidad fenotípica y la calidad de la hoja (GT y RebA), de los genotipos de estevia conocidos como M1 y M2. Los valores de radiación fotosintéticamente activa (RFA) indican que en las tres épocas de siembra se recibieron en promedio 15,05; 21,61 y 18,28 MJ m² d⁻¹ para las épocas E1, E2 y E3 respectivamente.

En el primer trabajo sólo se consideraron las épocas de alta (E2) y media radiación (E3). Probablemente las diferencias en la oferta de luz, sumadas al efecto de las temperaturas que correlacionaron positivamente con estas, fueron factores determinantes para que se presentaran diferencias en el ciclo del cultivo, el cual fue inversamente proporcional a la cantidad de luz y temperatura recibida. Aunque para estevia como especie subtropical, y otras especies tropicales, estudios que relacionen efectos combinados de radiación y temperaturas son escasos (Rondon, *et al.* 2007), diversos trabajos en especies hortícolas han demostrado correlación lineal positiva entre temperatura y precocidad (Real-Rosas *et al.* 2002; Ortigón *et al.* 2006).

Los mayores valores de IAF observados al establecer 25 plantas/m² (1,46), independientemente de la época o el genotipo, que coinciden con trabajos donde se encontró correlación lineal positiva del IAF con la población (Chaimsohn, 2006; Ruiz y Bertero, 2008), probablemente sean consecuencia de una distribución más equitativa del dosel cuando los espacios entre surcos son más angostos y un mayor número de hojas. Ahora bien, el comportamiento diferencial del genotipo en función de la época indicó que en la época de mayor radiación (E2), M1 redujo el IAF en un 45% respecto a la otra época de siembra (E3), probablemente como consecuencia de tasas de respiración más altas que M2 en estos ambientes. Con base en ello, M1 sería más eficiente en reducir su fotorrespiración y/o aumentar su fotosíntesis a radiaciones menores como las de E3 (menor temperatura interna de la hoja), como lo proponen Taiz y Zeiger (2006), traduciendo esta ventaja en mayor desarrollo de su IAF.

Aunque algunos autores han encontrado decrecimientos del k al aumentar la población en algunos cultivos como cebada (Kemanian *et al.* 2004), brócoli (Francescangeli *et al.* 2006) y maíz (Westgate *et al.* 1997), los resultados en estevia, indicaron que el coeficiente de extinción de la luz aumentó en la medida en que la población de plantas/m² fue mayor, aunque este valor aún se puede considerar como bajo respecto a

otras especies cultivadas ($k = 0.15$). Es sabido que en general, genotipos de una misma especie con valor bajo de k , pueden cultivarse a densidades más altas porque, a pesar del hacinamiento en que crecen estas plantas, las estructuras de sus doseles y disposición de sus hojas logran distribuir mejor la luz incidente.

El valor promedio estimado de UER para estevia en esta investigación ($2,02 \text{ g MJ}^{-1}$), puede considerarse como normal dentro del rango típico de cultivos C_3 (Vieira *et al.* 2009); por debajo de cultivos como trigo ($2,70 \text{ g MJ}^{-1}$, Abbate *et al.* 1997) y cebada ($2,63 \text{ g MJ}^{-1}$, Bingham *et al.* 2007), similar a maní ($2,0 \text{ g MJ}^{-1}$, Kiniry *et al.* 2005) y pasto raygrass ($2,01 \text{ g MJ}^{-1}$, Akmal y Janssens, 2004) y mayor que guisante ($1,52 \text{ g MJ}^{-1}$, O'Connell *et al.* 2004) y soya ($1,2-2,0 \text{ g MJ}^{-1}$, Egli y Bruening, 2000). Respecto a la época, El UER fue mayor en $0,05 \text{ g MJ}^{-1}$ en E2 respecto a E3, probablemente como una consecuencia de un IAF más alto, principalmente de M2, que traería como consecuencia, mayores y más eficientes tasas fotosintéticas respecto a E2 (Gower *et al.* 1999).

Al aplicar los métodos de Lin y Binns (1988) y Carneiro (1998) sobre las tres épocas de siembra, se pudo determinar que el rendimiento de hoja seca/ha de M2 es más estable que M1 en cualquiera de estos ambientes; igual estabilidad presentaron las poblaciones altas de manera independiente al genotipo ($12,5$ y 25 plantas/m^2). Estos resultados no son divergentes con otros trabajos donde se ha reportado mayor producción de hoja por hectárea con Morita 2 (Jarma *et al.* 2006; Jarma, 2008) y/o con altas poblaciones (Espitia *et al.* 2009). Probablemente esta ventaja genética de Morita 2 sea producto de un comportamiento diferencial en la sensibilidad a cambios en la intercepción de la luz por las hojas y consecuentemente en las tasas de fotosíntesis, tal como lo indica Ramesh *et al.* (2006), quienes concluyeron que el comportamiento de estevia es afectado por la radiación y que definitivamente es una planta amante del sol, probablemente debido a que evolucionó en un ambiente cálido, húmedo y soleado.

La relación de biomasa entre la hoja y el tallo (RHT), se vio afectada individualmente por la época, el genotipo y la población. Los valores más altos de la RHT entre épocas se observaron en la siembra de febrero de 2007 (E2), entre genotipos para M2 y entre poblaciones al establecer $12,5$ y 25 plantas/m^2 . La oferta de RFA y el efecto del genotipo podrían ser determinantes para explicar las ventajas de la siembra en febrero de 2007 (E2), indicando que en esta especie y particularmente para M2, se favorece la distribución de asimilados hacia la hoja en ambientes de mayor radiación, tal como lo reportaron otros autores en estevia (Midmore y Rank, 2002; Jarma *et al.* 2006; Jarma, 2008). El efecto de las altas poblaciones puede sugerir que estas favorecen un balance de biomasa hacia el tejido asimilatorio respecto al tallo, tal como lo indican Bruggink y Heuvelink (1987). Estos autores determinaron que en varias especies, la razón de área foliar RAF, relación entre área foliar y masa seca de la planta, aumenta cuando la oferta de luz decrece (lo que puede suceder a mayores poblaciones), probablemente por un aumento del AF, aunque esto puede variar con la edad del cultivo (Lafarge y Hammer, 2002) y la relación fuente-demanda antes del inicio de la etapa reproductiva (Vieira *et al.* 2009).

La calidad de la hoja (GT) no se afectó por la población, pero sí por el genotipo y la época. De manera consistente con los resultados de RHT, las mayores radiaciones de la E2 y E3 y el genotipo M2 registraron mayor concentración de GT. La luz tiene un

efecto directo y positivo sobre la síntesis del isopentenil pirofosfato IPP (Guenther, *et al.* 1994), una molécula de cinco carbonos que es denominada regularmente como el isopreno activo, dada su importancia en el alargamiento de la cadena terpénica. Esta ruta es la misma del ácido giberélico que, a partir del ácido mevalónico (Guevara-García *et al.* 2005), conduce a la síntesis de las giberelinas y de los glucósidos de esteviol. Por consiguiente, es lógico deducir que los altos niveles de luz observados en la E2 y E3 favorecieron esta ruta y por consiguiente la cantidad y calidad de glucósidos totales.

Por otra parte, al inducir deficiencias nutricionales sobre plantas adultas desde trasplante a inicio de floración, la concentración total de glucósidos (GT) presentes en las hojas (8,6%), que pueden considerarse como bajo respecto a otros reportes (Hearn y Subedi, 2006), no se vio afectada significativamente, aunque las concentraciones del RebA sí variaron negativamente ante deficiencias de P, S y Cu. A pesar que la nutrición juega un papel definitivo en la síntesis de estas moléculas edulcorantes (Jarma, 2008; Das *et al.* 2008; Epstein y Bloom, 2005), es posible que factores no considerados en el estudio como la luz (Ramesh *et al.* 2006; Allam *et al.* 2001), la temperatura (Mizukami *et al.* 1983), el agua (Fronza y Folegatti, 2003), técnicas de manejo (Geuns, 2003) y la edad de las plantas (De Lima y Malavolta, 1997), entre otros, probablemente jugaron un papel más determinante que las respuestas observadas en este trabajo por efecto de las deficiencias. Aunque no existen referencias para comparar los resultados de esta investigación, es probable que las deficiencias nutricionales generen un efecto diferencial indirecto sobre la síntesis de RebA o St, ya que su presencia o ausencia está ligada a constituirse como cofactores enzimáticos de varias glucosil-transferasas, cuya actividad deriva en la elaboración de los diferentes glucósidos de esteviol por glucosilaciones diferenciales (Richman *et al.* 2005).

Por último, al evaluar el efecto de las variables luz (RFA) y temperaturas (máximas y mínimas) sobre la concentración de GT en las hojas, los resultados indican que en términos generales, la concentración de GT correlaciona positivamente con la RFA en los dos genotipos (M1 y M2) y con las temperaturas (máximas y mínimas) en M1. Los aumentos en la concentración de GT se expresan principalmente por incrementos en la concentración de St pero no de RebA, aunque para M1, este incremento es similar para los dos glucósidos. Esto podría estar explicado por el efecto diferencial de genes de cada genotipo, involucrados en síntesis de enzimas que catalizan reacciones específicas de glucosilaciones del esteviol, principalmente, una mayor actividad de UGT74G1 (uridin-difosfato-glucosil-transferasa) que transfiere UDP-glucosa a un grupo carboxilo para la formación del esteviósido.

7. CONCLUSIONES GENERALES

Stevia rebaudiana (Bertoni) es una planta herbácea perenne perteneciente a la familia de las Asteráceas, originaria de los Montes Guaraníes en la frontera entre Paraguay y Brasil, donde sus hojas han sido usadas durante siglos por los indígenas de la zona como edulcorante natural. Se conocen alrededor de 150 especies de estevia, entre las que solamente *S. rebaudiana* Bert., posee significativas propiedades endulzantes. Recientemente ha sido considerada como una planta muy importante a nivel mundial debido a que sus hojas son usadas como un potente endulzante no calórico en Japón, Corea, China, Suramérica y otros países (Jaitak *et al.* 2008). El consumo de extractos de estevia en Japón y Corea es de alrededor de 200 y 115 ton/año respectivamente (Kinghorn *et al.* 2000). Diversos trabajos han demostrado el efecto benéfico de estevia en la salud, incluyendo efectos hipoglucémicos, hipotensivos y antioxidantes (Das *et al.* 2008). Los glucósidos de esteviol que contienen sus hojas son diterpenos sintetizados, en los estados iniciales, en la misma ruta de la síntesis de las giberelinas. Generalmente, los más dominantes y presentes en la hoja son, en porcentaje de masa seca de hoja, el esteviósido (6-10%), rebaudiósido A (2-4%) y otros glucósidos menores (1-2%). Sin embargo, a pesar de estarse cultivando en el país hace aproximadamente 15 años, estevia es una especie desconocida en Colombia. Los pocos avances en investigación que ha hecho la Academia y en algunos casos la empresa privada, no han tenido un impacto importante en el sector agrícola dados los escasos esfuerzos por divulgar estas tecnologías. Además, las escasas alternativas de cultivos agrícolas rentables y sostenibles en el Caribe colombiano, entre otros factores, han ocasionado una pérdida de más de cien mil empleos rurales en la última década incidiendo en los niveles de pobreza rural que son de los más bajos en el país.

La interceptación de luz es definitiva en una modelación acertada de la productividad de los cultivos. Stewart *et al.* (2003), afirmaron que con sólo los factores como forma de la planta, densidad de la población y distancia entre surcos, se obtiene una combinación infinita de distribuciones foliares, cada una con la posibilidad de generar una respuesta diferente en fotosíntesis y rendimiento del cultivo. Con base en lo anterior, se planteó el presente trabajo de investigación con el propósito de evaluar el efecto de la época de siembra, del genotipo y de la población de plantas por hectárea, sobre la adaptabilidad, eficiencia fisiológica y la concentración de los principales glucósidos de la hoja de estevia (RebA y St).

Los principales resultados del trabajo permiten concluir de manera general que estevia es una buena alternativa de producción para pequeños cultivadores del Caribe colombiano. De manera particular, otras conclusiones importantes del trabajo son:

- Las diferencias observadas en la RFA entre épocas ($3 \text{ MJ m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ a favor de E1), así como el efecto del genotipo, fueron los factores más determinantes en las respuestas de las variables evaluadas en el presente estudio. El IAF fue afectado de manera diferencial, siendo un 95% mayor para M2 en la E1. Aunque la FLINT siguió la misma tendencia del IAF, los valores observados para esta variable y consecuentemente para el k , pueden considerarse como bajos al compararlos con otras especies de crecimiento similar.

- El UER fue significativamente más alto en E1, diferencia que estaría explicada por el mayor desarrollo del tejido asimilatorio de M2 respecto a M1. Este comportamiento indica una mayor eficiencia de M2 en el aprovechamiento de la RFA en E1, el cual estaría demostrado por una mejor distribución de biomasa hacia las hojas, cuyos valores por planta pueden estar entre 11,1 y 11,9 g (60 % de la biomasa total del dosel de la planta), al establecer entre 6,25 y 12,5 plantas/m² respectivamente.
- Los análisis de estabilidad permitieron identificar a Morita 2, establecido a 25 plantas/m² como un argumento tecnológico estable para el uso de los productores en un rango de condiciones ambientales diferentes. Así mismo, se pudo determinar que la relación hoja/tallo fue mayor para Morita, principalmente en ambientes con mayor oferta de RFA y cultivado en altas poblaciones. La calidad de la hoja, medida como el contenido total de glucósidos, indicó que esta variable es afectada positivamente por la oferta de RFA y que Morita 2 es consistentemente el genotipo con mayor contenido de glucósidos totales respecto a Morita 1.
- La concentración de los dos principales glucósidos de esteviol Rebaudiósido A (Reb-A) y esteviósido (St), presentes en las hojas de Morita 2, no se afectó por las deficiencias de N, K, Ca, Mg, P, S, Fe, B, Cu o Zn al momento de la cosecha de hojas (75 ddt). Sin embargo, la concentración del Reb-A, que no varió ante deficiencias nutricionales de N, K, Ca, Mg, Fe, B y Zn, sí se afectó negativamente cuando se indujeron deficiencias de P, S y Cu. La relación Reb-A/st (3,39), que puede considerarse como alta respecto a la mayoría de reportes mundiales, solo se vio afectada negativamente por deficiencias de Cu, P y S.
- En términos generales, la tendencia de la concentración de los elementos mayores considerados en el estudio (N, P, K, Ca y Mg), fue decreciente hasta el momento de la cosecha (inicio de primordios florales), que se presentó a los 60 ddt para Morita1 (M1) y a los 75 ddt para Morita 2 (M2). Considerando una población media de 100 mil plantas/ha, la extracción de estos elementos para el primer corte de hojas fue respectivamente para M1 y M2 de 24,9 y 30,8 (N); 4,8 y 6,3 (P); 23,7 y 29,9 (K); 9,7 y 10,8 (Ca) y 6,7 y 6,3 (Mg). Estos requerimientos serán más altos al considerar los cortes sucesivos de hojas.
- La calidad de la hoja, medida como concentración de GT, se comporta de manera diferencial entre M1 y M2 ante la oferta de RFA y temperaturas. En M1, aumentos en la RFA afectan positivamente la concentración de GT y este aumento se da de manera similar para St y RebA; las temperaturas tienen el mismo efecto sobre los GT pero el aumento de estos está más relacionado con incrementos de St y no de RebA. En M2 también se observa una correlación positiva entre RFA y GT y al parecer las temperaturas no afectan esta concentración; sin embargo, la concentración de RebA se afecta negativamente en este genotipo cuando aumentan los niveles de RFA y temperaturas (máximas y mínimas).

Por último es importante sugerir que, dada la viabilidad técnica del cultivo en las condiciones mencionadas, es necesario desarrollar estudios socio-económicos que permitan identificar los grandes rubros dentro del esquema de costos, para estudiar

mecanismos técnicos de reducción de los mismos, mercados accesibles, etc., de tal forma que, luego de conformado el paquete, se divulguen de manera intensiva los resultados que sin duda, beneficiarán a un sector golpeado y desprotegido del país, los pequeños productores. Por ellos y para ellos, se justifican con creces los esfuerzos económicos y académicos que hace la universidad de Córdoba.

7. Literatura general citada

1. Abbate, P. E, F. H. Andrade, J. P. Culot y P. S. Bindraban, 1997. Grain yield in wheat: effects of radiation during spike growth period. *Field Crops Res.* 54, 245-257.
2. Allam, A.I., A.M. Nassar y S.Y. Besheit. 2001. Nitrogen fertilizer requirements of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni under Egyptian conditions. *Egypt. J. Agric. Res.* 79 (3), 1005-1018.
3. Akmal, A. y M. J. Janssens. 2004. Productivity and light use efficiency of perennial ryegrass with contrasting water and nitrogen supplies. *Field Crops Res.* 88, 143-155.
4. Bingham, I., J. Blake, M. J. Foulkes y J. Spink. 2007. Is barley yield in the UK sink limited? I. Post-anthesis radiation interception, radiation-use efficiency and source-sink balance. *Field Crops Res.* 101, 198-211.
5. Bruggink, G.T. y E. Heuvelink. 1987. Influence of light on the growth of young tomato, cucumber and sweet pepper plants in the greenhouse: effects on relative growth rate, net assimilation rate and leaf area ratio. *Sci. Hortic.* 31, 161-174.
6. Carneiro, P. 1998. Novas metodologias de análise da adaptabilidade e estabilidade de comportamento. Tese (Doutorado). 168p. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG Brasil.
7. Chaimsohn, F. 2006. Producción y calidad del palmito al natural, en función de la población, del arreglo de plantas y del tipo de fertilización. Tesis doctoral. Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica.
8. Das, K., R. Dang y T.N. Shivananda. 2008. Influence of bio-fertilizers on the availability of nutrients (N, P and K) in soil in relation to growth and yield of *Stevia rebaudiana* grown in South India. *International Journal of Applied Research in Natural Products.* 1(1), 20-24.
9. De Lima, O. y E. Malavolta. 1997. Sintomas de Desordens Nutricionais em Estévia *Stevia Rebaudiana* (Bert.) Bertoni. *Sci. agric., Piracicaba.* 54(1/2), 53-61.
10. Egli, D. y W. Bruening. 2000. Potential of early-maturing soybean cultivars in late plantings. *Agron. J.* 92, 532-537.
11. Epstein, E. y A. Bloom. 2005. Mineral nutrition of plants: principles and

- perspectivas. Sinauer Associates (EUA). 400p.
12. Espitia, M., R. Montoya y A. Jarma. 2008. Stevia en el Caribe colombiano. Universidad de Córdoba, Montería, Colombia.
 13. Francescangeli, N., M. Sangiacomo, y H. Martí. 2006. Effects of plant density in broccoli on yield and radiation use efficiency. *Scientia Hort.* 110, 135-143.
 14. Fronza, D. y M. Folegatti. 2003. Water consumption of the estevia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni) crop estimated through microlysimeter. *Scientia Agricola.* 60(3), 595-599.
 15. Geuns J.M.C. 2003. Molecules of interest stevioside. *Phytochemistry.* 6, 913 - 921.
 16. Gower, S., C. Kucharik y J. Norman. 1999. Direct and indirect estimation of leaf area index, f_{APAR} and net primary production of terrestrial ecosystems. *Remote Sensing Environ.* 70, 29-51.
 17. Guenther A., P. Zimmerman y M. Wildermuth. 1994. Natural Volatile Organic Compound Emission Rate Estimates for U.S. Woodland Landscapes. *Atmospheric Environment.* 28(6), 1197-1210.
 18. Guevara-García, A.; C. San Román; A. Arroyo; M. Cortes; M. de la Luz Gutiérrez-Nava y P. León. 2005. Characterization of the Arabidopsis clb6 Mutant Illustrates the Importance of Posttranscriptional Regulation of the Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Pathway. *Plant Cell.* 17(2), 628-643.
 19. Hearn, L.K. y P.P. Subedi. 2006. Determining levels of steviol glycosides in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis.* 22, 165-168.
 20. Jaitak, V., A. Gupta, V. Kaul y P. Ahuja. 2008. Validated high-performance thin-layer chromatography method for steviol glycosides in *Stevia rebaudiana*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 47, 790-794.
 21. Jarma, A., T. Rengifo y H. Aramendiz. 2006. Aspectos fisiológicos de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en el Caribe colombiano. II. Efecto de la radiación incidente sobre los índices de crecimiento. *Agron. Colomb.* 24(1), 38-47.
 22. Jarma, A. 2008. Estudios de adaptación y manejo integrado de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.): nueva alternativa agroindustrial del Caribe colombiano. Una revisión. *Rev Col Sc. Hort.* 2(1), 109-120.
 23. Kemanian, A., C. Stöckle y D. Huggins. 2004. Variability of barley radiation-use efficiency. *Crop Sci.* 44, 1662-1672.
 24. Kinghorn, A.D., C.D. Wu, D.D. Soejarto. 2000. Stevioside. En: O' Brien Nabors (Ed.), *Alternative Sweeteners*, 3a ed., Dekker, New York, pp. 167-183.

25. Kiniry, J., C. Simpson, A. Schubert y J. Reed. 2005. Peanut leaf area index, light interception, radiation use efficiency, and harvest index at three sites in Texas. *Field Crops Res.* 91, 297-306.
26. Lafarge, T.A. y G.L. Hammer. 2002. Predicting plant leaf production: shoot assimilate accumulation and partitioning and leaf area ratio, are stable for a wide range of sorghum population densities. *Field Crops Research.* 77, 137-151.
27. Lin, C. y M. Binns. 1988. A method for analyzing cultivar x location x year experiments: A new stability parameter. *Theoretical Applied Genetics.* 76(3), 425-430.
28. Midmore, D. y A. Rank. 2002. A new rural industry - Stevia - to replace imported chemical sweeteners. p. 55. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation RIRDC. Kingston, AU.
29. Mizukami, H., K. Shiba y H. Ohashi. 1983. Effect of temperature on growth and Stevioside formation of *Stevia rebaudiana*. *Shoyakugaku Zasshi.* 37, 175-179.
30. Nepovim A, H. Drahosova, P. Valicek y T. Vanek. 1998. The effect of cultivation conditions on the content of stevioside in *Stevia rebaudiana* Bertoni plants cultivated in the Czech Republic. *Pharmaceut Pharmacol Lett.* 8,19-21.
31. O'Connell, M., G. O'Leary, D. Whitfield y D. Connor. 2004. Interception of photosynthetically active radiation and radiation-use efficiency of wheat, field pea and mustard in a semi-arid environment. *Field Crops Res.* 85, 111-124.
32. Ortigón, A., F. Díaz, J. González e I. Garza. 2006. La temperatura en la etapa reproductiva del cultivo de canola (*Brassica napus* L.). *Agric. Téc. Méx,* 32(3),259-265.
33. Ramesh, K., V. Singh y N. W. Megeji. 2006. Cultivation of stevia [*Stevia rebaudiana* (bert.) Bertoni]: A comprehensive review. En: *Advances in Agronomy* Vol. 89. 360 p. Academic Press. San Diego, California – USA.
34. Real-Rosas, M., A. Lucero-Arce, M. Toyota, R. López-Aguilar y B. Murillo-Amador. 2002. Variedades precoces de brécol para la diversificación agrícola en zonas áridas. *INCI,* 27(5), 247-251.
35. Richman, A., A. Swanson, T. Humphrey, R. Chapman, B. McGarvey, R. Pocs y J. Brandle. 2005. Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of *Stevia rebaudiana*. *Plant J.* 41, 56-67.
36. Rondon, J., L. Zaidan, M. Domingos, C. Barbero y R. Figueiredo. 2007. Vegetative responses to temperature and photoperiod in saplings of brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae). *Braz. J. Plant Physiol,* 18(4), 467-474.
37. Ruiz, R. y H. Bertero. 2008. Light interception and radiation use efficiency in

- temperate quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) cultivars. *Europ. J. Agron.* 29, 144-152.
38. Stewart, D.W., C. Costa, L.M. Dwyer, D.L. Smith, R.I. Hamilton, y B.L. Ma. 2003. Canopy structure, light interception, and photosynthesis in maize. *Agronomy Journal.* 95, 1465-1474.
39. Taiz, L. y Zeiger, E. 2006. *Plant physiology.* pp 764. 4^a ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA.
40. Vieira, M., J. De Melo-Abreu, M. Ferreira y A. Monteiro. 2009. Dry matter and area partitioning, radiation interception and radiation-use efficiency in open-field bell pepper. *Scientia Hort.* 121, 404-409.
41. Westgate, M., F. Forcella, D. Reicosky y J. Somsen. 1997. Rapid canopy closure for maize production in the northern US corn belt: radiation-use efficiency and grain yield. *Field Crops Res.* 49, 249-258.