

Artículo original

Producción de biomasa y contenido de esteviolglicósidos de *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Morita II, en condiciones de campo

Marielys González-Colina^{1*} 

Marcos Daquinta-Gradaille¹ 

Danilo Pina-Morgado¹ 

Nayansi Portal-González² 

Osbel Mosqueda-Frómeta¹ 

Lianny Pérez-Gómez² 

Maritza Escalona-Morgado¹ 

Oscar Concepción-Laffitte¹ 

¹Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila “Máximo Gómez Báez”, carretera a Morón km 9, Ciego de Ávila, Cuba. CP 69450

²Universidad de Ciego de Ávila “Máximo Gómez Báez”, carretera a Morón km 9, Ciego de Ávila, Cuba. CP 69450

* Autor para correspondencia: marielys@bioplasmas.cu

RESUMEN

La producción de hoja seca de *Stevia rebaudiana* Bertoni bajo las condiciones climáticas de Cuba requiere identificar las variables agrotécnicas de mayor impacto en el rendimiento. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la distancia de plantación en la producción de biomasa y contenido de esteviolglicósidos. Las plantas se sembraron en campo a tres distancias de plantación: 15x20 cm; 20x20 cm y 25x20 cm. Se evaluaron a los 180 días las variables altura de la planta, número de ramas por planta, masa fresca y seca, tanto de las hojas como de los tallos y el porcentaje de floración. Además, se estimó el rendimiento en masa seca por hectárea y se determinó el contenido de esteviolglicósidos. Los mejores resultados para las variables agronómicas evaluadas se obtuvieron con la mayor distancia de plantación (25x20 cm), excepto para la altura de la planta y el porcentaje de floración. Sin embargo, estas dos variables no influyeron en el comportamiento del rendimiento foliar (1,48 t ha⁻¹) ni en el contenido de esteviolglicósidos (450,89 mg g⁻¹ de masa seca) en las plantas de este tratamiento, indicando una relación directa de estas últimas variables con la distancia de plantación de *Stevia rebaudiana* var. Morita II cultivada en estas condiciones.

Palabras clave: rendimiento, distancia de plantación, hierba dulce

Recibido: 01/05/2020

Aceptado: 30/06/2021

INTRODUCCIÓN

Stevia rebaudiana Bertoni es una planta herbácea de la familia Asteraceae muy producida en el mundo y su principal componente son los esteviolglicósidos (esteviósido y rebaudiósido). El edulcorante obtenido de esta planta, posee elevado poder edulcorante natural no calórico y es aproximadamente 300 veces más dulce que la sacarosa ⁽¹⁻³⁾. Su importancia es especialmente relevante en las condiciones actuales, donde se demandan alimentos más saludables para contrarrestar desórdenes nutricionales como la *Diabetes mellitus* tipo II ⁽⁴⁾.

La presencia en las hojas de esta planta de compuestos naturales, denominados esteviolglicósidos, son los que aportan las propiedades edulcorantes. Los esteviolglicósidos son diterpenos tetracíclicos derivados del mismo precursor kaurenoide que el ácido giberélico. Su intensa dulzura y uso como edulcorante los convirtió en un tema de interés científico y comercial, desde que llamó la atención por primera vez a los europeos en 1899 ⁽⁵⁾.

Esta planta es propagada naturalmente por semilla. Sin embargo, el bajo nivel de germinación de éstas y la pérdida de viabilidad son factores limitantes para su utilización a gran escala ⁽⁶⁻⁸⁾.

La micropropagación y propagación por estacas o esquejes constituyen alternativas para contrarrestar estas desventajas. Son ampliamente utilizadas y poseen factibilidad desde el punto de vista económico, de calidad de los propágulos producidos y de satisfacción de la demanda de esta planta ^(9,10). No obstante, es importante establecer la adecuada agrotecnia del cultivo y evaluar los rendimientos de biomasa y la calidad de los propágulos bajo las condiciones de producción ^(11,12).

La distancia de plantación de los cultivos puede ser un factor taxativo en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Para la *Stevia rebaudiana* Bertoni es muy importante ajustar esta variable agrotécnica si se tiene en cuenta que el producto a cosechar en este cultivo es el follaje. Esta planta posee una raíz pivotante, filiforme, que no profundiza; es decir, se distribuye cerca de la superficie ⁽¹¹⁾, en este sentido una mayor distancia de plantación puede ser favorable para las plantas, por el espacio proporcionado, tanto aéreo como en el suelo. Este espaciado facilita la expansión de las ramas laterales y una mejor uniformidad en cuanto a la luz solar recibida por las hojas de las plantas. Por otra parte, también proporciona un mayor espacio para el desarrollo radicular y una mejor absorción de nutrientes por planta. Además, limita el excesivo autosombreo que podría ocasionar decrecimientos en la tasa fotosintética media por unidad de área foliar, con detrimentos en la biomasa total por planta ⁽¹³⁾. Sin embargo, un espaciado muy grande puede disminuir los rendimientos por unidad de superficie ⁽¹⁴⁾.

En Cuba, el cultivo de *S. rebaudiana* es reciente y no se ha generalizado. Solo aparece un trabajo donde se informó el estudio de su comportamiento en campo en la Estación Experimental de Plantas Medicinales de San Antonio de los Baños, provincia Mayabeque⁽¹³⁾. Por tanto, se reconoce que existe poca información sobre el manejo agrotécnico necesario para la producción de biomasa a escala industrial⁽¹⁴⁾. Por lo que se hace necesario realizar estudios relacionados con su cultivo en campo, bajo condiciones propias de cada región donde se desarrollará el cultivo.

Por consiguiente, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la distancia de plantación en la producción de biomasa y contenido de esteviolglicósidos de *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Morita II, en condiciones de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en la UEB Plantas Medicinales de la Empresa Agroindustrial Ceballos, Ciego de Ávila. El cultivo utilizado fue *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Morita II, desarrollada en Japón por Toyosigue Morita. La ventaja de esta variedad es que presenta mayores rendimientos de hoja seca y mejor contenido químico que las otras variedades. Se realizó la investigación en el periodo comprendido desde abril hasta noviembre del 2018.

Material vegetal

Como material vegetal se utilizaron esquejes (brotes con una longitud de aproximadamente 8-10 cm), procedentes de plantas madre de *Stevia rebaudiana* Bertoni propagadas *in vitro*, con 120 días después de la siembra mantenidas en el Área de Adaptación del Centro de Bioplasmas de Ciego de Ávila y libre de plagas (Figura 1). Fueron previamente cultivadas en bolsas de polietileno de 1,2 L de capacidad, que contenían como sustrato una mezcla de suelo Ferralítico Rojo Compactado y cachaza (1:1 v/v)⁽¹⁵⁾.



Figura 1. Esquejes enraizados de *Stevia rebaudiana* Bertoni sembradas en el vivero de la Empresa Agroindustrial Ceballos

Previo a la plantación, los esquejes se pusieron en contacto por la base con polvo enraizador compuesto por Ácido Naftalen Acético (ANA) y Ácido Indol Butírico (AIB) ($2000 \text{ mg kg}^{-1} \text{ c/u}$), de manera individual e inmediatamente se enterraron en el sustrato a una profundidad de 1-2 cm aproximadamente, según Instructivo del Área de Adaptación del Centro de Bioplantas.

Los esquejes enraizados con 20 días de edad se trasladaron y sembraron en condiciones de campo, en mayo de 2018, en la UEB de Plantas Medicinales. El área total sembrada para el experimento fue 0,025 ha (1374 plantas) sobre suelo Ferralítico Rojo Compactado con pH Neutro y de textura arcillosa ⁽¹⁵⁾. La preparación de suelo se realizó por tracción animal. La siembra fue de forma manual. Se dejó un borde de 2 m por cada lado de la parcela. Los tratamientos consistieron en tres distancias de plantación: tratamiento (Tto) 1: 15x20 cm ($333 \text{ 333 plantas ha}^{-1}$), Tto 2: 20x20 cm ($250 \text{ 000 plantas ha}^{-1}$) y Tto 3: 25x20 cm ($200 \text{ 000 plantas ha}^{-1}$). Se utilizó un diseño de bloque completo al azar, con 185 plantas para el tratamiento 1, 153 plantas en el tratamiento 2 y 120 plantas en el tratamiento 3. Cada uno de estos bloques se repitió tres veces. Se seleccionaron al azar e identificaron 40 plantas ($n=40$) para cada tratamiento, para un total de 120 plantas. Se realizaron tres evaluaciones cada 60 días durante un periodo de 180 días.

Las evaluaciones se realizaron en cada poda y se describen a continuación:

- Se midió la altura de la planta para la formación de brotes laterales. Se utilizó una cinta métrica y el resultado se expresó en centímetros (cm).
- Se cuantificó el número de ramas por planta.
- Se observó la presencia o no de flores por planta por tratamiento y se calculó el porcentaje de plantas con flores.
- Las hojas se separaron de las ramas de la planta. Se determinó la masa fresca de las hojas y de los tallos en balanza técnica (SARTORIUS TE 412). Se expresó en gramos por planta (g planta^{-1}).
- El total de las hojas de cada planta y los tallos se secaron en estufa (HS 62A) a 70°C durante 72 h. Se determinó la masa seca en balanza SARTORIUS TE 412 y se expresó en gramos por planta (g planta^{-1}).
- El rendimiento de biomasa por hectárea se estimó a partir de la variable masa seca de las hojas por planta y la cantidad de plantas por hectárea. Se expresó en toneladas por hectáreas (t ha^{-1}).

Extracción y cuantificación de extractos ricos en esteviolglicósidos

Se procedió a la extracción y cuantificación de esteviolglicósidos a partir de las hojas secas de *Stevia rebaudiana* Bertoni recolectadas en cada poda. Las hojas se trituraron en un molino (modelo Mikro-Feinmuhle-Culatti, MFC) con un tamaño de partículas de $0,7 \mu\text{m}$, manteniendo la proporción masa/volumen: 1:10 (m/v). Se obtuvo un extracto acuoso clarificado para cada tratamiento. Para ello, se calentó 10 mL de agua destilada hasta 100°C y se le añadió 1 g de hojas secas. La extracción se realizó durante 3 h en reposo. Luego se centrifugó a $21891 \times g$ durante 20 min (centrífuga modelo Heal Force).

El precipitado se desechó y el sobrenadante se clarificó con carbón activado (2 %) ⁽¹⁶⁾, para eliminar pigmentos que pudieran interferir en la determinación de esteviolglucósidos. Se agitó por 20 min en agitador vortex (IKA GENIUS3) y se centrifugó a 21891xg durante 20 min. Este ensayo se realizó tres veces. Se utilizaron tres réplicas por cada poda.

Posteriormente, se midió la absorbancia a 210 nm de los extractos crudos acuosos clarificados de *Stevia* en espectrofotómetro (Pharmacia LKB, Ultrospec II, HOLANDA) para determinar el contenido de esteviolglucósidos. Se realizaron tres determinaciones por cada réplica. El resultado se expresó en mg de esteviolglucósidos g⁻¹ masa seca.

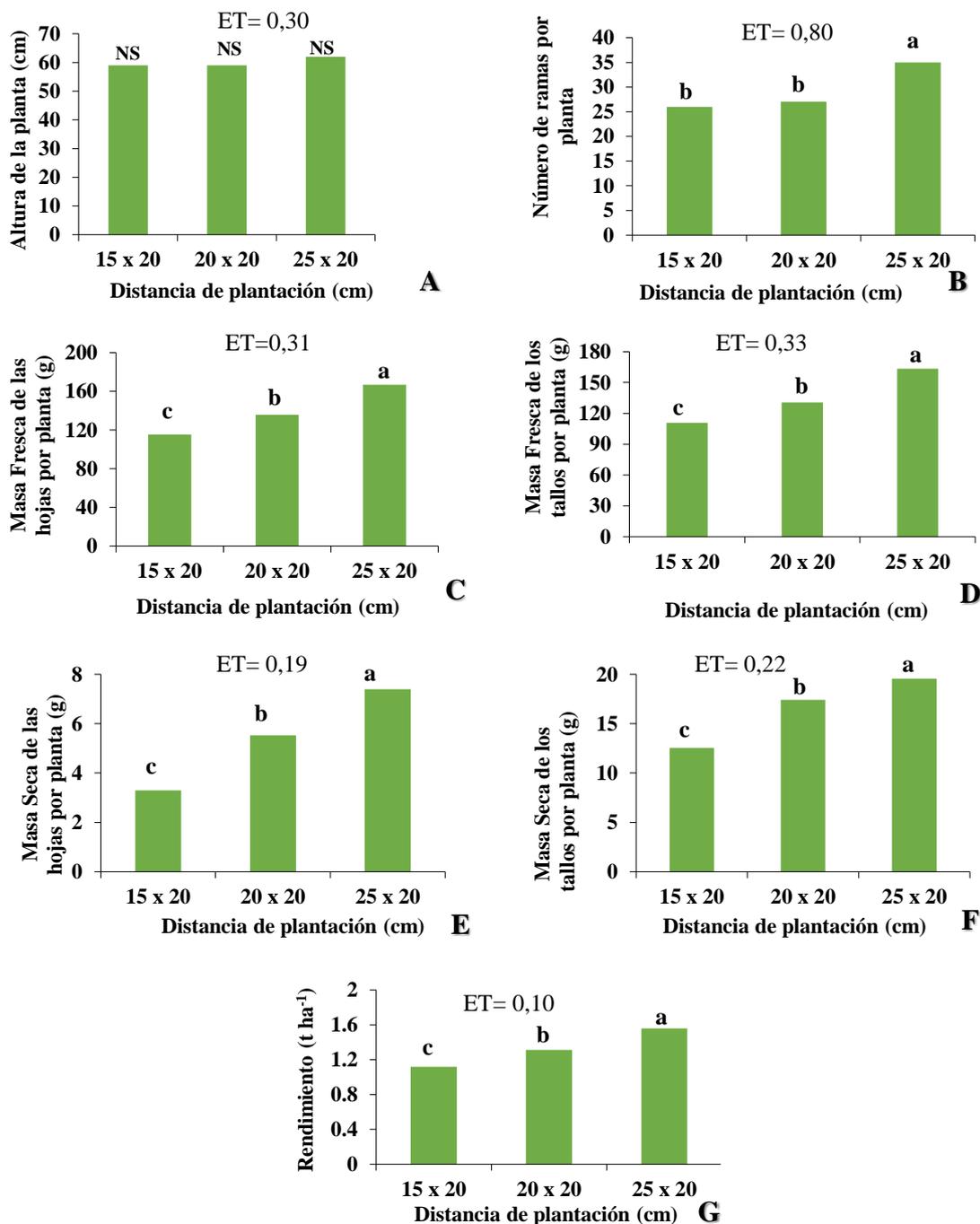
Procesamiento estadístico

En el procesamiento de los datos se emplearon las pruebas estadísticas de Kolmogorov Smirnov y la prueba de Levene para comprobar los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas, respectivamente. Al cumplirse estos supuestos, se aplicó la prueba de análisis de varianza (ANOVA simple) de efectos fijos y al encontrarse diferencias significativas se aplicó la prueba de comparaciones múltiples DHS de Tukey con un nivel de significación estadística de $p \leq 0,05$. En todos los casos se utilizó como procesador estadístico el *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versión 21,0. Para la variable de porcentaje de floración no se realizó prueba estadística.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la distancia de plantación en la producción de biomasa vegetal

La altura de la planta se expone en la Figura 2A. No se observan diferencias significativas en esta variable agronómica en las tres distancias de plantación estudiadas. La altura de las plantas fue de 58, 59 y 62 cm, en las distancias 15x20, 20x20, 25x20 cm, respectivamente. Resultados inferiores de esta variable (45, 20 y 37,5 cm) fueron notificados en condiciones de campo ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾, respectivamente.



A) altura de la planta; B) número de ramas por planta; C) masa fresca de las hojas; D) masa fresca de los tallos; E) masa seca de las hojas; F) masa seca de los tallos; G) rendimiento de biomasa

Barras con letras diferentes indican diferencias significativas según pruebas de ANOVA y Tukey ($P \leq 0,05$; $n = 40$)

Figura 2. Efecto de la distancia de plantación en las variables del crecimiento evaluadas y en la producción de biomasa de plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Morita II, en condiciones de campo

Se considera que la distancia de 25x20 cm pudiera resultar factible. Las plantas tienen mayor espacio para el desarrollo foliar y disminuirá la competencia por nutrientes. Además, se limita el excesivo autosombreo que podría ocasionar decrecimientos en la tasa fotosintética media por unidad de área foliar con detrimentos en la biomasa total por planta ⁽²⁰⁾.

Respecto al número de ramas por planta de *Stevia rebaudiana* Bertoni en condiciones de campo, fue significativamente superior en la distancia de plantación de 25x20 cm (35 ramas por planta) (Figura 2B).

Las distancias de 15x20 y 20x20 cm presentaron valores inferiores que no evidenciaron diferencias significativas entre ellos para este carácter. La mayor distancia de plantación pudo ser favorable para la nutrición de las plantas, así como para el desarrollo de la fotosíntesis.

El efecto de la distancia de plantación sobre la masa fresca de las hojas por planta de *Stevia rebaudiana* Bertoni, en condiciones de campo, se muestra en la Figura 2C. Los mayores valores se alcanzaron con la distancia de plantación de 25x20 cm con 166,8 g por planta, seguido por las otras dos distancias de plantación 20x20 y 15x20 cm. Entre todos los tratamientos existieron diferencias significativas.

La mayor distancia de plantación resultó más favorable, quizás por el espacio proporcionado tanto aéreo como en el suelo, el cual facilita la expansión de las ramas laterales y una mejor uniformidad en cuanto a la luz solar recibida por las hojas de las plantas. Por otra parte, la distancia también proporciona un mayor espacio para el desarrollo radicular y una mejor absorción de nutrientes por planta ⁽²¹⁾.

La masa fresca de los tallos de *Stevia rebaudiana* Bertoni en condiciones de campo (Figura 2D) presentó un comportamiento similar a la masa fresca de las hojas. Existieron diferencias significativas entre todos los tratamientos. Los valores superiores se alcanzaron con la distancia de plantación de 25x20 cm con 163,60 g planta⁻¹, seguidos por las distancias de 20x20 cm (130,51 g planta⁻¹) y 15x20 cm (110,73 g planta⁻¹).

La masa seca de las hojas por planta fue significativamente superior con la distancia de plantación de 25x20 cm (Figura 2E), con valor de 7,4 g planta⁻¹. Entre las distancias de plantación de 20x20 (5,53 g) y de 15x20 cm (3,3 g) también existió diferencias significativas.

Resultados similares de esta variable (4 a 7 g planta⁻¹ de masa seca de las hojas por planta) fueron observados en condiciones de campo ⁽²²⁻²⁴⁾. Sin embargo, otros autores encontraron valores superiores (6,25 a 10,57 g planta⁻¹) en esta variable ⁽²⁴⁾.

La masa seca de los tallos por planta de *Stevia rebaudiana* Bertoni en condiciones de campo con diferentes distancias de plantación se muestra en la Figura 2F. Existe diferencia significativa en esta variable agronómica en las tres distancias de plantación. Con la distancia de 25x20 cm se observaron los mejores resultados, coincidiendo con un estudio previo ⁽²⁵⁾. En forma decreciente, continúan las distancias de 20x20 y 15x20 cm con 17,42 y 12,55 g planta⁻¹, respectivamente. De este modo, en la presente investigación, el aumento de la distancia de plantación favoreció el crecimiento y desarrollo de las plantas; lo que se refleja en la mayoría de las variables agronómicas descritas.

La distancia de plantación influyó positivamente sobre el rendimiento de las plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni (Figura 2G). El rendimiento mayor se obtuvo con la distancia de plantación de 25x20 cm con 1,48 t ha⁻¹, seguido por el observado en la distancia de plantación de 20x20 cm (1,38 t ha⁻¹) y el inferior correspondió a la de 15x20 cm (1,10 t ha⁻¹).

Los resultados de la distancia de plantación sobre el porcentaje de floración de las plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni demostraron que todas las plantas florecieron en el mes de noviembre, sin observarse

diferencias significativas. La floración es independiente de la distancia de plantación, siendo más dependiente del fotoperiodo, de la época del año y de las bajas temperaturas ⁽²⁶⁾.

Efecto de la distancia de plantación en el contenido de esteviolglucósidos

La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos al evaluar el efecto de la distancia de plantación en el contenido de esteviolglucósidos de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizaron las distancias de plantación 25x20 cm y 20x20 cm con 450,89 y 447,34 mg g⁻¹ MS, respectivamente, sin diferencias estadísticas entre sí.

Tabla 1. Efecto de la distancia de plantación en el contenido de esteviolglucósidos en hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni var. Morita II, cultivada en condiciones de campo

Distancia de plantación (cm)	Esteviolglucósidos (mg g ⁻¹ MS)
15x20	365,65 b
20x20	447,34 a
25x20	450,89 a
\bar{x}	421,29
ET	0,35

Medias con letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Tukey DHS para $p \leq 0,05$ y $n = 40$

MS: masa seca de hojas

Estos resultados son superiores a los informados en estudios previos que se realizaron en condiciones de vivero y de laboratorio *in vitro* ^(24,26), respectivamente. Además de las condiciones propias de estudio, las diferencias en cuanto al contenido de sustancias edulcorantes respecto a este trabajo pudieran estar relacionadas con varios factores como el ciclo de crecimiento de la planta ⁽²⁷⁾, la edad de la planta ⁽²⁸⁾, la región donde se cultiva ⁽²⁹⁾ y la densidad de plantación utilizada ⁽³⁰⁾.

Específicamente la distancia de plantación es un factor especial en el crecimiento y desarrollo de las plantas de *Stevia* y su contenido de esteviolglucósidos ⁽³⁰⁾, aunque otros autores refieren en sus resultados un efecto poco significativo ⁽³¹⁾. La raíz de *Stevia rebaudiana* Bertoni, es pivotante, filiforme y no profundiza, es decir se distribuye cerca de la superficie ⁽³²⁾. No se puede descartar la posibilidad de que haya existido competencia entre las plantas de esta especie. Sí se descarta la competencia con plantas indeseables, ya que los surcos se mantuvieron limpios de plantas arvenses durante el tiempo de las evaluaciones. Sin embargo, la distancia de siembra de 25x20 cm puede ser beneficiosa para una mejor obtención de nutrientes por planta. Igualmente, puede favorecer una iluminación eficiente y consecuentemente, el desarrollo de la fotosíntesis y por ende un elevado contenido de esteviolglucósidos.

En las evaluaciones realizadas en el presente estudio, todos los resultados para las variables analizadas fueron superiores en la distancia de plantación de 25x20 cm, con excepción de las variables altura de la planta, porcentaje de floración y contenido de esteviolglucósidos que no mostraron diferencias significativas.

CONCLUSIONES

La distancia de plantación influye en la producción de biomasa y en el rendimiento de *S. rebaudiana* var. Morita II, cultivada en condiciones de campo, así como en el contenido de esteviolglucósidos en hojas; siendo 25x20 cm la recomendada para las condiciones del estudio.

REFERENCIAS

1. Díaz MTL, Robledo EM. De la stevia al E-960: un dulce camino. REDUCA [Internet]. 2014;6(1). Available from: <http://revistareduca.es/index.php/reduca/article/viewFile/1699/1718>
2. Ramirez-Jaramillo G, Lozano-Contreras MG. La producción de *Stevia rebaudiana* Bertoni en México. Agro Productividad [Internet]. 2017;10(8).
3. Lozano-Contreras M, Ramirez-Jaramillo G. Producción de *Stevia rebaudiana* Bertoni, con abonos orgánicos y biofertilizantes Paquete Tecnológico [Internet]. mydokument.com. [cited 07/10/2021]. Available from: <https://mydokument.com/produccion-de-stevia-rebaudiana-bertoni-con-abonos-organicos-y-biofertilizantes-paquete-tecnologico.html>
4. Ritu M, Nandini J. Nutritional composition of *Stevia rebaudiana*, a sweet herb, and its hypoglycaemic and hypolipidaemic effect on patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. Journal of the Science of Food and Agriculture [Internet]. 2016 [cited 07/10/2021];96(12):4231–4. doi:10.1002/jsfa.7627
5. Khalil SA, Zamir R, Ahmad N. Selection of suitable propagation method for consistent plantlets production in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Saudi journal of biological sciences [Internet]. 2014;21(6):566–73. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X14000291>
6. Kilam D, Saifi M, Abdin MZ, Agnihotri A, Varma A. Combined effects of *Piriformospora indica* and *Azotobacter chroococcum* enhance plant growth, antioxidant potential and steviol glycoside content in *Stevia rebaudiana*. Symbiosis [Internet]. 2015;66(3):149–56. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13199-015-0347-x>
7. Shahverdi MA, Omidi H, Tabatabaei SJ. Effect of nutri-priming on germination indices and physiological characteristics of stevia seedling under salinity stress. Journal of Seed Science [Internet]. 2017;39:353–62. Available from: <https://www.scielo.br/j/jss/a/NvmHjWgbjgG88DqLY5cvrNy/?lang=en&format=html>
8. Autade RH, Fargade SR, Borhade PG, Udmale SK, Choudhary RS. *In vitro* Propagation of *Stevia rebaudiana* (Bert.) A natural, non caloric sweetener herb. Journal of Cell and Tissue Research [Internet]. 2014;14(3):4659. Available from: <https://www.researchgate.net/profile/Rakeshkumar-Choudhary->

2/publication/267748507_IN_VITRO_PROPAGATION_OF_STEVIA_REBAUDIANA_BERT_A_NATURAL_NON_CALORIC_SWEETENER_HERB/links/5458f55f0cf2bccc4912b077/IN-VITRO-PROPAGATION-OF-STEVIA-REBAUDIANA-BERT-A-NATURAL-NON-CALORIC-SWEETENER-HERB.pdf

9. Oviedo-Pereira D, Alvarenga S, Evangelista S, Sepúlveda G, Rodríguez-Monroy M. Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un cultivo promisorio para México. BioTecnología [Internet]. 2015;19(2). Available from: https://www.researchgate.net/profile/Mario-Rodriguez-Monroy/publication/302959553_Micropropagacion_de_Stevia_rebaudiana_Bertoni_un_Cultivo_Promisorio_para_Mexico/links/57344afb08aea45ee83927ba/Micropropagacion-de-Stevia-rebaudiana-Bertoni-un-Cultivo-Promisorio-para-Mexico.pdf
10. Pal PK, Prasad R, Pathania V. Effect of decapitation and nutrient applications on shoot branching, yield, and accumulation of secondary metabolites in leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Journal of Plant Physiology [Internet]. 2013;170(17):1526–35. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0176161713002769>
11. Angelini LG, Tavarini S. Crop productivity, steviol glycoside yield, nutrient concentration and uptake of *Stevia rebaudiana* Bert. under Mediterranean field conditions. Communications in soil science and plant analysis [Internet]. 2014;45(19):2577–92. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00103624.2014.919313>
12. Rodríguez González H, Acosta de la Luz LL, Hechevarría Sosa I, Rivera Amita MM, Rodríguez Ferradá CA, Sánchez Govín E, et al. Comportamiento del cultivo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni en Cuba. Revista Cubana de Plantas Medicinales [Internet]. 2007;12(4):0–0. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962007000400004
13. Pal PK, Kumar R, Guleria V, Mahajan M, Prasad R, Pathania V, et al. Crop-ecology and nutritional variability influence growth and secondary metabolites of *Stevia rebaudiana* Bertoni. BMC Plant Biology [Internet]. 2015;15(1):1–16. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12870-015-0457-x>
14. Montoro P, Molfetta I, Maldini M, Ceccarini L, Piacente S, Pizza C, et al. Determination of six steviol glycosides of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) from different geographical origin by LC–ESI–MS/MS. Food chemistry [Internet]. 2013;141(2):745–53. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814613003440>
15. Agricultura I de SM de la. Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba [Internet]. Agrinfor; 1999 [cited 07/10/2021]. Available from: <http://repositorio.geotech.cu/jspui/handle/1234/2946>
16. Arguello FA. Optimización del blanqueamiento de un extracto acuoso de estevia (*Stevia rebaudiana* B.) con carbón activado y Celite 545®. 2017; Available from: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6204/1/AGI-2017-004.pdf>

17. Daza-Torres MC, Meneses-Carvajal HS, Reyes-Trujillo A, Urrutia-Cobo N. Necesidades hídricas de estevia calculadas con el coeficiente del cultivo. *Agronomía Mesoamericana* [Internet]. 2017;28(2):509–21. Available from: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1659-13212017000200509&script=sci_arttext
18. Serfaty M, Ibdah M, Fischer R, Chaimovitch D, Saranga Y, Dudai N. Dynamics of yield components and stevioside production in *Stevia rebaudiana* grown under different planting times, plant stands and harvest regime. *Industrial crops and products* [Internet]. 2013;50:731–6. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Mwafaq-Ibdah/publication/264081263_Dynamics_of_yield_components_and_stevioside_production_in_Steviarebaudiana_grown_under_different_planting_times_plant_standsand_harvest_regime/links/5a8be778aca272017e63fcb0/Dynamics-of-yield-components-and-stevioside-production-in-Steviarebaudiana-grown-under-different-planting-times-plant-standsand-harvest-regime.pdf
19. Cauch Cauch R, Pérez Gutiérrez A, Lozano Contreras MG, Garruña R, Ruíz Sánchez E. Productividad de *Stevia rebaudiana* Bertoni con diferentes láminas de riego e inoculantes microbianos. *Nova scientia* [Internet]. 2018;10(20):30–46. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-07052018000100030&script=sci_arttext
20. Pájaro Fernández SM, Combatt Caballero E, Valencia Agresoth R, Mercado Lázaro J. Efecto de la nutrición con nitrógeno, fósforo y potasio en el desarrollo de la *Stevia rebaudiana* Bertoni en el departamento de Córdoba. *Temas Agrarios* [Internet]. 2019;24(3). Available from: https://www.researchgate.net/publication/349704844_Efecto_de_la_nutricion_con_Nitrogeno_Fosforo_y_Potasio_en_el_desarrollo_de_la_Stevia_rebaudiana_Bertoni_en_el_departamento_de_Cordoba
21. García E, Villafañe R, Basso C, Florentino A. Dinámica de la humedad del suelo y su efecto sobre el rendimiento de la stevia. *Venesuelos* [Internet]. 2017 [cited 2021 Oct 7];23(0):5–10. Available from: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_venes/article/view/12263
22. Aguirre-Medina JF, Mina-Briones FO, Cadena-Iñiguez J, Soto-Hernández RM, Aguirre-Medina JF, Mina-Briones FO, et al. Effectiveness of biofertilizers and brassinosteroids in *Stevia rebaudiana* Bert. *Agrociencia* [Internet]. 2018 [cited 07/10/2021];52(4):609–21. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1405-31952018000400609&lng=en&nrm=iso&tlng=en
23. Daza MC, Díaz J, Aguirre E, Urrutia N. Efecto de abonos de liberación lenta en la lixiviación de nitratos y nutrición nitrogenada en estevia. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* [Internet]. 2015;9(1):112–23. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2011-21732015000100010

24. Duarte JAV, Espínola HNR, Agüero MAF, Britez GDV, Duarte NDL, Serafini JDA. Efecto de diferentes dosis de estiércol bovino en el cultivo orgánico de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni bajo sistema de riego por goteo. Investigación Agraria [Internet]. 2017;18(2):101–10. Available from: <http://www.agr.una.py/revista/index.php/ria/article/view/376>
25. Bayraktar M, Naziri E, Akgun IH, Karabey F, Ilhan E, Akyol B, et al. Elicitor induced stevioside production, in vitro shoot growth, and biomass accumulation in micropropagated *Stevia rebaudiana*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) [Internet]. 2016;127(2):289–300. Available from: <file:///C:/Users/Casa/AppData/Local/Temp/Elicitorinducedsteviosideproduction.pdf>
26. Reis M, Coelho L, Santos G, Kienle U, Beltrão J. Yield response of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) to the salinity of irrigation water. Agricultural Water Management [Internet]. 2015;152:217–21. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378377415000268>
27. Guerrero AB, San Emeterio L, Domeño I, Irigoyen I, Muro J. Steviol glycoside content dynamics during the growth cycle of *Stevia rebaudiana* Bert. American Journal of Plant Sciences [Internet]. 2018;9(04):892. Available from: https://www.scirp.org/html/28-2603654_83453.htm?pagespeed=noscript
28. Ucar E, Ozyigit Y, Eruygur N, Güven D, Yur S, Turgut K, et al. The Effect of the Plant Age and Growth Period on the Nutritional Substance, Chlorophyll and Steviol Glycoside Rates in *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Leaves. Communications in Soil Science and Plant Analysis [Internet]. 2018;49(3):291–302. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00103624.2018.1424894>
29. Pacifico S, Piccolella S, Nocera P, Tranquillo E, Dal Poggetto F, Catauro M. Steviol glycosides content in cultivated *Stevia rebaudiana* Bertoni: A new sweet expectation from the Campania region (Italy). Journal of Food Composition and Analysis [Internet]. 2017;63:111–20. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0889157517302077>
30. Gomes EN, Moterle D, Biasi LA, Koehler HS, Kanis LA, Deschamps C. Plant densities and harvesting times on productive and physiological aspects of *Stevia rebaudiana* Bertoni grown in southern Brazil. Anais da Academia Brasileira de Ciências [Internet]. 2018;90:3249–64. Available from: <https://www.scielo.br/j/aabc/a/ZrcNZJLqH77tDxBfNXgSs9B/?lang=en>
31. Benhmimou A, Ibriz M, Al Faïz C, Gaboun F, Douaik A, Amchra FZ, et al. Effects of planting density and harvesting time on productivity of natural sweetener plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni.) in Larache region, Morocco. International Journal of Plant Research [Internet]. 2017;7(4):83–9. Available from: <http://ofsq.everstevia.com/Dinsity-Harvesting-Time-Morocco.pdf>
32. Ruiz-Ruiz JC, Moguel-Ordoñez YB, Segura-Campos MR. Biological activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni and their relationship to health. Critical reviews in food science and nutrition [Internet]. 2017;57(12):2680–90. Available from: [https://pdfs.nutramedix.ec/Stevia%20-%20hypertension%20\(health\).pdf](https://pdfs.nutramedix.ec/Stevia%20-%20hypertension%20(health).pdf)