SEP
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

Tecnológico Nacional de México

# INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CONKAL

# RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y METABÓLICAS DE *Stevia rebaudiana* Bertoni EN CONDICIONES DE DÉFICIT HÍDRICO

**TESIS**

**Que presenta:**

*Alain Rodrigo Reyes Guerrero*

**Como requisito parcial para obtener el grado de:**

**Maestro en Ciencias en Horticultura Tropical**

**Director de tesis:**

*Dr. René Garruña Hernández*

**Conkal, Yucatán, México**
**enero, 2018**

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo económico para la realización de mis estudios de Maestría.

Al Instituto Tecnológico de Conkal por permitir me seguir avanzando en mi desarrollo profesional, en especial a la División de Estudios de Posgrado e Investigación por apoyarme durante mi estancia en la Maestría y apoyarme hasta en el ultimo momento con su paciencia y consejos.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán por haber permitido mi estancia y desarrollado parte de mi proyecto en sus instalaciones, por la calidez de sus colaboradores y la excelente atención que me brindaron.

Al Dr. René Garruña Hernández por sus aportaciones puntuales al presente trabajo, su paciencia, su dedicación, su disponibilidad, por la motivación y sobre todo por estar en el momento oportuno para guiarme y darme la oportunidad de aprender bajo su tutela.

A mi comité de tesis conformado por el Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota y al M.C. Alfonzo Pérez Gutiérrez por sus grandes aportaciones, por compartir conmigo su conocimiento, también por la paciencia y dedicación que me brindaron, sin ustedes todo se hubiera complicado más, muchas gracias.

Una mención especial a la M.C. Miriam Monforte González por su apoyo y comprensión durante mi estancia en el CICY, por el conocimiento que me compartió y la paciencia que me tuvo.

A mi familia por su gran apoyo y paciencia, creo que sin ese apoyo y palabras de motivación me hubiera sido imposible continuar con mi proyecto de vida.

A Arianne Roxana Garrido Aguilar por estar conmigo durante todos los momentos tan difíciles, por sus paciencia y apoyo constante a pesar de todos los baches en el camino.

A todos los compañeros del posgrado, por los buenos momentos, por las vivencias y por el apoyo que nos dimos durante nuestros experimentos. Gracias, María Gabriela Dzib Ek, Walther Torres Cab y Steve Romain, por los excelentes momentos y esas tardes que se quedaron a apoyarme en el laboratorio.

SEP

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Conkal

Conkal, Yucatán, México, 26 de enero de 2018.

El comité de tesis del candidato a grado: Alain Rodrigo Reyes Guerrero, constituido por los CC. Dr. René Garruña Hernández, Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota y M.C. Alfonzo Pérez Gutiérrez, habiéndose reunido con el fin de evaluar el contenido teórico-metodológico y de verificar la estructura y formato de la tesis titulada: Respuestas fisiológicas y metabólicas de *Stevia rebaudiana* Bertoni en condiciones de déficit hídrico, que presenta como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Horticultura Tropical, según lo establece el Capítulo 2, inciso 2.13.3, de los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado en el Sistema Nacional de Institutos Tecnológicos, dictaminaron su aprobación para que pueda ser presentada en el examen de grado correspondiente.

**ATENTAMENTE**

*Dr. René Garruña Hernández*
Director de Tesis

*Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota*
Codirector de Tesis

*M.C. Alfonzo Pérez Gutiérrez*
Asesor de Tesis

Conkal Yucatán, 26 de enero del 2018

## DECLARATORIA DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones materiales y métodos, resultados y discusión de este documento, es producto del trabajo de investigación realizado durante mi estudio de posgrado y con base en los términos de la Ley Federal de Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial le pertenece patrimonialmente al Instituto Tecnológico de Conkal. En virtud de lo manifestado reconozco que los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que se deriven de lo correspondiente a dicha información son propiedad de la citada institución educativa.

Alain Rodrigo Reyes Guerrero

**CONTENIDO**

RESUMEN GENERAL……. ix

ABSTRACT……... x

CAPÍTULO I…….. 1

1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL……... 1

1.2 ANTECEDENTES…….. 3

1.2.1 Importancia a nivel mundial……...…… 3

1.2.2 La estevia como cultivar comercial…….…….. 4

1.2.3 Manejo agronómico y contenido de metabolitos secundarios…… 5

1.3 HIPÓTESIS……. 7

1.4 OBJETIVOS…… 8

1.4.1 General……..……..... 8

1.4.2 Específicos……..…… 8

1.5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL……. 9

1.6 LITERATURA CITADA…… 10

CAPÍTULO II PLASTICIDAD FISIOLÓGICA Y CONCENTRACIÓN DE GLUCÓSIDOS DE *Stevia rebaudiana* EN TRATAMIENTOS DE RESTRICCIÓN HÍDRICA …….…….. 14

2.1 RESUMEN……..…… 14

ABSTRACT……... 15

2.2 INTRODUCCIÓN……..…….….. 16

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS……..…….. 18

2.3.1 Ubicación del experimento, material vegetal y manejo agronómico …… 18

2.3.2 Tratamientos de restricción hídrica…….……... 18

2.3.4 Variables a evaluar …….……... 19

2.3.4 Diseño experimental……... 20

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN……..……... 21

2.4.1 Intercambio de gases……...…… 27

2.4.2 Variables morfológicas……...…… 30

2.4.3 Contenido de esteviosidos……..…… 34

2.5 CONCLUSIONES……..……. 36

2.6 LITERATURA CITADA……..…….. 37

III ANEXOS……... 40

3.1 CAPITULO II……..…… 40

## ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1. Potencial hídrico del sustrato en plantas de S. rebaudiana sometidas a tratamientos de restricción hídrica. Los datos son media ± EE. n=6……..……..……..... 21

Figura 2. Máxima eficiencia cuántica del fotosistema II (Fv/Fm) en plantas de S. rebaudiana sometidas a tratamientos de restricción hídrica. Los datos son las medias ± EE. n=9……..……...……. 22

Figura 3. A) coeficiente de extinción fotoquímico (qP) y B) coeficiente de extinción no fotoquímico (NPQ) en plantas de S. rebaudiana sometidas a tratamientos de restricción hídrica. …..……..……...……..… 24

Figura 4. Rendimiento cuántico del fotosistema II (ΦFSII) y tasa de transporte de electrones (TTE) en pretratamiento, durante tratamientos de restricción hídrica (A, B, C, D, E y F) y posterior a riego de recuperación (E y F) en plantas de S. rebaudiana. Los datos son medias ± EE. n=9……..... 26

Figura 5. A) Conductancia estomática (gs); B) Carbono intercelular (Ci); (C) Transpiración (E) y D) Fotosíntesis (AN) en plantas de S. rebauidiana sometidas a tratamientos de restricción hídrica. Los datos representan las medias ± EE. n=9……...…….……..... 28

Figura 6. Uso eficiente del agua (UEA) en plantas de S. rebaudiana sometidas a tratamientos de restricción hídrica. Los datos representan las medias ± EE. n=9……...……...…… 29

Figura 7. Altura de plantas de S. rebaudiana sometidas a tratamientos de restricción hídrica. AT = antes de los tratamientos; 100% = Riego al 100%; 20% = riego al 20%; SR = Sin riego. Los datos son medias ± EE. Diferentes literales representan diferencias estadísticamente significativas (Tukey, α=0.05). n=6…….……..…….……..... 30

Figura 8. (A) Biomasa seca de la raíz, (B) Biomasa seca del tallo y (C) Biomasa seca de la hoja en plantas de S. rebaudiana sometidas a tratamientos de restricción hídrica. AT = antes de los tratamientos; 100% = Riego al 100%; 20% = riego al 20%; SR = Sin riego. Los datos son medias ± EE. Diferentes literales representan diferencias estadísticamente significativas (Tukey, α=0.05). n=6…….……..... 32

Figura 9. Biomasa seca total en plantas de S. rebaudiana sometidas a tratamientos de restricción hídrica. AT = antes de los tratamientos; 100% = Riego al 100%; 20% = riego al 20%; SR = Sin riego. Los datos son medias ± EE. Diferentes literales representan diferencias estadísticamente significativas (Tukey, α=0.05). n=6……..……..... 33

Figura 10. (A) Área foliar y (B) Área foliar específica en plantas de S. rebaudiana sometidas a tratamientos de restricción hídrica. AT = antes de los tratamientos; 100% = Riego al 100%; 20% = riego al 20%; SR = Sin riego. Los datos son medias ± EE. Diferentes literales representan diferencias estadísticamente significativas (Tukey, α=0.05). n=6……..……. 34
Figura 11. Contenido de esteviosidos en las hojas de en plantas de S. rebaudiana sometidas a tratamientos de restricción hídrica. A) Esteviosido y B) Rebaudiosido A. AT = antes de los tratamientos; 100% = Riego al 100%; 20% = riego al 20%; SR = Sin riego. Los datos son medias ± EE……...…… 35

## III ANEXOS

### 3.1 CAPÍTULO II

Anexo 1. Separación de metabolitos en extractos de hoja de estevia sometidos a los diferentes tratamientos de riego. Carriles: 1, estándar de esteviósido; 2, plantas previo al inicio de los tratamientos; 3, 4, 5 tratamientos (Riego al 100%, control, estrés medio y estrés severo) en la primer semana del muestreo (T1); 6, estándar de rebaudiosido A; 7, 8, 9, repeticiones de los tratamientos (Riego al 100%, control, estrés medio y estrés severo) en la segunda semana de los tratamientos; 10, 11, 12, repeticiones de los tratamientos en la tercer semana (T3); 13, estándar de esteveósido; 14, 15, 16, repeticiones de la última semana de los tratamientos, la semana de rehidratación (T4); 17, estándar de rebaudiosido A……. 40

Anexo 2. Placa cromatográfica de la curva de calibración de esteviósidos. Carriles 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 16 y 18 corresponden al esteviósido; carriles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 17, 19 corresponden al rebaudiosido A. Las cantidades cargadas en la placa aumentaron gradualmente en 100 unidades desde 100 (carriles 1 y 2) a 1000 (carriles 18 y 19) ng/µl……...……..... 41

Anexo 3. Curva de calibración de esteviósidos elaboradas por densitometría in situ a partir de las placas cromatográficas. A esteviósido; B rebaudiosido A……..... 41

## RESUMEN GENERAL

La importancia de la estevia (Stevia rebaudiana Bertoni) como cultivo comercial se encuentra en las hojas, ya que poseen un sabor dulce característico gracias a la producción de unas moléculas llamadas esteviosidos. Sin embargo, son escasos los estudios que documentan científicamente la plasticidad de la especie al estar sometida a estrés hídrico y su recuperación y como se encuentra relacionada con la producción de esteviosidos. Se realizó un experimento con 180 plantas de estevia distribuidas en tres tratamientos de riego (60 plantas por tratamiento): Riego al 100% (control); plantas regadas con el 20% (estrés medio) y plantas sin regar (estrés severo), cuando el 60% de las plantas del T3 empezaron a presentar síntomas de marchitez se les aplicó un riego de rehidratación (a los 124 DDT) a todos los tratamientos para evaluar la capacidad de recuperación de las plantas. Se evaluaron variables fisiológicas, de crecimiento y la cantidad de esteviosidos contenidos en las hojas. Los resultados obtenidos sugieren que las plantas de estevia son capaces de recuperar sus valores fotosintéticos normales después de haber pasado por un periodo de escases de agua, mientras que su crecimiento se ve limitado en las plantas sin riego en comparación con el control, sin embargo, nuestros resultados demuestran que el estrés hídrico modifica la relación EST/REB A. Podemos concluir que la estevia disminuye su actividad fisiológica y ganancia de biomasa como una estrategia durante periodos de sequía prolongados, con el propósito de recuperar estas actividades y sobrevivir.



Palabras clave: Fotosíntesis, metabolitos secundarios, estrés hídrico, esteviosidos.

**ABSTRACT**

The importance of stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) as commercial crop is found in his leaves, since they have a characteristic sweet taste due to the production of molecules called steviosides. However, there are few studies that scientifically document the plasticity of the species subjected to water stress and its recovery and how it is related to the production of steviosides. An experiment was carried out with 180 stevia plants distributed in three irrigation treatments (60 plants per treatment): 100% irrigation (control); plants irrigated with 20% (medium stress) and plants without watering (severe stress), when 60% of the plants of T3 began to present wilt symptoms, they were applied a rehydration irrigation (at 124 DDT) at all treatments to evaluate the capacity of recovery of the plants. Physiological variables, growth and the amount of steviosides contained in the leaves were evaluated. The obtained results suggest that the stevia plants are capable to recover their normal photosynthetic values after having gone through a period of water scarcity, while their growth is limited in the plants without irrigation compared to the control, however, our results show that water stress modifies the ratio EST / REB A. We conclude that stevia decreases its physiological activity and biomass gain as a strategy during periods of prolonged drought, in order to recover these activities and survive.

Key words: Photosynthesis, secondary metabolites, wáter stress, steviosides.

# CAPÍTULO 1

## 1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL

La estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) es una planta semiperenne perteneciente a la familia Asteraceae, nativa de Paraguay, ha sido utilizada por muchos años por los indígenas guaraníes de Paraguay para endulzar sus bebidas; sus hojas poseen una alta concentración de edulcorantes, que son de 200 a 400 veces más dulces que la sucrosa (Barbet-Massin *et al*., 2015; Karimi et al., 2015). Estos edulcorantes son glucósidos diterpénicos bajos en calorías, comúnmente conocidos como esteviósidos, metabolitos secundarios producidos por la planta y concentrados en la hoja (Ceunen y Geuns, 2013).

En la actualidad la extracción de edulcorantes de las hojas de estevia es un sector creciente a nivel mundial (Segura-Campos et al., 2014; Jarma *et al*. 2010). Sin embargo, existen pocos estudios sobre el cultivo, incluso no se sabe con certeza cuál es la mejor lámina de riego a utilizar para potencializar el cultivo. En este sentido, el efecto del estrés hídrico sobre el crecimiento y la capacidad antioxidante en las plantas de estevia ha sido poco estudiado (Karimi *et al*., 2015).

Los estudios relacionados con los requerimientos hídricos de la estevia son escasos, sin embargo, Fronza y Vinícius en el 2003 estimaron el consumo de agua de la planta mediante microlisímetros; Karimi et al. (2015) evaluaron la tolerancia de la estevia al estrés hídrico; Daza et al. (2017) determinaron las necesidades hídricas a partir de una curva de coeficiente de cultivo (Kc). Sin embargo, en ninguno de los estudios previos se relacionó la disponibilidad de agua en el sustrato con parámetros de intercambio de gases de las hojas y la recuperación fisiológica de las plantas de estevia después de un riego de recuperación.

Se calcula que la agricultura consume cerca del 70% del agua disponible en el planeta (FAO, 2012). La carencia de agua dulce debido al incremento de la población mundial podría afectar el crecimiento, desarrollo y rendimiento de los cultivos a nivel mundial (Ati *et al*. 2012). Este escenario pone en evidencia la necesidad de conocer las respuestas de los cultivos en escenarios de déficit hídrico, para conocer los mecanismos de acción de las plantas. Así como las respuestas de su metabolismo primario y secundario. En este sentido, está bien documentado que la acumulación de metabolitos

secundarios incrementa en condiciones de estrés (Moore *et. al.* 2014; Phimchan et al. 2012; Ramakrishna and Gokare, 2011).

La estevia en México es un cultivo reciente y en expansión, conocer las respuestas fisiológicas de esta especie ante diferentes láminas de riego permitirá desarrollar planes de manejo en beneficio de los productores.

## 1.2 ANTECEDENTES

### 1.2.1 Importancia a nivel mundial

La estevia (*S. rebaudiana* Bert.) es una planta semiperenne perteneciente a la familia Asteracea, en la que también se encuentra el girasol, diente de león y el crisantemo. En estado silvestre se le puede encontrar en la frontera entre Paraguay y Brasil, crece en los bordes de las carreteras o cerca de terrenos inundables (Barbet-Massin *et al*. 2015; de Guzman, 2010; Jarma et al. 2005). Se conocen más de 150 especies de estevia, sin embargo, *S. reabaudiana* es la que presenta un sabor dulce característico, junto con otras propiedades benéficas para la salud humana y de la que más información se tiene actualmente (Londhe y Nanaware, 2013; Jaitak et al. 2008.)

Algunos autores describen a la estevia como una planta herbácea, pero otros la presentan como una planta de crecimiento arbustivo, ya que puede alcanzar una altura de hasta un metro, sin embargo, todos coinciden que posee un ciclo de vida semiperenne, que en las plantaciones comerciales puede ser de 3 a 5 años o incluso mayor (Salgado Cordero, 2013; Jarma et al. 2005).

Las hojas de estevia se han consumido por indígenas guaraníes de Paraguay durante cientos de años, debido a sus propiedades edulcorantes y medicinales, esto llamó la atención de botánicos y naturalistas del siglo XIX aumentando la curiosidad por conocer las características que hacían a esta planta atractiva para su consumo, así inicio una serie de investigaciones con el propósito de aumentar el conocimiento sobre esta especie para encaminarla hacia una producción comercial a nivel mundial (De Guzman 2010; Jaitak *et al*. 2008).

La estevia produce naturalmente metabolitos secundarios conocidos como glucósidos de esteviol o esteviosidos, estos confieren las propiedades edulcorantes a la planta. Los esteviosidos se encuentran en toda la planta en diferentes proporciones, pero las hojas tienen la mayor concentración, seguido por el tallo y la raíz (Pal *et al*. 2015); estos compuestos son glucósidos diterpenos que a pesar de que aún se desconoce por completo la ruta completa de la producción de estos metabolitos, son sintetizados por lo menos, en sus rutas iniciales a partir de la vía del ácido giberélico derivados de un compuesto conocido como mevalonato (Jarma-Orozco 2008; Guzman *et al*. 2005). El consumo de estos compuestos es benéfico para la salud del ser humano, debido a que pueden ser consumidos por personas con diabetes tipo II, no aporta calorías al ser

metabolizados, disminuyen la presión arterial, son cardiotónicos, antiácidos, poseen beneficios para la salud bucal, al ser naturales no son cancerígenos como los edulcorantes artificiales (Gregersen 2004; Das *et al*. 2007; Jarma 2008; de Guzman 2010).

En la actualidad la estevia se cultiva comercialmente en Japón, China, Paraguay, Brasil, México, entre otros (Pal *et al*. 2015; Jarma-Orozco 2008; Das *et al*. 2007). El auge en su producción se debe a que en muchos países las agencias reguladoras aprobaron el uso de algunos glucósidos de esteviol como suplementos dietéticos. La creciente aceptación a nivel mundial de la estevia ha impulsado las investigaciones relacionadas con el conocimiento de la planta y su relación con los factores bióticos y abióticos en las regiones donde se produce, sin embargo, aún es deficiente la información que se tiene al respecto (Ceunen y Geuns, 2013; Karimi *et al*. 2015).

### 1.2.2 La estevia como cultivar comercial

La adaptación de la estevia a una amplia variedad de ambientes hace posible su producción comercial en diferentes países, donde las investigaciones para maximizar los rendimientos y el contenido de esteviosidos son la prioridad para muchos productores (de Guzman, 2010). Para adaptar la estevia silvestre a la producción intensiva se han llevado a cabo una serie de prácticas agronómicas extensamente documentadas. Sin embargo, la *S. rebaudiana* es una especie de reciente domesticación, como cultivo comercial aún no se conocen bien los mecanismos fisiológicos y metabólicos que contribuyen a su adaptación en las regiones donde ha sido introducida (Karimi et al. 2015).

Algunos trabajos demostraron que la demanda de nutrientes por la planta en los primeros días del trasplante es menor durante los primeros 30 días, el contenido de N, P y K en los órganos de la planta tiene los niveles más bajos que en otros estados de su desarrollo (Rashid *et al*. 2013). Cuando se comparó la nutrición orgánica contra la convencional se observó que en los primeros días después del trasplante las plantas fertilizadas con químicos tuvieron los valores más altos de las variables agronómicas analizadas (altura, diámetros del tallo, numero de hojas, peso seco de raíz, tallo y hojas), sin embargo, entre los 60 y 80 días después del trasplante estos valores fueron superados por las plantas con fertilización orgánica (Yang *et al*. 2013; Liu *et al*. 2011).

### 1.2.3 Manejo agronómico y contenido de metabolitos secundarios

La variedad, manejo agronómico y las condiciones ambientales son los principales factores que influyen en la producción de metabolitos secundarios en las plantas de *S. rebaudiana* Bert (Jarma-Orozco, 2008). En diferentes países se han hecho investigaciones con el propósito de aumentar la concentración de los esteviosidos o su proporción en la hoja. La modificación de factores bióticos y abióticos son las principales estrategias planteadas dentro del manejo agrícola en esta especie, entre estas estrategias hay variaciones en el riego, nutrición, inoculación de microorganismos (biofertilizantes) y aplicaciones exógenas de algunos compuestos como el ácido giberélico (Modi et al., 2011).

Por otra parte, la inoculación de microorganismos benéficos para las plantas es una práctica cada vez más común en la producción agrícola con el propósito de mejorar los rendimientos y disminuir el consumo de fertilizantes inorgánicos. En un estudio se observó que la aplicación de biofertilizantes en *S. rebaudiana* Bert. aumentó significativamente el contenido de esteviosidos en las hojas, a su vez que mejoraban el crecimiento y rendimiento de las plantas en comparación con testigos sin inoculación o con grupos de plantas bajo fertilización química (Gupta *et al*. 2011; Das y Dang 2010). En este sentido, Barbet-Massin *et al*., (2015) probaron el efecto de la fertilización nitrogenada en la acumulación de los dos principales esteviosidos, esteviosido (EST) y rebaudiosido A (REB A), encontraron que una baja fertilización con nitrógeno estaba correlacionada con el aumento en la concentración de metabolitos secundarios, disminuyendo la relación RebA/EST con el aumento de los glucósidos de esteviol. Por otra parte, se determinó que el contenido de glucósidos de esteviol disminuye, mientras que los azúcares solubles y la capacidad antioxidante aumentan cuando baja la humedad del suelo (Karimi *et al*., 2015).

En México la producción de estevia se realiza mediante prácticas culturales. Sin embargo, los productores empíricamente han observado que el “dulzor” de las hojas aumenta cuando las plantas no tienen riego, en este sentido eliminan el riego unos días antes de la cosecha. Esta práctica carece de sustento científico para el caso de la estevia, ya que son escasos los experimentos relacionados con el efecto del estrés hídrico en esta especie, aunque se ha comprobado que en ciertas especies de plantas (*Scrophularia ningpoensis, Glycine max, Papaver somniferum, Pisum sativum, Capsicum chinense*) el

contenido de metabolitos secundarios aumenta como efecto del estrés hídrico (Phimchan *et al*. 2012).

Estudiar el efecto del estrés hídrico en *S. rebauidiana* Bert. es esencial para conocer su plasticidad fisiología, ya que esto podría propiciar un ahorro considerable de agua y la obtención de hojas de estevia de mejor calidad.

## 1.3 HIPÓTESIS

- El estrés hídrico disminuye el transporte de electrones del fotosistema II, la fotosíntesis, la biomasa y el área foliar; pero aumenta la concentración de glucósidos de esteviol en las hojas.
- Las plantas de *Stevia rebaudiana* tienen la plasticidad fisiológica necesaria para reactivar sus funciones metabólicas después de la rehidratación.

## 1.4 OBJETIVOS

### 1.4.1 General

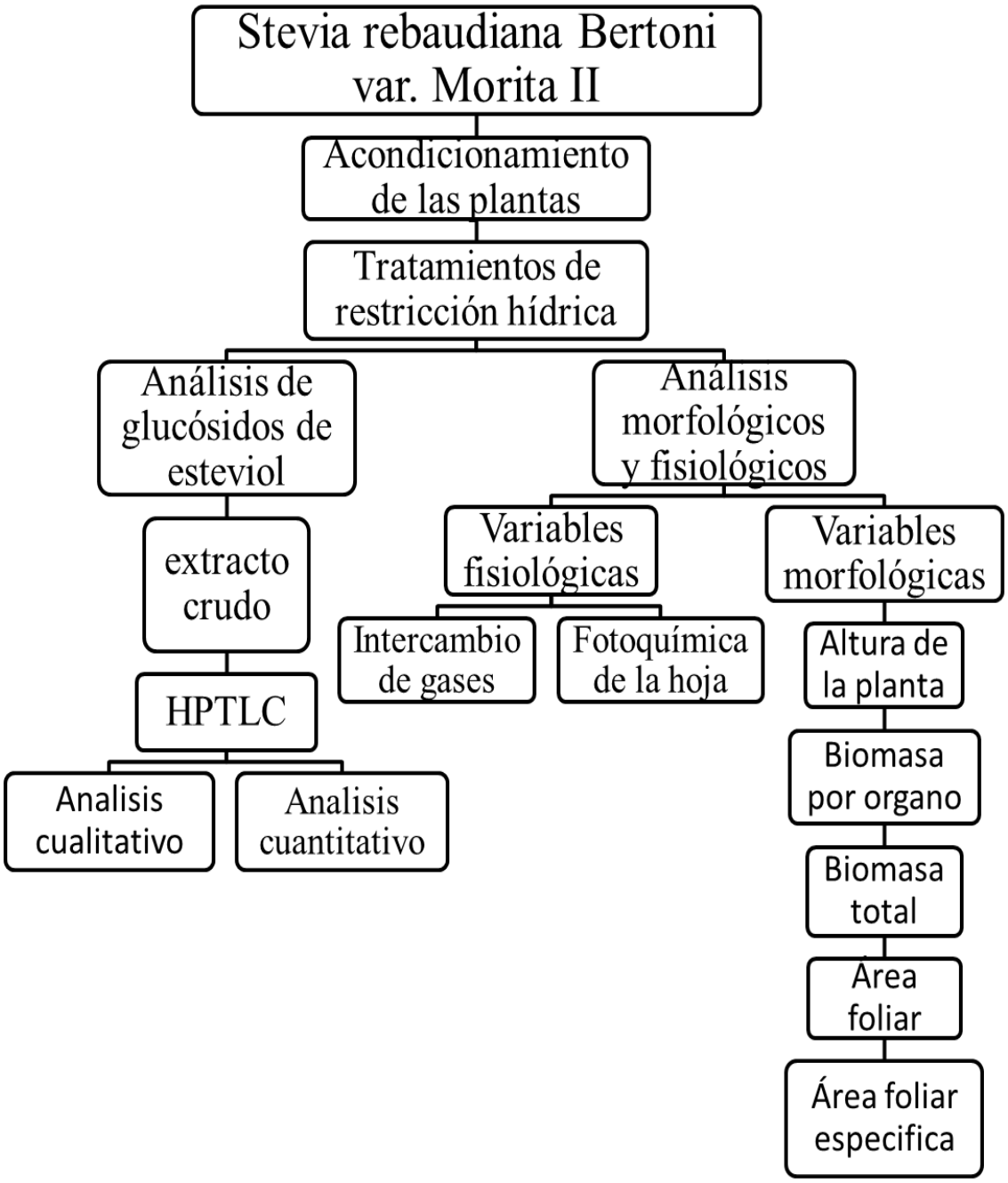
- Determinar la plasticidad fisiológica y la producción de glucósidos de esteviol en plantas de *Stevia rebaudiana* bajo tratamientos con restricción hídrica y rehidratación.

### 1.4.2 Específicos

- Evaluar la biomasa, el área foliar y el área foliar específica en plantas de *Stevia rebaudiana* bajo tratamientos de déficit hídrico y rehidratación.
- Evaluar el intercambio de gases y la fotoquímica de la hoja en plantas de *Stevia rebaudiana* bajo tratamientos de estrés hídrico y rehidratación.
- Cuantificar la concentración de glucósidos de esteviol en las hojas de *Stevia rebaudiana* sometidas a tratamientos de régimen hídrico.

## 1.5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El experimento se realizó en dos etapas: 1) evaluación de la plasticidad fisiológica de la *S. rebaudiana* Bert. y 2) El análisis de la concentración de metabolitos en las hojas de las plantas sometidas a estrés hídrico.



## 1.6 LITERATURA CITADA


Arturo, M. C., Torres, G. C., Peña, E. J. & Díaz, J. E. (2009) Microorganismos patógenos de *Estevia rebauidiana* Bertoni. *Bioagro*. 21 (3).

Ati , A. S., Iyada, A. D. & Najim. S. M. (2012). Water use efficiency of potato (*Solanum tuberosum* L.) under different irrigation methods and potassium fertilizer rates. *Annals of Agricultural Science*. 57 (2). 99–103. http://dx.doi.org/10.1016/j.aoas.2012.08.002

Barbet-Massin C., Giuliano S., Alletto L., Daydé J., & Berger M. (2015). Nitrogen Limitation Alters Biomass Production but Enhances Steviol Glycoside Concentration in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *PLoS ONE*. 10 (7): doi:10.1371/journal. pone.0133067

Brandle, J. E. & Telmer, P.G. (2007). Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochem*. 68: 1855-1863.

Campos H., Trejo C., Pena-Valdivia C. B., García-Navab R., Conde-Martínez F. V. & Cruz-Ortega M.R. (2014). Stomatal and non-stomatal limitations of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under water stress and re-watering: Delayed restoration of photosynthesis during recovery. *Environmental and Experimental Botany*. 98. http://dx.doi.org/10.1016.envexpbot.2013.10.015

Casaccia, J. & Álvarez E. (2006). Recomendaciones técnicas para una producción sustentable del ka'a he'e (Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni en el Paraguay. Caacupe *Ministerio de Agricultura y Ganadería, Dirección de Investigación Instituto Agronómico Nacional Agrícola*. 51 p.

Das, K. & Rama D. (2010). Influence of biofertilizers on stevioside content in *Stevia rebaudiana* grown in acidic soil condition. *Applied Science Research*. 2 (4).

Das, K., Dang, R., Shivananda, T. N. & Şekeroğlu N. (2007). Comparative Efficiency of Bio- and Chemical Fertilizers on Nutrient Contents and Biomass Yield in Medicinal Plant *Stevia rebaudiana* Bert. *International Journal of Natural and Engineering Sciences*. 1 (3).

Daza-Torres, M. C., Meneses-Carvajar, H. S., Reyes-Trujillo, A. & Urrutia-Cobo, N. (2017). Necesidades hídricas de estevia calculadas con el coeficiente del cultivo.

Agronomía. Mesoamericana. 28. 2 San Pedro May. http://dx.doi.org/10.15517/ma.v28i2.24354

De Guzman, R. (2010). Autoecological role of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* Bertoni. Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy. Centre for Plant & Water Science Faculty of Sciences, Engineering and Health CQUniversity. Australia, Rockhampton. 254p.

Espitia, M., C. Montoya, B. R. & Atencio, S. L. (2009). Rendimiento de *Stevia rebaudiana* Bert. bajo tres arreglos poblacionales en el sinú medio. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*. 12 (1).

Fronza, D. & Folegatti, M. V. (2003). Water consumption of the estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) crop estimated through microlysimeter. *Scientia Agricola*. 60 (3).

Gratani, L. (2014). Plant Phenotypic Plasticity in Response to Environmental Factors. *Advances in Botany*. (2014). ID 208747. http://dx.doi.org/10.1155/2014/208747

Gregersen S., Jeppesen P. B., Holst J. J. & Hermansen K. (2004). Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism*. 53 (1).

Gupta, M., Bisht, S., Singh, B., Gulati, A., & Tewari, R. (2011). Enhanced biomass and steviol glycosides in Stevia rebaudiana treated with phosphate-solubilizing bacteria and rock phosphate. *Plant Growth Regul*. 65 (449). doi:10.1007/s10725-011-9615-9.

Jaitak, V., Gupta, A.P., Kaul, V.K. & Ahuja, P.S. (2008). Validated high-performance thin-layer chromatography method for steviol glycosides in *Stevia rebaudiana. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 47. 790-794.

Jarma A., Combatt E. & Cleves J. A. (2010). Nutritional aspects and metabolism of *Stevia rebaudiana* (Bertoni). A review. *Agronomía Colombiana*. 38. (2). http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180315602009

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.

Jarma, A., Rengifo T., & Araméndiz-Tatis, H. (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).

Karimi M., Ahmadi A., Hashemib J., Abbasi A., Tavarini S., Guglielminettic L. & Angelini L. G. (2015). The effect of soil moisture depletion on Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) grown in greenhouse conditions: Growth, steviol glycosides content, soluble sugars and total antioxidant capacity. *Scientia Horticulturae*. 183. http://dx.doi.org//10.1016/j.scienta.2014.11.001

Londhe, S. V. & Nanaware S. M. (2013). HPTLC method for simultaneous analysis of stevioside and rebaudioside-A in *Stevia rebaudiana*. *Journal of AOAC International*. 96 (1).

Modi, A. R., Shukla, Y. M., Litoriya, N. S., Patel, N. J. & Subhash, N. (2011). Effect of gibberellic acid foliar spray on growth and stevioside content of ex vitro grown plants of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Medicinal Plants*. 3(2).

Moore B. D., Andrew R.L., Kölheim C. & Foley W. J. (2014). Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *New Phytologist*. 201.

Pal, P. K., Kumar, R., Guleria, V., Mitali Mahajan, Ramdeen Prasad, Vijaylata Pathania, Baljinder Singh Gill, Devinder Singh, Gopi Chand, Bikram Singh, Rakesh Deosharan Singh y Paramvir Singh Ahuja. (2015) Crop-ecology and nutritional variability influence growth and secondary metabolites of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *BMC Plant Biol*. 15 (67). Doi: 10.1186/s12870-015-0457-x

Phimchan, P., Techawongstien, S., Chanthai,S., & Bosland, P. W. (2012). Impact of Drought Stress on the Accumulation of Capsaicinoids in Capsicum Cultivars with Different Initial Capsaicinoid Levels. *HORTSCIENCE*. 47(9)

Ramakrishna, A. & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior* 6 (11).

Ramírez J. G., Avilés B. W., Moguel O. Y., Góngoranad G. S. & May L. C. (2011). Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) a Growing with Productive Potential in Mexico.

National Institute of Forestry, Agriculture and Livestock, Southeast Regional Research Center.

Rashid, Z., Rashid, M., Inamullah, S., Rasool, S. & Bahar, F.A. (2013). Effect of different levels of farmyard manure and nitrogen on the yield and nitrogen uptake by stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *African Journal of Agriculture Research*. 8(29).

Segura-Campos, M., Barbosa-Martín, E., Matus-Basto, Á., Cabrera-Amaro, D., Murguía-Olmedo, M., Moguel-Ordoñez, Y. & Betancur-Ancona, D. (2014). Comparison of Chemical and Functional Properties of Stevia rebaudiana (Bertoni) Varieties Cultivated in Mexican Southeast. American Journal of Plant Sciences, 2014 (5). http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2014.53039.

Liu, X., Ren, G. & Shi Y. (2011). The effect of organic manure and chemical fertilizer on growth and development of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Energy Procedia*. 5 (2011).

Yang, J., Liu, X. & Shi, Y. (2013). Effect of Different Mixed Fertilizer on Yield, Quality and Economic Benefits in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Advance Journal of Food Science and Technology*. 5(5).

# CAPÍTULO II

## PLASTICIDAD FISIOLÓGICA Y CONCENTRACIÓN DE GLUCÓSIDOS DE *Stevia rebaudiana* EN TRATAMIENTOS DE RESTRICCIÓN HÍDRICA

Alain R. Reyes-Guerrero, René Garruña, Miriam Monforte-Gonzalez, Alfonzo Pérez-Gutiérrez, Felipe A. Vázquez-Flota

### 2.1 RESUMEN

La importancia de la estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) como cultivo comercial se encuentra en las hojas, ya que poseen un sabor dulce característico gracias a la producción de unas moléculas llamadas esteviosidos. Sin embargo, son escasos los estudios que documentan científicamente la plasticidad de la especie al estar sometida a estrés hídrico y su recuperación y como se encuentra relacionada con la producción de esteviosidos. Se realizó un experimento con 180 plantas de estevia distribuidas en tres tratamientos de riego (60 plantas por tratamiento): Riego al 100% (control); plantas regadas con el 20% (estrés medio) y plantas sin regar (estrés severo), cuando el 60% de las plantas del T3 empezaron a presentar síntomas de marchitez se les aplicó un riego de rehidratación (a los 124 DDT) a todos los tratamientos para evaluar la capacidad de recuperación de las plantas. Se evaluaron variables fisiológicas, de crecimiento y la cantidad de esteviosidos contenidos en las hojas. Los resultados obtenidos sugieren que las plantas de estevia son capaces de recuperar sus valores fotosintéticos normales después de haber pasado por un periodo de escases de agua, mientras que su crecimiento se ve limitado en las plantas sin riego en comparación con el control, sin embargo, nuestros resultados demuestran que el estrés hídrico modifica la relación EST/REB A. Podemos concluir que la estevia disminuye su actividad fisiológica y ganancia de biomasa como una estrategia durante periodos de sequía prolongados, con el propósito de recuperar estas actividades y sobrevivir.

**Palabras clave:** Fotosíntesis, metabolitos secundarios, transpiración, esteviosidos.

**ABSTRACT**

The importance of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) as commercial crop is found in his leaves, since they have a characteristic sweet taste due to the production of molecules called steviosides. However, there are few studies that scientifically document the plasticity of the species subjected to water stress and its recovery and how it is related to the production of steviosides. An experiment was carried out with 180 stevia plants distributed in three irrigation treatments (60 plants per treatment): 100% irrigation (control); plants irrigated with 20% (medium stress) and plants without watering (severe stress), when 60% of the plants of T3 began to present wilt symptoms, they were applied a rehydration irrigation (at 124 DDT) at all treatments to evaluate the capacity of recovery of the plants. Physiological variables, growth and the amount of steviosides contained in the leaves were evaluated. The obtained results suggest that the stevia plants are capable to recover their normal photosynthetic values after having gone through a period of water scarcity, while their growth is limited in the plants without irrigation compared to the control, however, our results show that water stress modifies the ratio EST / REB A. We conclude that stevia decreases its physiological activity and biomass gain as a strategy during periods of prolonged drought, in order to recover these activities and survive.

## 2.2 INTRODUCCIÓN

La estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) es una planta semiperenne nativa de Paraguay. Su importancia como cultivo comercial se encuentra en las hojas, ya que poseen un sabor dulce no calórico que se utiliza como aditivo alimenticio y endulzante (Barbet-Massin *et al.*, 2015; Morlock *et al*., 2014; Salgado-Cordero, 2013). Las hojas de estevia contienen metabolitos secundarios muy particulares, que se ubican dentro de un grupo de edulcorantes conocidos como glucósidos de esteviol, por lo menos nueve glucósidos están presentes en estado natural en las hojas, también son conocidos como esteviosidos; el Esteviosido (EST) y el Rebaudiosido A (REB A) son los más abundantes (del 6 al 10% y del 2 al 4%, respectivamente) (Karimi et al. 2015; Morlock et al. 2014; Jaitak et al. 2008).

Los productores de estevia en una práctica empírica modifican o suprimen la frecuencia de los riegos antes de la cosecha de las hojas para incrementar el dulzor de esta. Posteriormente, reanudan los riegos con el propósito de generar nuevas hojas y continuar con otro ciclo del cultivo. En este sentido, se sabe que los metabolitos secundarios aumentan ante condiciones de estrés abiótico (Karimi et al. 2015; Phimchan et al. 2012). Sin embargo, la investigación sobre el cultivo de la estevia es escasa, no se ha estudiado el efecto de algunos factores abióticos sobre los rasgos agronómicos y fisiológicos; así como tampoco se ha estudiado la capacidad de respuesta de las plantas a la rehidratación (Karimi et al. 2015).

Las respuestas de los vegetales al estrés están relacionadas con el tiempo, intensidad y duración, estos factores son determinantes para evaluar el efecto en las plantas, una posible aclimatación a estas condiciones involucraría la expresión de genes específicos y modificaciones tanto fisiológicas como morfológicas (Flexas *et al*. 2006; Chavez y Oliveira 2004).

Conocer el comportamiento de los parámetros fisiológicos, agronómicos y metabólicos de la estevia en condiciones de restricción hídrica podría contribuir para mejorar las prácticas de cultivo de la especie con bases científicas. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar las respuestas en la fotoquímica de la hoja, intercambio de gases, crecimiento y concentración de glucósidos en plantas de *S. rebaudiana* sometidas a tratamientos de restricción hídrica y su posterior rehidratación. Bajo este contexto se formuló la siguiente hipótesis: “El estrés ocasionado por una restricción hídrica del sustrato disminuye el transporte de electrones del fotosistema II, la fotosíntesis, la

biomasa y el área foliar; sin embargo, la concentración de glucósidos se incrementa y las plantas de estevia tienen la plasticidad para reactivar sus funciones metabólicas y fisiológicas después de la rehidratación.

## 2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.3.1 Ubicación del experimento, material vegetal y manejo agronómico

El estudio se realizó en un invernadero del Instituto Tecnológico de Conkal, en Yucatán México. Se utilizaron 180 plantas de estevia (*S. rebaudiana* Bert.) variedad Morita II, producidas mediante esquejes. Las plantas fueron trasplantadas en bolsas de polietileno negro de 6 Kg con sustrato de una mezcla suelo-bagazo de henequén-gallinaza, en una relación 2:1:1 (v/v). El sustrato se analizó en el laboratorio de Agua-Suelo-Planta para obtener los datos de contenido de humedad a capacidad de campo (θcc) y punto de marchitez permanente (θpmp); estos datos se utilizaron junto con el método del tanque evaporímetro tipo A para calcular el riego de los diferentes tratamientos (FAO 2006). Desde el trasplante hasta los 102 días las plantas de todos los tratamientos fueron regadas con la misma cantidad de agua y tratadas con el mismo manejo agronómico, la nutrición se basó en lixiviados de lombriz y biol de microelementos. A los 95 días después del trasplante (DDT) se realizó una poda de los ápices de las plantas, con el propósito de retrasar la floración. De los 103 a los 123 DDT se llevaron a cabo los tratamientos, durante este periodo no se aplicó ningún insumo a las plantas, solo se realizó el riego de acuerdo con los respectivos tratamientos. A los 124 DDT se regaron de nuevo las plantas de todos los tratamientos a capacidad de campo, con la finalidad de evaluar la recuperación de las plantas en el periodo de rehidratación. Se realizaron cinco muestreos a lo largo del experimento: muestreo inicial (pre-tratamientos; 102 DDT), muestreos en la semana 1, 2 y 3 (tratamientos; a los 109, 116 y 123 DDT, respectivamente), periodo de rehidratación (a los 130 DDT).

### 2.3.2 Tratamientos de restricción hídrica

Como se mencionó anteriormente, a los 102 DDT iniciaron los tratamientos de restricción hídrica. Las 180 plantas se distribuyeron en tres tratamientos de riego (60 plantas por tratamiento), T1: plantas regadas con el 100% de la evaporación calculada con base en el tanque evaporímetro tipo A (Riego al 100%, control); T2: plantas regadas con el 20% de la evaporación (estrés medio) y T3: plantas sin regar (estrés severo). Cabe mencionar que cuando el 60% de las plantas del T3 empezaron a presentar síntomas de marchitez se les aplicó un riego de rehidratación (a los 124 DDT) a todos los tratamientos para evaluar la capacidad de recuperación de las plantas.

### 2.3.3 Variables a evaluar

Se evaluaron variables morfológicas, fisiológicas y la concentración de los glucósidos. Se realizaron cinco muestreos. El potencial hídrico se midió de acuerdo con Pérez-Gutiérrez et al., (2017) con un potenciómetro de punto de rocío (WP4, Decagon Device , Washington, Estados Unidos), las muestras de suelo se colectaron a las 6 am, y se trasladaron dentro de una nevera con hielo al laboratorio. Para las variables de crecimiento se realizaron tres muestreos, el primero al inicio de los tratamientos (102 DDT), el siguiente durante los tratamientos (113 DDT) y el ultimo una semana después de la rehidratación (130 DDT). Seis plantas por tratamiento fueron evaluadas. Las variables evaluadas fueron: altura de planta, peso seco de la hoja, peso seco del tallo y peso seco de raíz, con estos datos se calculó el peso seco total. Se utilizó un horno de aire forzado a 60 ± 2 °C hasta peso constante. El área foliar se calculó con un analizador de área (LICOR 3100, Nebraska, Estados Unidos) y el área foliar específica se calculó mediante la fórmula: AFE = AF / PSH, donde: *AF* = Área foliar ($cm^2$) y *PSH* = peso seco de la hoja.

La asimilación neta de $CO_2$ ($A_N$), la conductancia estomática ($C_s$), el carbono intercelular ($C_i$) y la transpiración ($E$) se midieron con un analizador de gases en el infrarrojo portátil (LICOR LI-6400, Nebraska, Estados Unidos), todas las mediciones se realizaron en hojas jóvenes totalmente expandidas, la densidad de flujo de fotones para la fotosíntesis se fijó a 1500 µmol $m^{-2}$ $s^{-1}$, y la concentración atmosférica de $CO_2$ se fijó en 400 µmol de $CO_2$ $mol^{-1}$ de aire. Con los datos obtenidos de ($A_N$) y ($E$) se calculó el uso eficiente del agua (*UEA*), que es la relación $A_N$ / $E$. las mediciones se realizaron entre las 9:00 y las 10:00 am. Con un fluorometro de amplitud modulada (Junior-PAM, Walz, Effeltrich, Alemania) se evaluó la fotoquímica de la hoja: fluorescencia de la clorofila (*Fv*/*Fm*), coeficiente de extinción fotoquímico (*qP*), coeficiente de extinción no fotoquímico (*NPQ*), tasa de transporte de electrones del FSII (TTE) y rendimiento cuántico del FSII ($\Phi_{FSII}$). Las evaluaciones se realizaron a las 10 pm en hojas jóvenes completamente expandidas, a 5 cm del ápice de las ramas de la planta (Samaniego-Gámez *et al*. 2016).

Para el análisis del contenido de esteviosidos se cosecharon las hojas semanalmente durante la duración del experimento y se secaron en un horno de aire forzado a 60° hasta peso constante. Para obtener los extractos metanólicos se siguió la metodología empleada por algunos autores (Morlock *et al*., 2014;), se prepararon las muestras con metanol analítico en una relación de 200 mg de peso seco de hoja en 15 ml de disolvente. Estos extractos se analizaron por cromatografía de capa fina de alta resolución para separar los diferentes metabolitos presentes (Morlock *et al*., 2014) (Fig. 1). Las placas para la cromatografía de capa fina de alta resolución fueron de 20 x 10 cm (Merck, Darmstad, Alemania). Para la cromatografía se utilizó una mezcla de acetato de etilo: metanol: ácido acético (3:1:1, v:v:v). El contenido de metabolitos se determinó por densitometría *in situ*, para esto se utilizó Scanner4 (CAMAG, TLC Scanner 4, Muttenz, Suiza).

### 2.3.4 Diseño experimental

Los tratamientos se distribuyeron en un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones, cada tratamiento con 20 plantas (60 plantas por tratamiento). Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) con el programa Statistica 8 (Stat Soft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) y al encontrarse diferencias significativas se realizó una prueba de comparación de medias Tukey al 0.05. Las densidad óptica de las manchas cromatográficas se analizaron por en un medio del programa Wincats 4.1. Este programa compara la intensidad de la señal producida por la mancha cromatográfica producida por la muestra y la compara con la del estándar. Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) con el programa Sigma Plot 11 (Systat software, Inc. Alemania).

## 2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El potencial hídrico del sustrato de las plantas regadas con el 100% (testigo) de la evapotranspiración se mantuvo constante antes (-0.7325), durante (-0.8400) y después (0.0000) de los tratamientos. El sustrato de las plantas regadas con el 20% tuvo valores muy similares al testigo. Sin embargo, en el sustrato sin riego el potencial hídrico disminuyó desde la primera semana de los tratamientos (-7.4083 y llegó hasta -31.1250 y -28.1417 en la semana 2 y 3 después del inicio de los tratamientos, respectivamente). Con la rehidratación, el potencial hídrico de los tratamientos al 20% y sin riego incrementó hasta igualar el valor del testigo. En este sentido, Karimi et al., (2015) mencionan que un contenido de humedad del sustrato de 45% representa una condición de estrés para la estevia, de acuerdo a nuestros resultados las plantas regadas con 20% tuvieron valores relativamente altos de potencial hídrico y sólo el sustrato de las plantas sin regar incrementó considerablemente su tensión (Fig. 1).

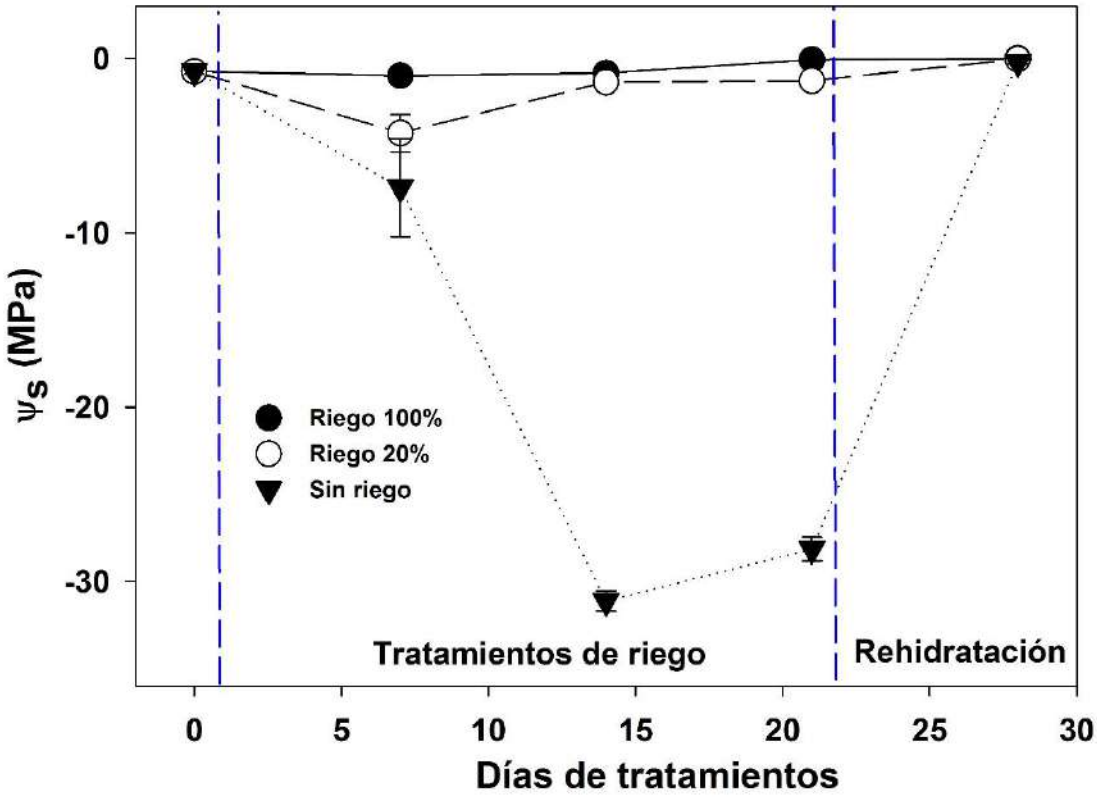



Figura 1. Potencial hídrico del sustrato en plantas de *S. rebaudiana* sometidas a tratamientos de restricción hídrica. Los datos son media ± EE. n=6

La máxima eficiencia cuántica del fotosistema II (Fv/Fm) tanto en las plantas testigo (riego 100%) como en las plantas regadas al 20% fue estadísticamente mayor que en las plantas sin riego, en este tratamiento la Fv/Fm más baja fue de 0.686 en la tercera semana de tratamiento, en este punto las plantas presentaron síntomas de estrés hídrico. Sin embargo, después de la rehidratación las plantas de los tres tratamientos tuvieron valores similares (riego 100%: 0.802; riego 20%: 0.793; SR: 0.794). El estrés hídrico es una factor limitante en la producción agrícola, este estrés se ve reflejado en una disminución en Fv/Fm debajo del valor de 0.83 para la mayoría de las plantas (Maxwell & Johnson 2000), en el caso de la plantas sin riego la recuperación fue similar a este valor, algunos trabajos han demostrado que la inoculación de microorganismos puede mejorar los parámetros de fisiológicos de las plantas, lo que podría beneficiar a las plantas que sufran de estrés (Samaniego-Gámez *et al*. 2016) (Fig. 2).

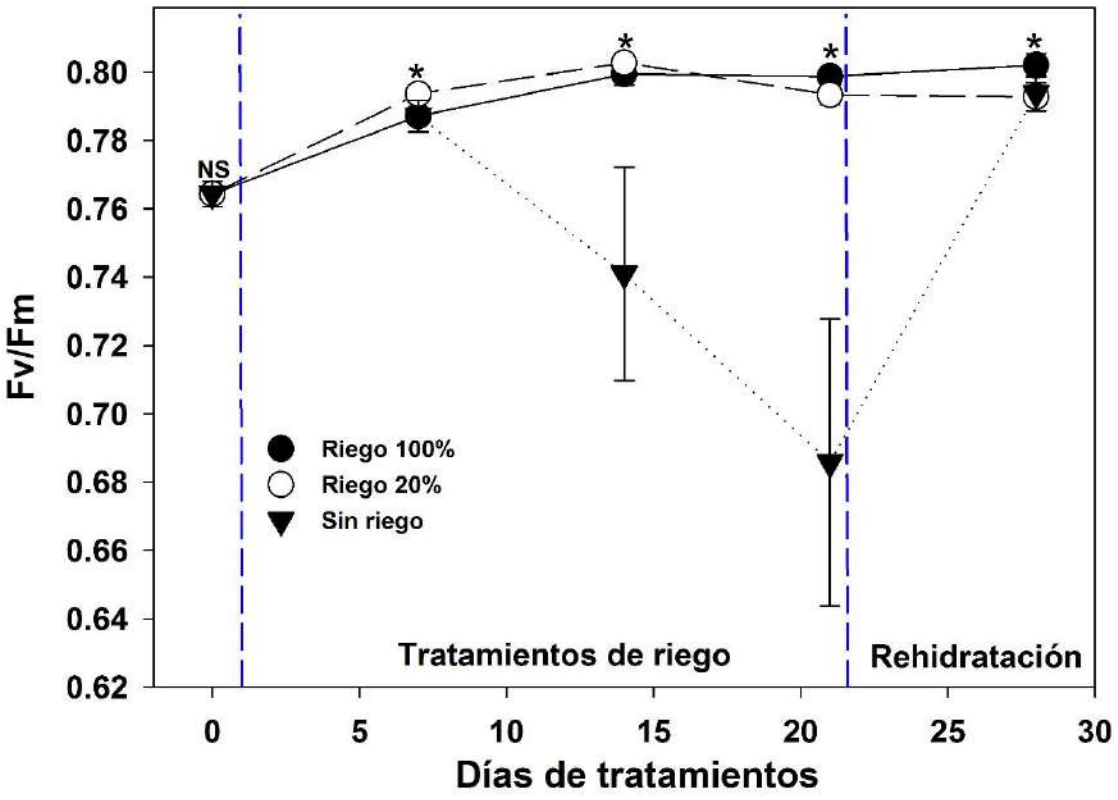



Figura 2. Máxima eficiencia cuántica del fotosistema II (Fv/Fm) en plantas de *S. rebaudiana* sometidas a tratamientos de restricción hídrica. Los datos son las medias ± EE. n=9.

Durante los tratamientos de riego, el coeficiente de extinción fotoquímico (qP) más alta fue en las plantas regadas al 100% (0.390), las plantas a las cuales se les limito el agua presentaron una disminución gradual de qP, los valores más bajos se observaron en las plantas sin riego (0.266 y 0.234) en las dos primeras semanas de la aplicación de los tratamientos. Sin embargo, es importante recalcar que en la tercera semana el grupo de plantas con riego al 20% y sin riego tuvieron los valores más bajos de qP (0.131 y 0.149, respectivamente) en comparación con las plantas bien regadas (0.331). Después de la rehidratación las plantas sin riego (0.374) fueron estadísticamente superiores a los otros dos tratamientos (Fig. 3A). Por otra parte, a partir del inicio de los tratamientos de restricción hídrica, las plantas sin riego disminuyeron el coeficiente de extinción no fotoquímico (NPQ), tuvieron los valores más bajos en comparación con las plantas bien regadas, incluso después de la rehidratación hubo diferencias estadísticas (ANOVA, $p \leq 0.05$) entre las plantas regadas y las testigo (sin regar) (Fig. 3B). La qP es un indicador de la energía lumínica que es captada por el complejo antena en los cloroplastos y es dirigida hacía procesos fotoquímicos como la fotosíntesis, mientras que la NPQ es un estimador de la energía lumínica que es canalizada hacía procesos no fotoquímicos (ciclo de las xantofilas) (Maxwell & Johnson 2000). En este sentido, es evidente que los tratamientos bajo restricción de agua disminuyen su capacidad de disipación en ambas variables durante los tratamientos, debido a la disminución en los mecanismos fisiológicos en respuesta a la falta de agua, pero cabe mencionar que después de la rehidratación las plantas sin riego sólo se recuperan en comparación con las plantas regadas al 100% en la variable qP y no en la NPQ. Es probable que la regeneración de las xantofilas (carotenoides) sea más lenta que la regeneración de las clorofilas y esa sea la causa de que las reacciones asociadas a las clorofilas tuvieron una capacidad de recuperación más rápida que las asociadas a las xantofilas.

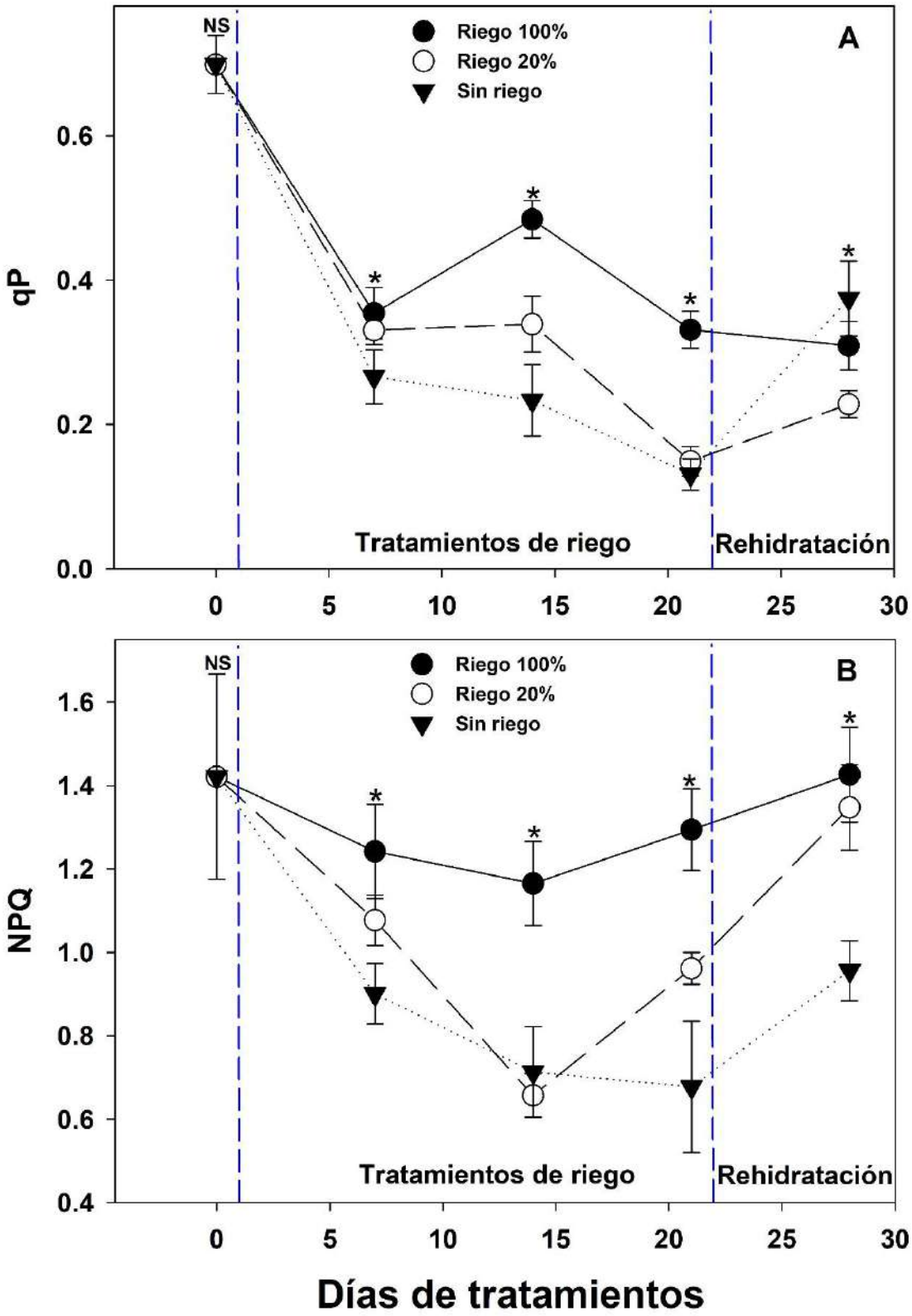



Figura 3. A) coeficiente de extinción fotoquímico (qP) y B) coeficiente de extinción no fotoquímico (NPQ) en plantas de *S. rebaudiana* sometidas a tratamientos de restricción hídrica. Los datos son medias ± EE. n=9. NS = no significativo. * = diferencias estadísticas significativas (ANOVA, $P \leq 0.05$).

Las plantas sin regar tuvieron los valores más bajos tanto en el rendimiento cuántico del fotosistema II ($\Phi_{FSII}$) como en la tasa de transporte de electrones durante el periodo de restricción hídrica (Fig. 4C y 4D) Sin embargo, después de la rehidratación las plantas que habían estado sin riego tuvieron una recuperación que superó a las plantas con riego al 20% e incluso a las plantas con riego al 100% (Fig. 4E y 4F). El rendimiento cuántico del fotosistema II ($\Phi_{FSII}$) es un parámetro que nos permite conocer la proporción de luz que es absorbida por las clorofilas destinada hacia la fotoquímica de la planta, permitiéndonos calcular el transporte linear de electrones a través de los fotosistemas (TTE) y por lo tanto, una idea de la capacidad fotosintética de la planta (Chavez & Oliveira 2004; Maxwell & Johnson 2000; Genty et al., 1989).

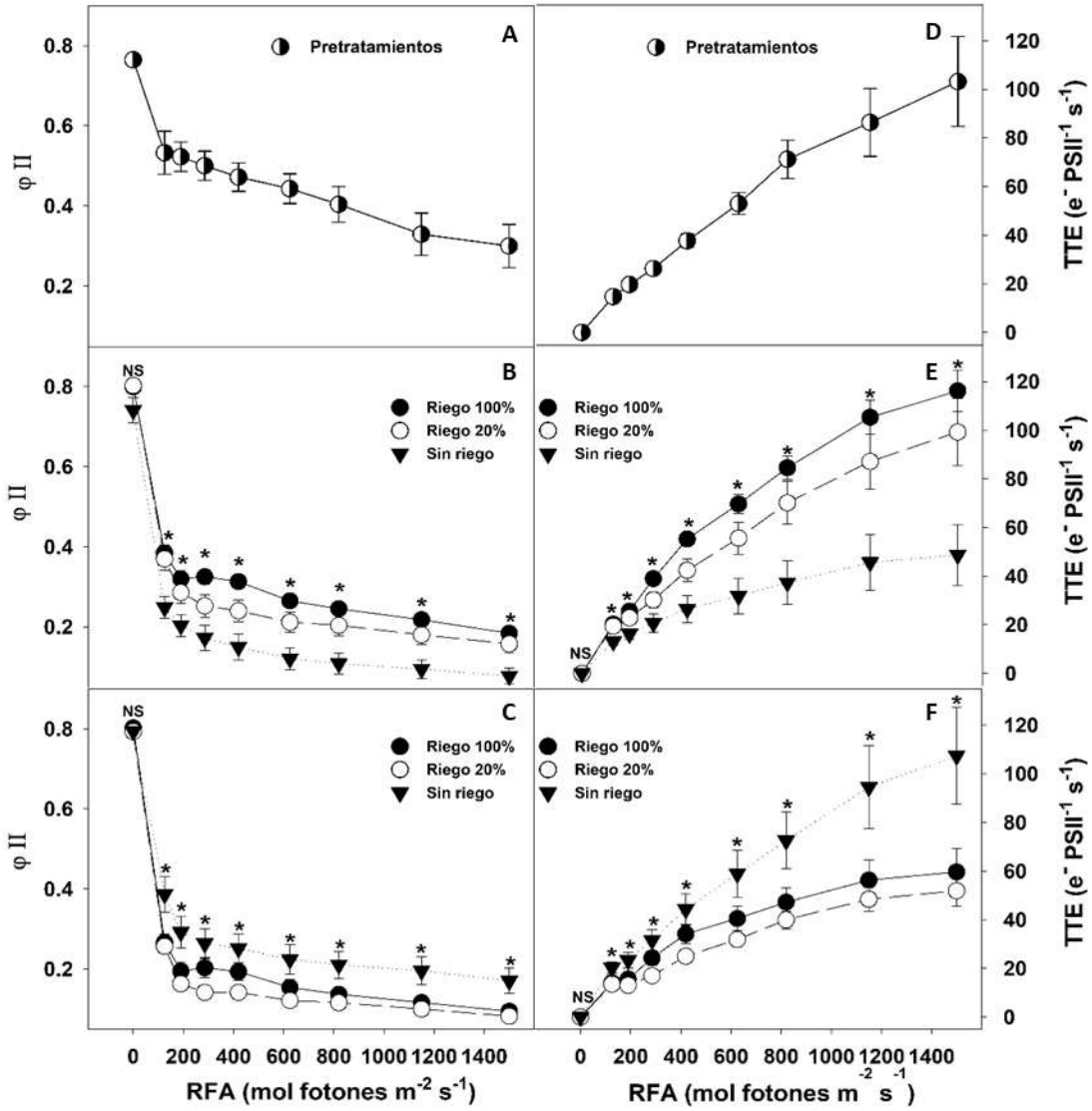



Figura 4. Rendimiento cuántico del fotosistema II ($\Phi_{FSII}$) y tasa de transporte de electrones (TTE) en pretratamiento, durante tratamientos de restricción hídrica (A, B, , D y E) y posterior a riego de recuperación (C y F) en plantas de *S. rebaudiana*. Los datos son medias ± EE. n=9.

### 2.4.1 Intercambio de gases

La conductancia estomática entre las plantas sometidas a diferentes niveles de humedad fue estadísticamente diferente, en la primera semana de los tratamientos las plantas con riego al 100% y 20% tuvieron los valores más altos, en las plantas sin riego la conductancia estomática disminuyo 84.23%. Sin embargo, en la segunda semana se observó una disminución de las plantas regadas con el 20%, incluso en la tercera semana sus valores fueron similares que las plantas sin riego. Después de la rehidratación el tratamiento al 20% alcanzó los mismos valores que el tratamiento al 100%, pero las plantas del tratamiento sin regar no se alcanzan a recuperar totalmente después del riego de recuperación (Fig. 5A). En la transpiración ocurrió algo similar a la conductancia estomática, hubo una disminución del 84.91% en la traspiración de las plantas sin riego, mientras que en las plantas con riego al 20% la disminución de la transpiración fue gradual hasta alcanzar valores cercanos a las plantas sin riego con una reducción del 80.62% con respecto a las plantas regadas al 100%. Después de la rehidratación, las plantas con riego presentaron una transpiración superior a las plantas que estuvieron sin riego que sólo alcanzaron a recuperarse 50.66% (Fig.5C). En el carbono intercelular ($C_i$) hubo diferencias estadísticas desde la primera semana de los tratamientos de restricción hídrica, las plantas sin riego empezaron a incrementar considerablemente la concentración del Ci en comparación con los otros dos tratamientos, esta respuesta se debió a la disminución de la conductancia estomática ocasionada probablemente por un cierre estomático para evitar deshidratación por transpiración, además de una disminución en la tasa de asimilación neta. En este sentido, el aumento en la cantidad de carbono intercelular es un reflejo de la incapacidad de la planta de dirigir este carbono hacia los sitios de carboxilación durante el ciclo de Calvin (Flexas *et al*. 2006). A pesar de esto, después del riego de recuperación las plantas sin riego tuvieron valores similares a las plantas control (Fig. 5B). En la tasa de asimilación neta de $CO_2$ ($A_N$) las plantas con riego al 20% disminuyeron 43% en comparación con el control a partir de la segunda semana de haber iniciado los tratamientos. Las plantas sin riego disminuyeron la asimilación de carbono desde la primera semana, a partir de la segunda semana las plantas de este tratamiento comenzaron a fotorrespirar. A pesar tener valores negativos de asimilación durante tres semanas, después de la rehidratación las plantas sin riego volvieron a fotosintetizar. Sin embargo, no alcanzaron los valores de los otros dos tratamientos, es posible que hubieran requerido más días para poder apreciar su capacidad total de resiliencia fotosintética (Fig.5D). El intercambio de gases entre la planta y la

atmosfera está relacionado con la apertura estomática, una planta sometida a estrés hídrico reducirá la apertura estomática para evitar la pérdida de agua, lo que significa para la planta una reducción en la conductancia estomática ($g_s$) y como consecuencia directa una reducción tanto en la transpiración como en la fotosíntesis (Campos *et al*. 2014; Flexas *et al*. 2009; Berni *et al*. 2009).

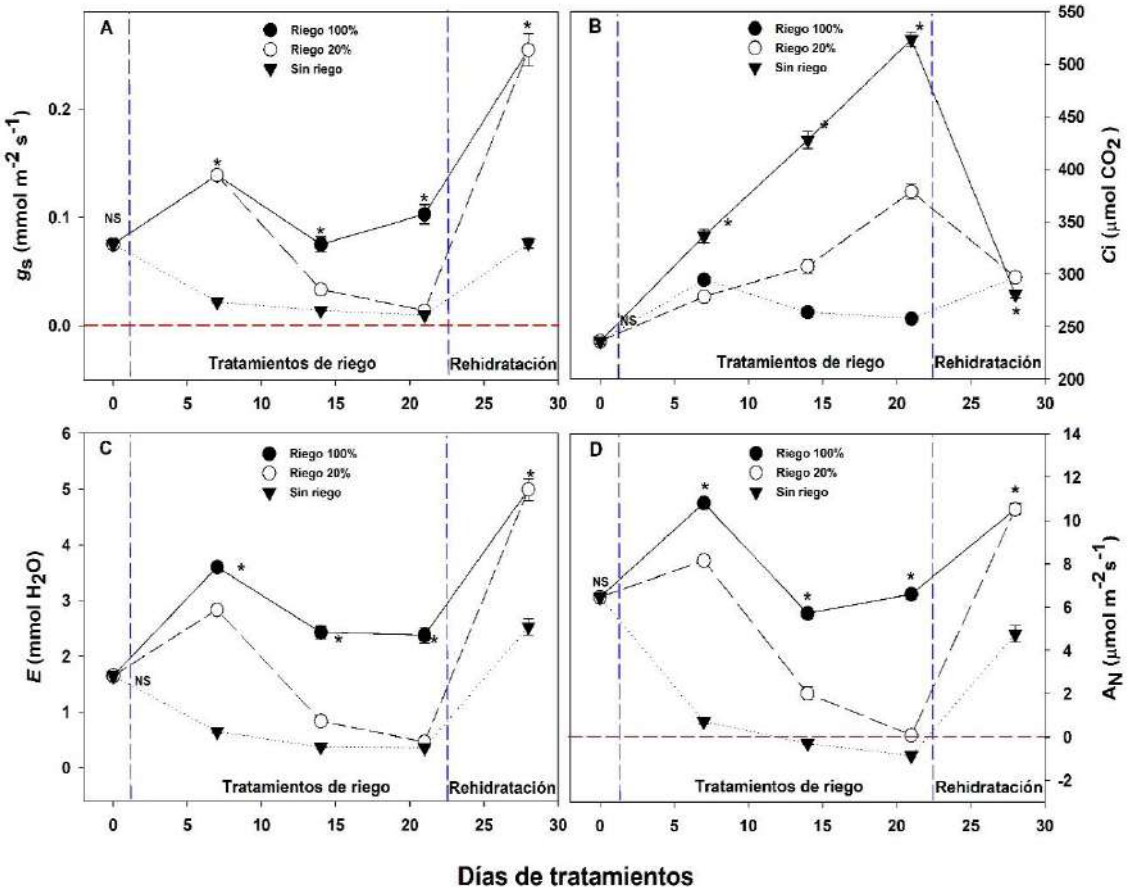



Figura 5. A) Conductancia estomática ($g_s$); B) Carbono intercelular ($C_i$); C) Transpiración (E) y D) Fotosíntesis ($A_N$) en plantas de *S. rebauidiana* sometidas a tratamientos de restricción hídrica. Los datos representan las medias ± EE. n=9

Los valores de uso eficiente del agua UEA fueron estadísticamente diferentes desde el inicio de los tratamientos e incluso después del riego de recuperación, los valores más bajos siempre los tuvo las plantas sin regar. En este sentido, las tasas de asimilación de carbono muy bajas que tuvieron estás plantas influyó para que la EUA fuera la más baja en comparación con las plantas con riego (Fig. 6).

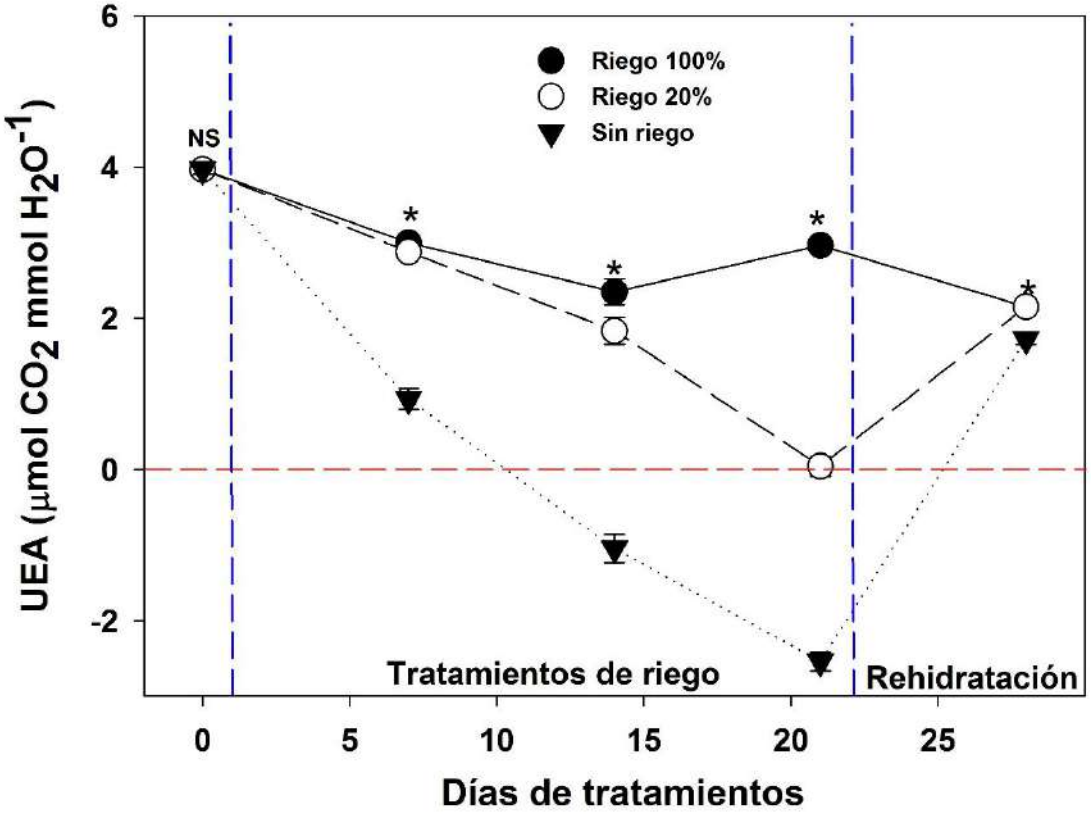



Figura 6. Uso eficiente del agua (UEA) en plantas de *S. rebaudiana* sometidas a tratamientos de restricción hídrica. Los datos representan las medias ± EE. n=9

### 2.4.2 Variables morfológicas

La altura de las plantas de estevia se afectó por la disminución del agua, se observó un aumento estadísticamente significativo en el crecimiento de las plantas regadas al 100% (90.17 ± 3.14 cm) y al 20% (85.17 ± 1.85 cm) en comparación con la altura evaluada antes de los tratamientos. Mientras que la altura de las plantas sin regar estadísticamente tuvo valores similares a lo largo de todo el experimento, esto indica que la falta de agua limitó el crecimiento en altura de las plantas (Fig. 7). En la acumulación de biomasa de raíz, hoja y tallo (Fig. 8) y biomasa total (Fig. 9) la tendencia fue muy similar a lo que se observó en la altura.

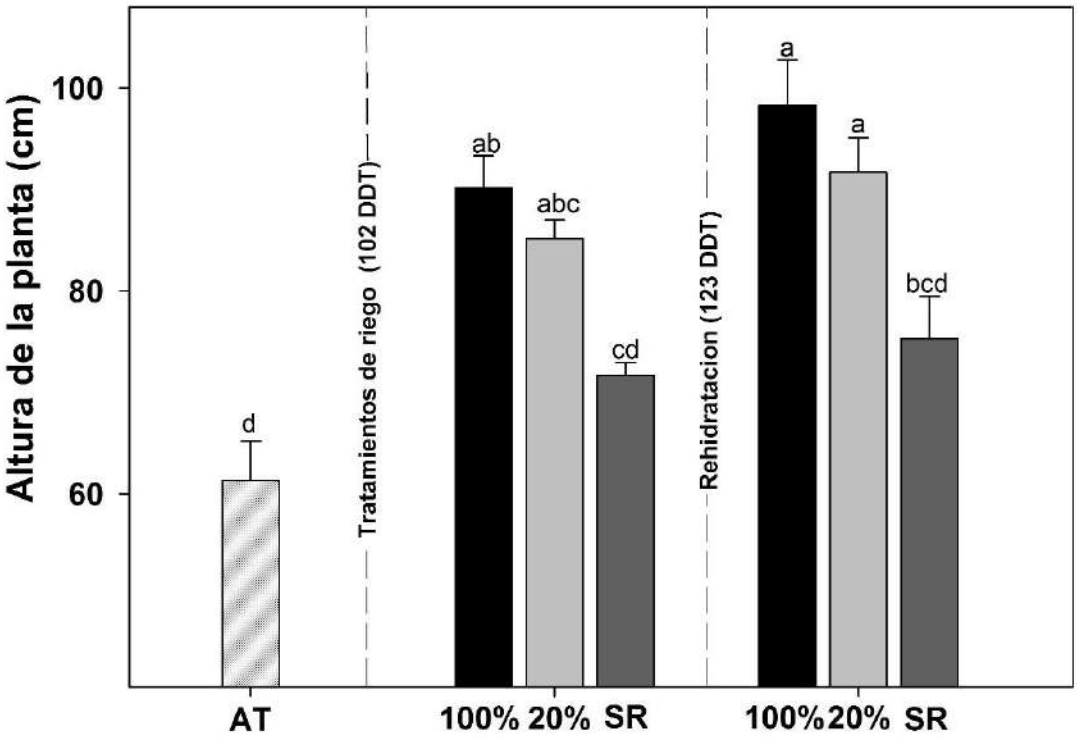



Figura 7. Altura de plantas de *S. rebaudiana* sometidas a tratamientos de restricción hídrica. AT = antes de los tratamientos; 100% = Riego al 100%; 20% = riego al 20%; SR = Sin riego. Los datos son medias ± EE. Diferentes literales representan diferencias estadísticamente significativas (Tukey, α=0.05). n=6.

El estrés hídrico afecta el crecimiento de la planta al tener una relación directa con la restricción fotosintética afectando la energía destinada hacia la ganancia de biomasa de la planta, esto se puede comprobar con las plantas sin riego que no tuvieron un aumento significativo en la ganancia de biomasa seca de raíz, tallo y hoja en comparación con el estado de las plantas antes del inicio de los tratamientos (Fig.11). En el caso de los tratamientos de riego al 100% y 20% se observó un aumento en la biomasa seca de los

órganos de la planta durante la realización de los experimentos, con un 61.31% y 70.36% para raíz, 55.09% y 49.87% en el caso del tallo y 43.97% y 33.43% en peso de seco de hoja, respectivamente y que puede observarse de manera general en la biomasa total de los grupos de plantas (Fig. 11); estos datos coinciden con los encontrados por Karimi *et al*. 2014, donde la disminución en la humedad del sustrato en plantas de estevia provocó valores bajos en la altura, y el peso seco de la hoja. Durante la etapa de rehidratación esta relación se mantuvo, con esto se observó la lenta recuperación en ganancia de biomasa por parte de las plantas de estevia después de estar sometidas a estrés hídrico. La principal causa de la disminución del crecimiento en las plantas está relacionada con las reducciones en el balance de carbono durante el estrés hídrico y este a su vez está ampliamente ligado con la fotosíntesis (Flexas *et al*. 2009). Este efecto se observa en el caso de la estevia donde la ganancia de biomasa disminuye con relación a la falta de agua en el suelo.

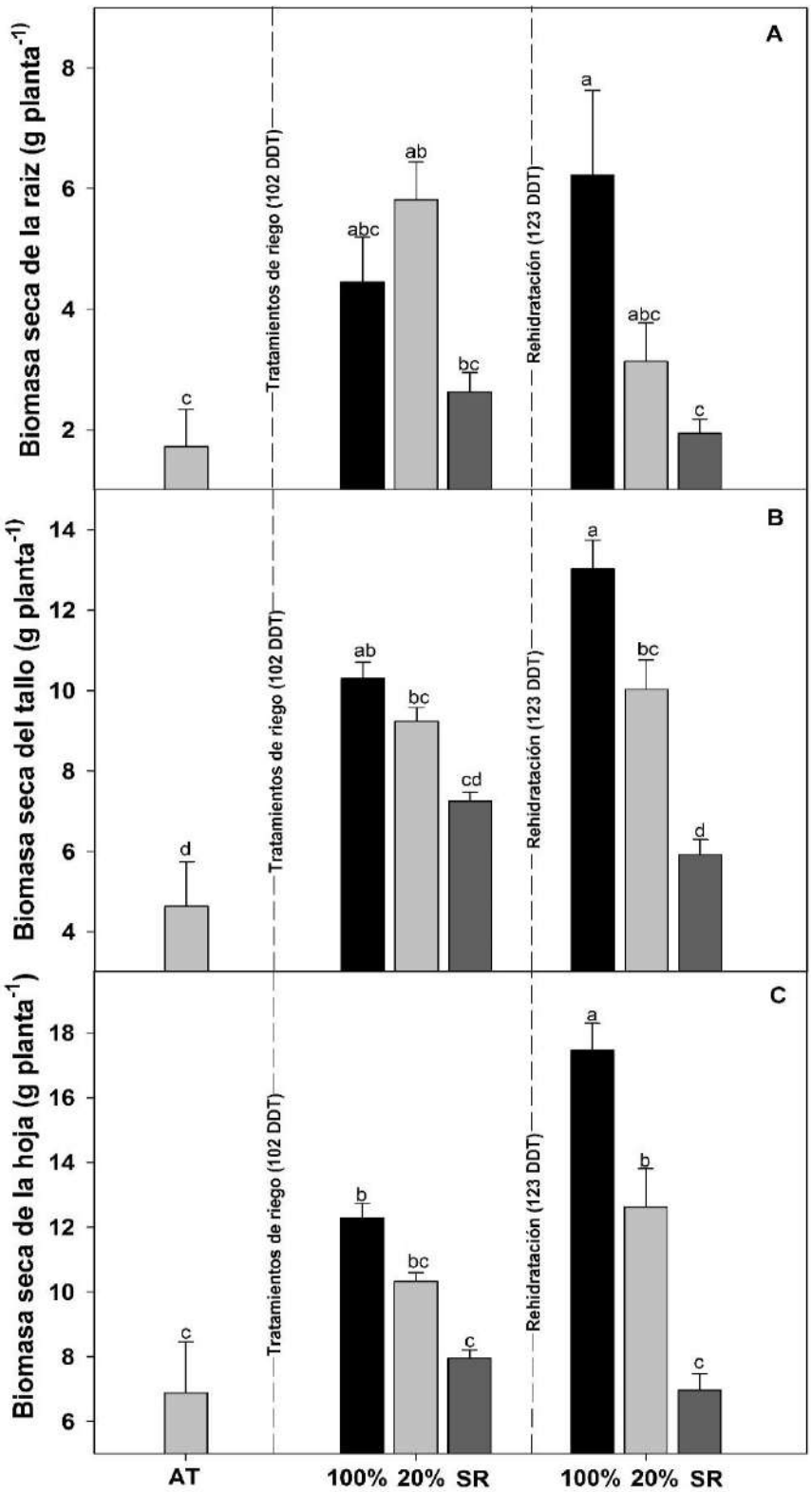



Figura 8. (A) Biomasa seca de la raíz, (B) Biomasa seca del tallo y (C) Biomasa seca de la hoja en plantas de *S. rebaudiana* sometidas a tratamientos de restricción hídrica. AT = antes de los tratamientos; 100% = Riego al 100%; 20% = riego al 20%; SR = Sin riego. Los datos son medias ± EE. Diferentes literales representan diferencias estadísticamente significativas (Tukey, α=0.05). n=6.

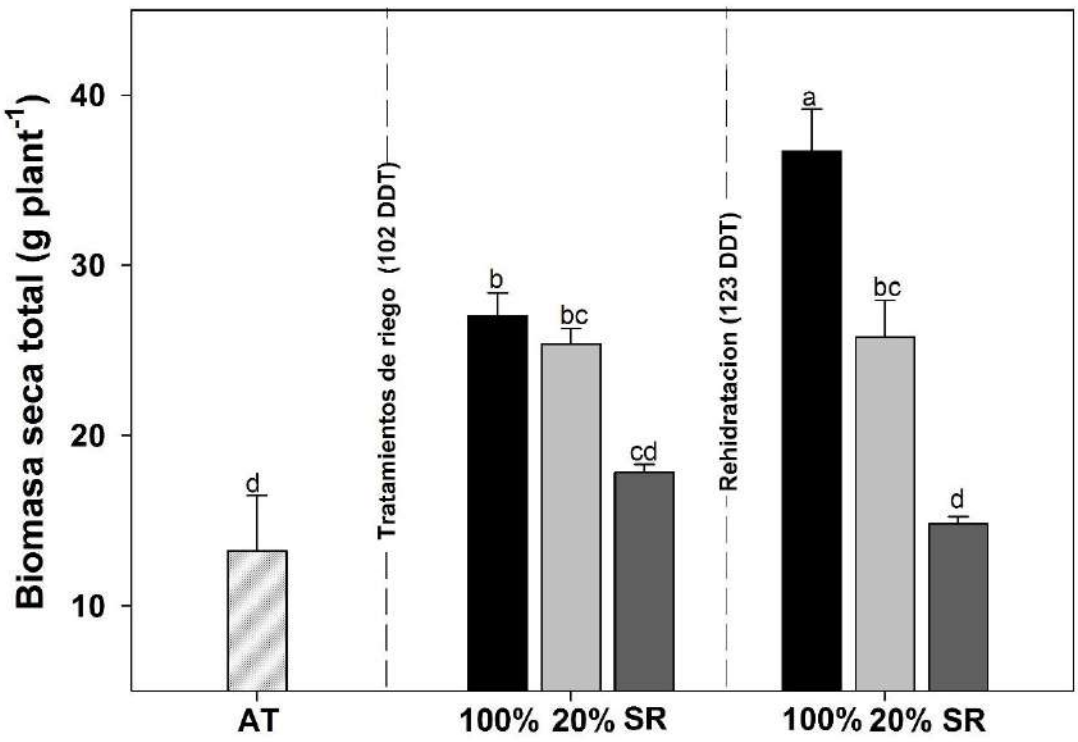



Figura 9. Biomasa seca total en plantas de *S. rebaudiana* sometidas a tratamientos de restricción hídrica. AT = antes de los tratamientos; 100% = Riego al 100%; 20% = riego al 20%; SR = Sin riego. Los datos son medias ± EE. Diferentes literales representan diferencias estadísticamente significativas (Tukey, α=0.05). n=6.

El área foliar en las plantas de estevia no presentó un aumento significativo durante los tratamientos en comparación con las plantas antes de los tratamientos, sin embargo, después de la rehidratación se observó un aumento significativo (56.22%) en el tratamiento con riego al 100%, en las plantas con riego al 20% la diferencia fue de 65.91%, mientras que en las plantas sin riego no se observó un aumento en el área de las hojas (Fig. 10). En el área foliar especifica no se observaron diferencias significativas en los tratamientos de riego 100% y 20% durante el experimento; sin embargo, en las plantas sometidas a estrés hídrico aumentó significativamente el AFE después de la rehidratación. Esto se puede deber a la capacidad de las plantas de estevia de recuperarse después de haber sido sometidas a estrés hídrico, ya que especies de plantas con un alto valor de AFE están relacionadas con su capacidad de adquisición de recursos, consumo de $CO_2$ y en consecuencia una alta tasa fotosintética, indicando la velocidad a la que esta especie administra sus recursos para poder recuperar sus funciones normales y poder sobrevivir (Marron *et al*. 2003).

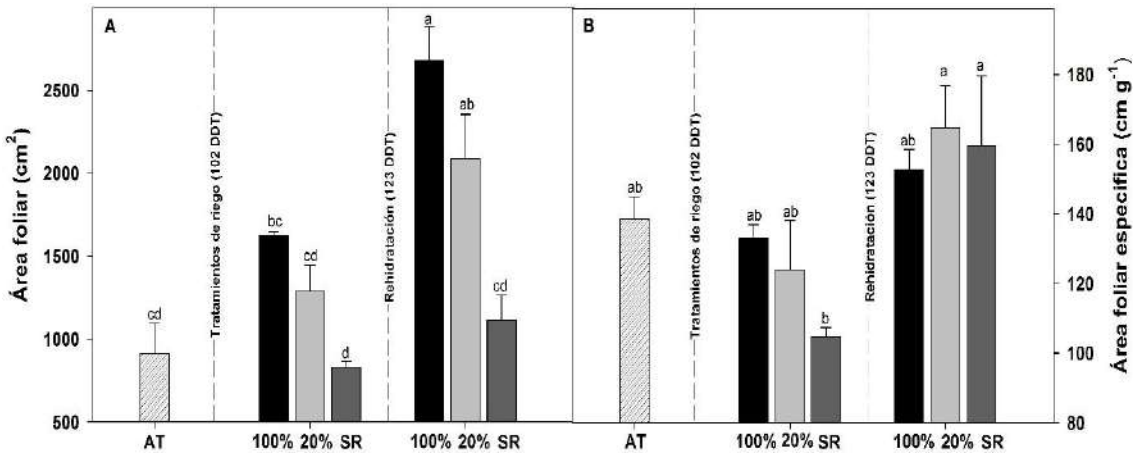



Figura 10. (A) Área foliar y (B) Área foliar específica en plantas de *S. rebaudiana* sometidas a tratamientos de restricción hídrica. AT = antes de los tratamientos; 100% = Riego al 100%; 20% = riego al 20%; SR = Sin riego. Los datos son medias ± EE. Diferentes literales representan diferencias estadísticamente significativas (Tukey, α=0.05). n=6.

### 2.4.3. Contenido de esteviosidos

Los tratamientos de riego no modificaron estadísticamente el contenido de los glucósidos, durante el experimento, los valores de estevíósido (EST) y rebaudiosido A (REB A) se mantuvieron entre 40 y 60 mg/g de peso seco para ambos, respectivamente, esto difiere a lo reportado por Karimi *et al*. (2015), quienes encontraron que la cantidad de REB A disminuye cuando el estrés hídrico se hace más severo (Fig. 11). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que el estrés hídrico modifica la relación EST/REB A. En este sentido, otros autores (Londhe y Nanaware, 2013; Chester *et* al. 2012; Jaitak et al. 2008) reportaron una relación EST/REB A menor que la encontrada en este trabajo. De este modo, los productores no solo pueden considerar un manejo del riego en función de la reducción de costos, sino que podría mejorar el sabor de las hojas al contener una mayor cantidad del REB A que es el glucósido de esteviol con el sabor más agradable para su consumo y el más dulce de todos (Hellfritsch *et al*. 2012; Abou-Arab *et al*. 2010).

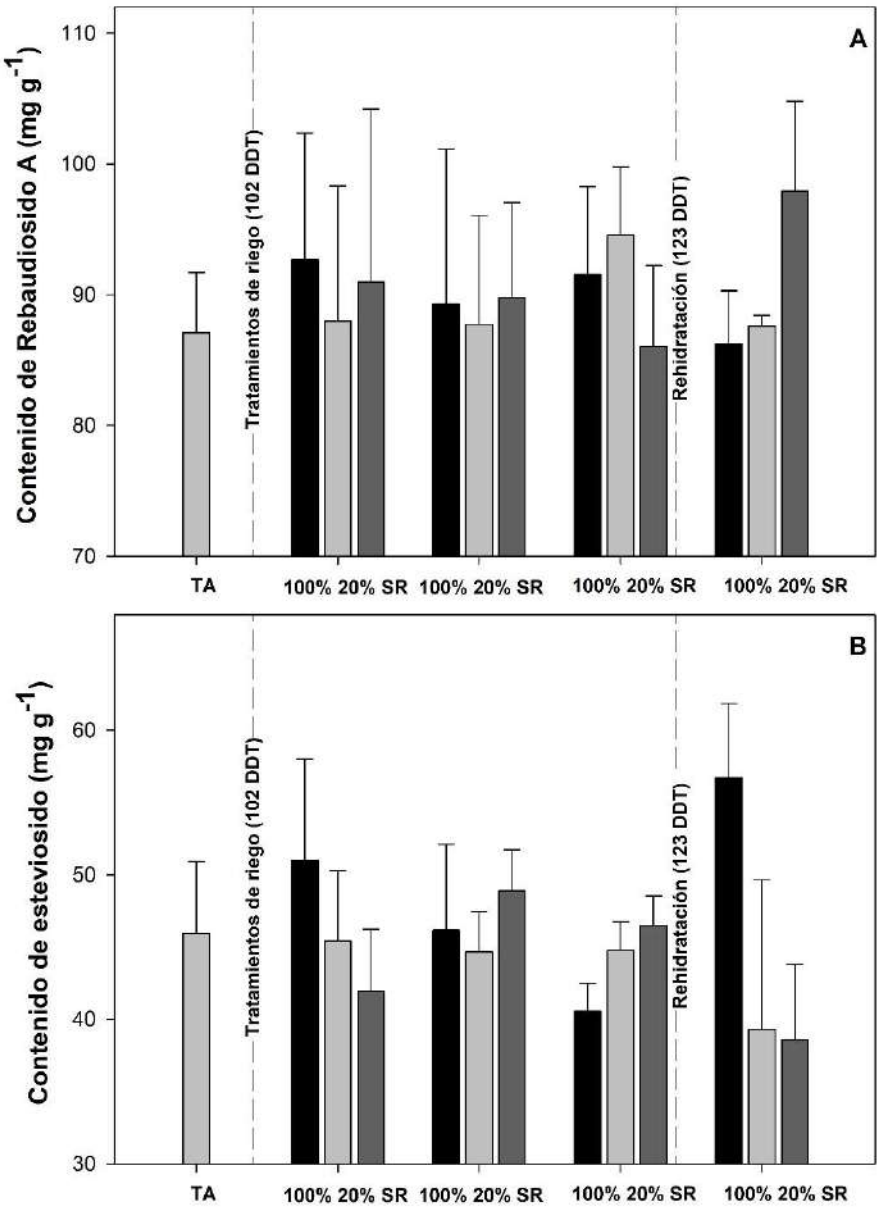



Figura 11. Contenido de esteviósidos en hojas de plantas de S. rebaudiana sometidas a tratamientos de restricción hídrica. A) contenido de Rebaudiosido A; B) contenido de esteviosido. AT = antes de los tratamientos; 100% = Riego al 100%; 20% = riego al 20%; SR = Sin riego. Los datos son medias ± EE.

## 2.5 CONCLUSIONES

La respuesta de las plantas de *S. rebaudiana* Bert. a una disminución en la disponibilidad de agua, limita e incluso suprime algunas de las actividades fisiológicas de la fotosíntesis que están íntimamente relacionadas con el consumo de agua. Las plantas que permanecieron sin regar durante tres semanas sufrieron una disminución en sus actividades fotoquímicas, sin embargo, demostraron la capacidad de resistir al estrés distribuyendo eficientemente la energía lumínica en las vías de fluorescencia (Fm/Fv), coeficiente de extinción no fotoquímico (NFQ) y el coeficiente de extinción fotoquímico (qP), lo cual se reflejó en el rendimiento cuántico del fotosistema II (ΦII) y la tasa de transporte de electrones (TTE). La falta de agua limitó la tasa de asimilación neta de $CO_2$ ($A_N$) y permitió la fotorrespiración, esto incrementó la acumulación del $CO_2$ intercelular. Sin embargo, al rehidratar las plantas de estevia recuperan sus actividades fotosintéticas, en contraste la recuperación no fue tan rápida en los parámetros de crecimiento. Estos resultados demuestran la alta plasticidad fisiológica de esta especie al recuperarse de un estrés abiótico como la falta de agua. En las hojas de estevia la cantidad de glucósidos de esteviol no cambió significativamente entre tratamientos, pero si se modificó la relación EST/REB A, los dos glucósidos más abundantes en las hojas, esto podría utilizarse en la planeación del riego por parte de los productores de este cultivo.

## 2.6 LITERATURA CITADA


Abou-Arab A. E., Abou-Arab A. A. and Abu-Salem M. F. (2010). Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from Stevia rebaudiana Bertoni plant. African Journal of Food Science. 4. (5). 269- 281

Ati , A. S., Iyada, A. D. & Najim. S. M. (2012). Water use efficiency of potato (*Solanum tuberosum* L.) under different irrigation methods and potassium fertilizer rates. *Annals of Agricultural Science*. 57 (2). 99–103. http://dx.doi.org/10.1016/j.aoas.2012.08.002

Barbet-Massin C., Giuliano S., Alletto L., Daydé J., & Berger M. (2015). Nitrogen Limitation Alters Biomass Production but Enhances Steviol Glycoside Concentration in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *PLoS ONE*. 10 (7): doi:10.1371/journal. pone.0133067

Blum, A. (2009). Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. *Field Crops Research*. 112. 119–123

Braatne, I.H., Hinckley T.M. & Stettler R.F. (1992). Influence of soil water on the physiological and morphological components of plant water balance in *Populus trichocarpa*, *Populus deltoides* and their f1 hybrids. *Tree Physiology*. 11. 325–339.

Berni, J. A. J., Zarco-Tejada, P. J., Sepulcre-Cantó G., Fereres, E. & Villalobos, F. J. (2009). Estimación de conductancia estomática y detección de estrés hídrico en vegetación mediante imágenes térmicas de alta resolución espacial obtenidas con un vehículo aéreo no tripulado (uav). Teledetección: Agua y desarrollo sostenible. XIII Congreso de la Sociedad Española de Teledeteccion. Editores: Salomón Montecinos Aranda y Laura Fernández Fornos. Calatayud. 25-28.

Campos H., Trejo C., Pena-Valdivia C. B., García-Navab R., Conde-Martínez F. V. & Cruz-Ortega M.R. (2014). Stomatal and non-stomatal limitations of bell pepper (Capsicum annuum L.) plants under water stress and re-watering: Delayed restoration of photosynthesis during recovery. Environmental and Experimental Botany. 98. http://dx.doi.org/10.1016.envexpbot.2013.10.015

Chaves, M. M., & Oliveira, M. M. (2004). Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture . *Journal of Experimental Botany*. 55 (407). 2365-2384. DOI: https://doi.org/10.1093/jxb/erh269

Chester K., Tamboli E. T., Singh M., Ahmad S. (2012). Simultaneous quantification of stevioside and rebaudioside A in different stevia samples collected from the Indian subcontinent. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences. 4. (4). 276-281.

Flexas, J., Bota, J., Galmés, J., Medrano, H. & Ribas-Carbó, M. (2006). Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiologia Plantarum*. 127. 343–352. doi: 10.1111/j.1399-3054.2005.00621.x

Genty, B., Briantais, J. M. & Baker J. M. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta*. 990. 87–92.

Hellfritsch C., Brockhoff A., Stahler F., Meyerhof W. and Hofmann T. (2012). Human Psychometric and Taste Receptor Responses to Steviol Glycosides. J. Agric. Food Chem. 60. 6782−6793 dx.doi.org/10.1021/jf301297n

Jaitak, V., Gupta, A.P., Kaul, V.K. & Ahuja, P.S. (2008). Validated high-performance thin-layer chromatography method for steviol glycosides in *Stevia rebaudiana*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 47. 790-794.

Karimi M., Ahmadi A., Hashemib J., Abbasi A., Tavarini S., Guglielminettic L. & Angelini L. G. (2015). The effect of soil moisture depletion on Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) grown in greenhouse conditions: Growth, steviol glycosides content, soluble sugars and total antioxidant capacity. *Scientia Horticulturae*. 183. http://dx.doi.org//10.1016/j.scienta.2014.11.001

Kozaki, A. & Takeba, G. (1996). Photorespiration protects c3 plants from photooxidation. *Nature*. 384, 557 – 560. Doi:10.1038/384557a0

Marron,N., Dreyer, E., Boudouresque, E., Delay, D., Petit, J. M., Delmotte, F. M., & Brignolas F. (2003). Impact of successive drought and re-watering cycles on growth and specific leaf area of *two Populus × Canadensis* (moench) clones, ‘dorskamp’ and ‘luisa_avanzo’. *Tree Physiology*. Heron Publishing. 23 (18). 1225–1235.

Maxwell, K. & Johnson G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany*. 51 (345). 659-668.

Metlen, K. L, Aschehoug, E. T. & Callaway, R. M. (2009). Plant behavioural ecology: dynamic plasticity in secondary metabolites. *Plant, Cell and Environment*. 32. 641–653. doi: 10.1111/j.1365-3040.2008.01910.x

Morlock, G. E., Meyer, S., Zimmermann, B. F. & Roussel J. M. (2014). High-performance thin-layer chromatography analysis of steviol glycosides in Stevia formulations and sugar-free food products, and benchmarking with (ultra) high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1350. 102–111. http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.016

Mosquera–Sánchez, L. P., Riaño-Herrera, N. M., Arcila-Pulgarín, J. & Ponce-Dávila C. A. (1999) fotosíntesis, respiración y fotorrespiración en hojas de café Coffea sp. *Cenicafé*. 50(3). 215-221.

Pérez-Gutiérrez A., Garruña R., Vázquez P., Latournerie-Moreno L., Andrade J. L. and Us-Santamaría R. (2017). Growth, phenology and chlorophyll fluorescence of habanero pepper (Capsicum chinense Jacq.) under water stress conditions. Acta Agronómica. 66 (2). 214-220. doi: http://dx.doi.org/10.15446/acag.v66n2.55897

Phimchan P., Techawongstien, S., Chanthai,S., & Bosland, P. W. (2012). Impact of Drought Stress on the Accumulation of Capsaicinoids in Capsicum Cultivars with Different Initial Capsaicinoid Levels. HORTSCIENCE. 47(9).

Portsmuth A. and Niinemets Ü. (2007). Structural and physiological plasticity in response to light and nutrients in five temperate deciduous woody species of contrasting shade tolerance. Functional Ecology. (21). 61–77. Doi: 10.1111/j.1365-2435.2006.01208.x

Ramakrishna, A. & Ravishankar G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal Behavior*. 6 (11). 1720–1731. Doi: 10.4161/psb.6.11.17613

Salgado-Cordero L. E. (2013). Requerimento de nitrógeno en la producción de *Stevia rebaudiana* Bertoni en hidroponía e invernadero. Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias. Consejero: Dr. Gabriel Alcántar Gonzáles. *Colegio de Postgraduados*. 60 p.

Xu, Z. & Zhou, G. (2008). Responses of leaf stomatal density to water status and its

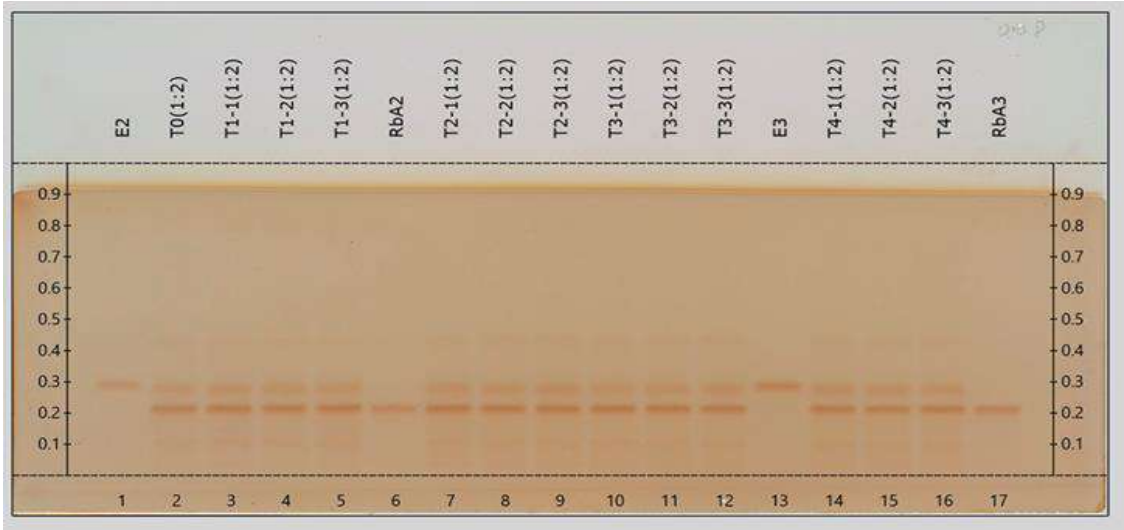
relationship with photosynthesis in a grass. *Journal of Experimental Botany*. 59 (12) pp. 3317–3325. doi:10.1093/jxb/ern185

Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 53. 247–273.

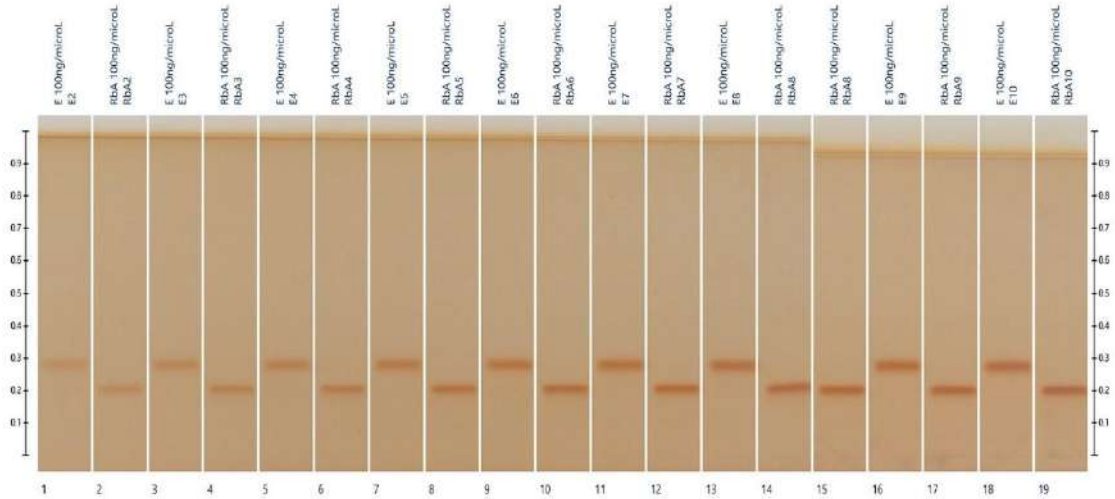
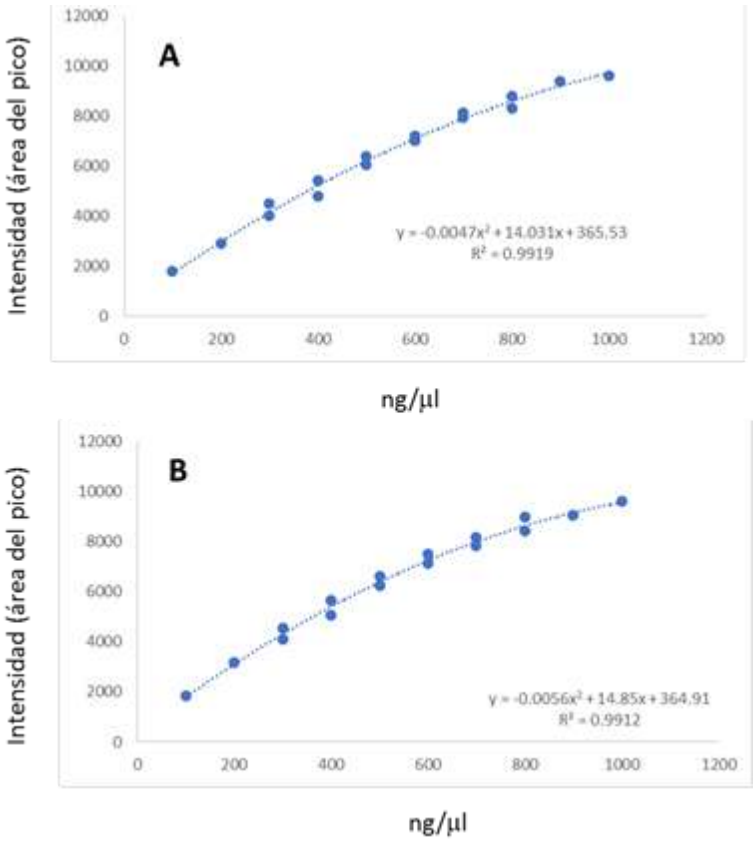
# III. ANEXOS

## 3.1 CAPITULO II

Anexo 1. Separación de metabolitos en extractos de hoja de estevia sometidos a los diferentes tratamientos de riego. Carriles: 1, estándar de esteviósido; 2, plantas previo al inicio de los tratamientos; 3, 4, 5 tratamientos (Riego al 100%, control, estrés medio y estrés severo) en la primer semana del muestreo (T1); 6, estándar de rebaudiosido A; 7, 8, 9, repeticiones de los tratamientos (Riego al 100%, control, estrés medio y estrés severo) en la segunda semana de los tratamientos; 10, 11, 12, repeticiones de los tratamientos en la tercer semana (T3); 13, estándar de esteveósido; 14, 15, 16, repeticiones de la última semana de los tratamientos, la semana de rehidratación (T4); 17, estándar de rebaudiosido A.



Anexo 2. Placa cromatográfica de la curva de calibración de esteviósidos. Carriles 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 16 y 18 corresponden al esteviósido; carriles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 17, 19 corresponden al rebaudiosido A. Las cantidades cargadas en la placa aumentaron gradualmente en 100 unidades desde 100 (carriles 1 y 2) a 1000 (carriles 18 y 19) ng/µl.



Anexo 3. Curva de calibración de esteviósidos elaboradas por densitometría *in situ* a partir de las placas cromatográficas. A esteviósido; B rebaudiosido A.