

Growth and secondary metabolites of *Stevia pilosa* Lag. in three edaphoclimatic conditions in the state of Hidalgo, Mexico

Crecimiento y metabolitos secundarios de *Stevia pilosa* Lag. en tres condiciones edafoclimáticas en el estado de Hidalgo, México

José C. Romero-Figueroa¹; Ma. de las Nieves Rodríguez-Mendoza^{1*};
Ma. del Carmen Gutiérrez-Castorena¹; José A. S. Escalante-Estrada¹;
Cecilia B. Peña-Valdivia¹; José A. Cueto-Wong²

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. km 36.5 carretera México-Texcoco. C. P. 56230. Montecillo, Texcoco, Estado de México.

²Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Relación Agua, Suelo, Planta, Atmósfera. km 6.5 margen derecha Canal de Sacramento. C. P. 35140. Gómez Palacio, Durango, México.

*Corresponding author: marinie@colpos.mx; tel.: +52 595 952 0200 ext. 1262.

Abstract

Introduction: The distribution of *Stevia pilosa* Lag. and its metabolite content with therapeutic properties have been documented; however, there are no reports of *in situ* development and factors influencing plant growth.

Objective: To quantify the growth and phytochemical and nutrient content of *S. pilosa* plants *in situ* under three edaphoclimatic conditions in the state of Hidalgo, Mexico.

Materials and methods: At the three sites called Huasca de Ocampo (HO), Mineral del Chico (MCh) and Mineral del Monte (MM), with different climates, soil types and elevation ranges, soil was collected and three plant samplings were carried out to follow the development of the species.

Results and discussion: The number of plants varied according to the sampling sites, being higher in MCh (12 plants·m²). Growth rate and leaf area were directly related. In MCh and MM plants, net photosynthesis only supplied the demand in the first two samplings, where there was significant accumulation ($P \leq 0.05$) of matter, while in HO it supplied all the samplings. MCh and HO plants had a higher nutrient concentration ($P \leq 0.05$). MCh and MM plants showed a higher concentration of phenols and flavonoids, and HO plants stood out in total terpenes.

Conclusions: The edaphoclimatic conditions at the three sites in the state of Hidalgo modified the presence, form of growth and development of *S. pilosa*.

Resumen

Introducción: La distribución de *Stevia pilosa* Lag. y su contenido de metabolitos con propiedades terapéuticas se han documentado; sin embargo, no hay reportes del desarrollo *in situ* y de los factores que influyen en el crecimiento de la planta.

Objetivo: Cuantificar el crecimiento, contenido fitoquímico y nutrimental de plantas de *S. pilosa* *in situ* bajo tres condiciones edafoclimáticas del estado de Hidalgo, México.

Materiales y métodos: En los sitios denominados Huasca de Ocampo (HO), Mineral del Chico (MCh) y Mineral del Monte (MM), con clima, suelo y altitud diferentes, se colectó suelo y se hicieron tres muestreos de plantas para dar seguimiento al desarrollo de la especie. En el último muestreo se cuantificó la concentración nutrimental y fitoquímica.

Resultados y discusión: La cantidad de plantas varió en función de los sitios de muestreo, siendo mayor en MCh (12 plantas·m²). La tasa de crecimiento y el área foliar se relacionaron directamente. En plantas de MCh y MM, la fotosíntesis neta solo abasteció la demanda en los dos primeros muestreos, donde hubo acumulación significativa ($P \leq 0.05$) de materia, mientras que en HO abasteció todos los muestreos. Las plantas de MCh y HO tuvieron mayor concentración nutrimental ($P \leq 0.05$). Las plantas de MCh y MM presentaron mayor concentración de fenoles y flavonoides, y las de HO sobresalieron en terpenos totales.

Conclusiones: Las condiciones edafoclimáticas en los tres sitios del estado de Hidalgo modificaron la presencia, forma de crecimiento y desarrollo de *S. pilosa*.

Keywords:

in situ development; Mineral del Chico; growth rates; nutrient concentration; terpenes.

Palabras clave:

desarrollo *in situ*; Mineral del Chico; índices de crecimiento; concentración nutrimental; terpenos.

Introduction

The genus *Stevia* has 116 species in Mexico, of which 107 are endemic (Villagómez-Flores, Hinojosa-Espinosa, & Villaseñor, 2018). Of these, *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni is the most studied for its sweetening properties (Goyal, Samsher, & Goyal, 2010), while *Stevia pilosa* Lag. is used as an ornament and in herbalism for its pharmaceutical potential (Villavicencio & Pérez, 2006). Some species of *Stevia* have been collected and analyzed to identify their compounds (Álvarez et al., 2005; García & Pereda, 2002; Hernández, Catalan, & Joseph-Nathan, 1998) and some properties of the soil and climate where they grow.

Edaphoclimatic information on the places where *S. pilosa* grows is scarce. Some reports indicate that this plant is found at elevations between 2300 and 4000 m, with rainfall between 700 and 1200 mm per year (Calderón & Rzedowski, 2005), or between 1800 and 3200 m with flowering from June to October (Villagómez-Flores et al., 2018). Soejima et al. (2017) indicate that the species grows in *Pinus* and *Quercus* forests and at sites with an accumulation of organic matter on the surface horizon and with varying degrees of decomposition. Unlike *S. pilosa*, there are many studies on *S. rebaudiana* that show that the geographic area of growth influences the nutrient concentration and quality of steviosides (Khiraoui et al., 2017). The characteristic physiology of the genus *Stevia* allows the plant to adapt easily to changes in climate and habitat. Jarma, Rengifo, and Araméndiz-Tatis (2006) evaluated the response of *Stevia* to radiation levels according to the site and found differences in plant size and flower development.

The species *S. pilosa* grows wild in Hidalgo, Mexico (Calderón & Rzedowski, 2005). This state is characterized by tropical, temperate and dry climates, and elevations of 100 to 3000 m, due to the presence of three physiographic provinces (Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI], 2015). This means that *S. pilosa* has adapted to different soil-environmental conditions (Molina, Galván, Patiño, & Fernández, 2012), due to which growth, metabolite concentration, and nutrient content are believed to be different.

The efficiency of a plant for tissue production as a function of time can be measured through growth indices (Azarpour, Moraditochae, & Bozorgi, 2014). This information enables quantifying the demand of any organ, *in situ* photosynthetic activity and its relationship to dry matter production (Hunt, 2017). Jarma, Combatt, and Cleves (2010) indicated that the concentration of macro and micro elements determines the quality of *Stevia*; therefore, it is also important to evaluate the nutrient content under different environmental conditions.

Introducción

El género *Stevia* tiene 116 especies en México, de las cuales 107 son endémicas, (Villagómez-Flores, Hinojosa-Espinosa, & Villaseñor, 2018). De estas, *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni es la más estudiada por sus propiedades edulcorantes (Goyal, Samsher, & Goyal, 2010), mientras que *Stevia pilosa* Lag. es utilizada como ornato y en la herbolaria por su potencial farmacéutico (Villavicencio & Pérez, 2006). Algunas especies de *Stevia* se han colectado y analizado para identificar sus compuestos (Álvarez et al., 2005; García & Pereda, 2002; Hernández, Catalan, & Joseph-Nathan, 1998) y algunas propiedades del suelo y clima donde crecen.

La información edafoclimática del lugar donde *S. pilosa* se desarrolla es escasa. Algunos reportes indican que esta planta se encuentra en altitudes entre 2300 y 4000 m, y precipitaciones entre 700 y 1200 mm anuales (Calderón & Rzedowski, 2005) o bien entre 1800 y 3200 m con floración de junio a octubre (Villagómez-Flores et al., 2018). Soejima et al. (2017) indican que la especie crece en bosques de *Pinus* y *Quercus* y en sitios con acumulación de materia orgánica en el horizonte superficial y con diferentes grados de descomposición. A diferencia de *S. pilosa*, son múltiples los estudios de *S. rebaudiana* que demuestran que la zona geográfica de crecimiento influye en la concentración nutricional y calidad de los esteviosidos (Khiraoui et al., 2017). La fisiología característica del género *Stevia* permite que la planta se adapte fácilmente a cambios de clima y hábitats. Jarma, Rengifo, y Araméndiz-Tatis (2006) evaluaron la respuesta de *Stevia* a niveles de radiación de acuerdo con el sitio y encontraron diferencias en el tamaño de la planta y en el desarrollo floral.

La especie *S. pilosa* crece en forma silvestre en Hidalgo, México (Calderón & Rzedowski, 2005). Esta entidad se caracteriza por tener climas tropicales, templados y secos, y altitudes de 100 a 3000 m, debido a la presencia de tres provincias fisiográficas (Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI], 2015). Esto significa que *S. pilosa* se ha adaptado a condiciones edafambientales distintas (Molina, Galván, Patiño, & Fernández, 2012), debido a ello, se cree que el crecimiento, concentración de metabolitos y contenido nutricional son diferentes.

La eficiencia de una planta para la producción de tejido en función del tiempo se puede medir a través de índices de crecimiento (Azarpour, Moraditochae, & Bozorgi, 2014). Con esta información es posible cuantificar la demanda de cualquier órgano, actividad fotosintética *in situ* y su relación con la producción de materia seca (Hunt, 2017). Jarma, Combatt, y Cleves (2010) indicaron que la concentración de macro y microelementos determinan la calidad de *Stevia*; por tanto, también es importante la evaluación del contenido nutricional bajo condiciones ambientales distintas.

The objective of the present research was to quantify the growth and phytochemical and nutrient content of *S. pilosa* plants *in situ* under three soil-environmental conditions in the state of Hidalgo, Mexico.

Materials and methods

Based on the publication “Flora fanerogámica del Valle de México” (Calderón & Rzedowski, 2005), field visits and interviews with producers about *S. pilosa*, three locations in the state of Hidalgo with different soil types and environmental conditions were selected: Huasca de Ocampo (HO), Mineral del Chico (MCh) and Mineral del Monte (MM) (Table 1).

At each site, three samples composed of soil from the surface horizon were collected for analysis of the following soil properties: texture (pipette), pH (1:1 water:soil), cation exchange capacity (ammonium acetate), organic matter (Walkley and Black), nitrogen (Kjeldahl), soluble phosphates (Olsen), bulk density (clod and paraffin), base saturation (%) and organic carbon (Van Reeuwijk, 2002).

At each site, eight *S. pilosa* plants were collected at 20, 52, 82 and 110 days after soil sampling and plant height, stem diameter and leaf number were determined. The plant material was dried in an oven (Blue Island, model BLUE M, Illinois, USA) with air circulation at 47 °C for 96 h. Subsequently, an analytical balance (ADAM

El objetivo de la presente investigación fue cuantificar el crecimiento, contenido fitoquímico y nutrimental de plantas de *S. pilosa in situ* bajo tres condiciones edafoambientales del estado de Hidalgo, México.

Materiales y métodos

A partir de la publicación de “Flora fanerogámica del Valle de México” (Calderón & Rzedowski, 2005), de recorridos de campo y entrevistas a productores sobre *S. pilosa*, se seleccionaron tres localidades del estado de Hidalgo con tipo de suelo y condiciones ambientales diferentes: Huasca de Ocampo (HO), Mineral del Chico (MCh) y Mineral del Monte (MM) (Cuadro 1).

En cada sitio se colectaron tres muestras compuestas de suelo del horizonte superficial para el análisis de las propiedades edáficas siguientes: textura (pipeta), pH (1:1 agua:suelo), capacidad de intercambio catiónico (acetato de amonio), materia orgánica (Walkley y Black), nitrógeno (Kjeldahl), fosfatos solubles (Olsen), densidad aparente (terrón y parafina), saturación de bases (%) y carbón orgánico (Van Reeuwijk, 2002).

En cada sitio se colectaron ocho plantas de *S. pilosa* a los 20, 52, 82 y 110 días después del muestreo de suelo y se determinaron la altura de planta, diámetro del tallo y número de hojas. El material vegetal se secó en una estufa (Blue Island, modelo BLUE M, Illinois, USA) con circulación de aire a 47 °C durante 96 h. Posteriormente, se utilizó una balanza analítica (ADAM EQUIPMENT®,

Table 1. Characteristics of *Stevia pilosa* collection sites in the state of Hidalgo, Mexico.
Cuadro 1. Características de los sitios de recolecta de *Stevia pilosa* en Hidalgo, México.

Element/Elemento	Huasca de Ocampo	Mineral del Chico	Mineral del Monte
Elevation (m)/Altitud (m)	2204	2509	2822
Latitude/Latitud	20° 10' 29" N	20° 14' 40.7" N	20° 08' 44" N
Longitude/Longitud	98° 33' 31" W	98° 46' 08.6" W	98° 41' 06" W
Temperature (°C, max-min)/ Temperatura (°C, máx-mín)	22.6 - 4.0	20.9 - 8.7	18.5 - 7.5
Rainfall (mm)/ Precipitación (mm)	856.2	1427.8	870.7
Evaporation (mm)/ Evaporación (mm)	1253.4	131.5	1137.9
Fog (days)/Niebla (días)	0.7	69.40	62.2
Vegetation/Vegetación	<i>Pinus patula</i> , <i>P. teocote</i> , <i>P. michoacana</i> , <i>Quercus</i> <i>crassifolia</i> and <i>Q. rugosa</i>	<i>P. teocote</i> , <i>Abies religiosa</i> , <i>Juniperus monosperma</i> and <i>Q. rugosa</i>	<i>Pinus montezumae</i> , <i>Q. rugosa</i> , <i>A. religiosa</i> and <i>Juniperus monticola</i>

Source: Servicio Meteorológico Nacional (2010).

Fuente: Servicio Meteorológico Nacional (2010).

EQUIPMENT®, model PW254) was used to obtain the dry weight of leaves and stem. Leaf area was measured with a camera (Samsung, semi-professional model WB1100F) with the methodology proposed by Rincón, Olarte, and Pérez (2012). With the values obtained, the following indices were calculated: Relative Growth Rate ($RGR = \ln DW_2 - \ln DW_1 / T_2 - T_1$), Net Assimilation Rate [$NAR = (DW_2 - DW_1) / (LA_2 - LA_1) (\ln LA_2 - \ln LA_1 / T_2 - T_1)$], Specific Leaf Area ($SLA = LA / LDW$) and Leaf Area Ratio ($LAR = LA / LSW$); where \ln = natural logarithm, T_1 = time 1, T_2 = time 2, DW = dry weight, LA = leaf area, LDW = leaf dry weight and LSW = leaf and stem weight (Hunt, 2017; Nassi, Roncucci, Triana, Tozzini, & Bonari, 2011).

In the last sampling, in addition to the aforementioned determinations, nutrient analysis of the plants was made and the concentration of macroelements (P, K, Ca, Mg and S) and microelements (Fe, Zn, Mn, Co, Cu, Ni, Na and B) was quantified by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-OES, Varian®, model 725-ES). Total N content was determined by the semi-micro Kjeldahl method (Bremner & Mulvaney, 1982). With the concentration and dry weight values, the extraction of each element per plant was calculated.

With the dry plant material, phenols were identified with the Folin-Ciocalteu reagent, flavonoids by the Shinoda reaction, and terpenes by the Liebermann-Burchard reaction (Cannon et al., 2001; Tholl, Chen, Petri, Gershenzon, & Pichersky, 2015); quantification was performed with the methods described by Waterman and Mole (1994), Chang, Yang, Wen, and Chern (2002), and Harborne (1998), respectively. Results were subjected to an analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparison test ($\alpha = 0.05$).

Results and discussion

Edaphoclimatic conditions

The three sites where *S. pilosa* grows in Hidalgo show differences in elevation, rainfall, temperature, vegetation and soil type, although they share some environmental conditions (Tables 1 and 2). MCh and MM have the same number of days with fog and poorly drained soil, while HO and MM have similar values for evaporation and rainfall. These climatic variables define the distribution areas of species, as well as their survival limits (Cabrera, 2002).

The soils where *S. pilosa* grows vary from very acid to acid, poor to moderate in organic matter, with fine and medium textures (Ortiz-Solorio, 2019), and the bulk density is low (MCh = 1.21 g·cm⁻³ and HO = 1.25 g·cm⁻³), edaphic conditions that differ from where *S. rebaudiana* grows (Goyal et al., 2010).

modelo PW254) para obtener el peso seco de hojas y tallo. El área foliar se midió con una cámara fotográfica (Samsung, semiprofesional modelo WB1100F) con la metodología propuesta por Rincón, Olarte, y Pérez (2012). Con los valores obtenidos se calcularon los índices: Tasa Relativa de Crecimiento ($TRC = \ln PS_2 - \ln PS_1 / T_2 - T_1$), Tasa de Asimilación Neta [$TAN = (PS_2 - PS_1) / (AF_2 - AF_1) (\ln AF_2 - \ln AF_1 / T_2 - T_1)$], Área Foliar Específica ($AFE = AF / PSH$) y Razón de Área Foliar ($RAF = AF / PSP$); donde \ln = logaritmo natural, T_1 = tiempo 1, T_2 = tiempo 2, PS = peso seco, AF = área foliar, PSH = peso seco de hojas y PSP = peso de hojas y tallo (Hunt, 2017; Nassi, Roncucci, Triana, Tozzini, & Bonari, 2011).

En el último muestreo, además de las determinaciones ya mencionadas, se hizo el análisis nutrimental de las plantas y se cuantificó la concentración de macroelementos (P, K, Ca, Mg y S) y microelementos (Fe, Zn, Mn, Co, Cu, Ni, Na y B) por espectroscopia de emisión atómica de inducción por plasma acoplado (ICP-OES, Varian®, modelo 725-ES). El contenido de N total se determinó por el método semimicro-Kjeldahl (Bremner & Mulvaney, 1982). Con los valores de concentración y peso seco se calculó la extracción de cada elemento por planta.

Con el material vegetal seco se identificaron fenoles con el reactivo Folin-Ciocalteu, flavonoides por la reacción de Shinoda, y terpenos por la reacción de Liebermann-Burchard (Cannon et al., 2001; Tholl, Chen, Petri, Gershenzon, & Pichersky, 2015); la cuantificación se realizó con los métodos descritos por Waterman y Mole (1994), Chang, Yang, Wen, y Chern (2002), y Harborne (1998), respectivamente. Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA) y pruebas de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Resultados y discusión

Condiciones edafoclimáticas

Los tres sitios donde *S. pilosa* crece en Hidalgo presentan diferencias en altitud, precipitación pluvial, temperatura, vegetación y tipo de suelo, aunque comparten algunas condiciones ambientales (Cuadros 1 y 2). MCh y MM tienen el mismo número de días con niebla y suelo con drenaje deficiente, mientras que HO y MM presentan valores similares en evaporación y precipitación. Estas variables climáticas definen las áreas de distribución de las especies, así como sus límites de sobrevivencia (Cabrera, 2002).

Los suelos donde *S. pilosa* crece varían de muy ácidos a ácidos, pobres a moderados en materia orgánica, con texturas finas y medias (Ortiz-Solorio, 2019), y la densidad aparente es baja (MCh = 1.21 g·cm⁻³ y

Land use and vegetation disturbance varied among sites; in MM there is logging, in MCh subsistence crops are planted and in HO there is grazing, activities that have an effect on the density and growth of *S. pilosa* plants.

Table 2 indicates that soil nutrient concentrations varied; for example, the highest values in nitrogen, cation exchange capacity and base saturation (BSP) correspond to MM, while the lowest values in phosphorus and BSP occur in HO. Soil organic matter content correlates with leaf number and dry weight of plants (Mishra & Kumar, 2016) as in MCh. Zaman, Chowdhury, and Chowdhury (2015) reported that *S. rebaudiana* grows in soils with high organic matter content, suggesting that *S. pilosa* requires less nutritional quality for growth.

The number of plants present on the sites was different and depended on the edaphoclimatic conditions. In MCh, populations of up to 12 plants per m² were found around the trees or where sunlight was filtered; in contrast, in HO, where soils had a lower nutrient content and a higher temperature and amount of light, an average of two plants per 9 m² was quantified.

According to Table 3, there are significant statistical differences ($P \leq 0.05$) in the development of *S. pilosa* depending on the sampling site, hence the importance of the ecosystem where it develops and the agronomic management of the plant (Wahid, Farooq, Hussain, Rasheed, & Galani, 2012). MCh and MM plants increased significantly in height in the first 52 days, but growth was slower between 82 and 110 days. In contrast, HO plants increased in height steadily from the first to the last day of sampling. This is reflected in the growth of 0.383 and 0.328 cm per day in MCh and MM plants, respectively, and 0.625 cm in HO plants. At that site, most days of the year are sunny and with higher temperatures than in MCh and MM,

HO = 1.25 g·cm⁻³), condiciones edáficas que difieren de donde *S. rebaudiana* se desarrolla (Goyal et al., 2010).

El uso del suelo y la perturbación de la vegetación varió entre los sitios; en MM hay tala de árboles, en MCh se siembran cultivos de subsistencia y en HO hay pastoreo, actividades que tienen efecto en la densidad y crecimiento de las plantas de *S. pilosa*.

El Cuadro 2 indica que las concentraciones nutrimentales de los suelos variaron; por ejemplo, los valores más altos en nitrógeno, capacidad de intercambio catiónico y saturación de bases (PSB) corresponden a MM; mientras que los valores más bajos en fósforo y PSB se presentan en HO. El contenido de materia orgánica en el suelo se correlaciona con la cantidad de hojas y peso seco de las plantas (Mishra & Kumar, 2016) como sucede en MCh. Zaman, Chowdhury, y Chowdhury (2015) reportaron que *S. rebaudiana* se desarrolla en suelos con alto contenido de materia orgánica, lo cual sugiere que *S. pilosa* requiere menos calidad nutrimental para su crecimiento.

La cantidad de plantas presentes en los sitios fue diferente y dependió de las condiciones edafoclimáticas. En MCh se encontraron poblaciones de hasta 12 plantas por m², alrededor de los árboles o donde se filtraba la luz solar; en contraste, en HO, donde los suelos tuvieron menor contenido nutrimental y mayor temperatura y cantidad de luz, se cuantificaron en promedio dos plantas por 9 m².

De acuerdo con el Cuadro 3, existen diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$) en el desarrollo de *S. pilosa* de acuerdo con el sitio de muestreo, de ahí la importancia del ecosistema donde se desarrolla y el manejo agronómico de la planta (Wahid, Farooq, Hussain, Rasheed, & Galani, 2012). Las plantas de MCh y MM incrementaron notablemente su altura en los primeros 52 días, pero entre los 82 y 110 días, el

Table 2. Physical and chemical characteristics of soils where *Stevia pilosa* grows in the state of Hidalgo, Mexico.
Cuadro 2. Características físicas y químicas de los suelos donde *Stevia pilosa* crece en el estado de Hidalgo, México.

Site/ Sitio	Texture/ Textura	Bd (g·cm ⁻³)/ Da (g·cm ⁻³)	pH	OC (%)/ CO (%)	OM (%)/ MO (%)	N (%)	P (mg·kg ⁻¹)	CEC (cmol ₍₊₎ ·kg ⁻¹)/ CIC (cmol ₍₊₎ ·kg ⁻¹)	PSB (%)
HO	Loam/ Limoso	1.25	4.6	0.92	1.59	0.061	7.94	18.77	11.56
MCh	Clayey/ Arcilloso	1.21	5.1	1.29	2.23	0.096	10.48	25.79	23.72
MM	Clayey/ Arcilloso	1.61	5.8	1.82	3.22	0.225	8.37	31.63	63.47

HO = Huasca de Ocampo, MCh = Mineral del Chico, MM = Mineral del monte. Bd = bulk density, OC = organic carbon, OM = organic matter, N = nitrogen, P = phosphorus, CEC = cation exchange capacity, BSP = base saturation percentage.

HO = Huasca de Ocampo, MCh = Mineral del Chico, MM = Mineral del monte. Da = densidad aparente, CO = carbono orgánico, MO = materia orgánica, N = nitrógeno, P = fósforo, CIC = capacidad de intercambio catiónico, PSB = porcentaje de saturación de bases.

Table 3. Growth variables of *Stevia pilosa* developed in three sites in the state of Hidalgo, Mexico.
Cuadro 3. Variables de crecimiento de *Stevia pilosa* desarrollada en tres sitios del estado de Hidalgo, México.

Site/Sitio	Sampling days/ Días de muestreo	PH (cm)/ AP (cm)	SD (mm)/ DT (mm)	LN/NH	LA (cm ²)/ AF (cm ²)	LDW (mg)/ PSH (mg)	SDW (mg)/ PST (mg)
Huasca de Ocampo	20	13.68	1.37	37	27.58	233.8	183.3
	52	25.59	1.77	78.13	44.62	312.2	302.8
	82	43.64	2.26	196.50	92.95	626.2	504.1
	110	72.36	2.68	366.75	182.49	914.7	1 738.1
Mineral del Chico	20	14.18	1.49	45.25	99.06	330.2	411.4
	52	34.50	2.37	224.75	197.99	740.6	840.6
	82	43.83	2.64	274.75	237.93	1 127.3	1 227.9
	110	48.71	2.90	417.25	311.50	1 347.5	1 977.1
Mineral del Monte	20	15.86	1.32	36.00	21.78	152.1	135.8
	52	27.13	1.73	81.25	40.45	244.9	210.9
	82	43.21	2.23	245.75	144.62	540.2	609.1
	110	42.45	2.53	261.75	200.88	704.3	935.8
Overall mean/ Media general		29.07	1.91	135.49	100.78	478.5	491.8
LSD/DMS		3.04	0.22	34.05	16.07	125.7	111.4
Tukey ($\alpha = 0.05$)		**	**	**	**	**	**

LSD: least significant difference. PH = plant height, SD = stem diameter, LN = leaf number, LA = leaf area, LDW = leaf dry weight, SDW = stem dry weight. DMS: diferencia mínima significativa. AP = altura de la planta, DT = diámetro del tallo, NH = número de hojas, AF = área foliar, PSH = peso seco de hojas, PST = peso seco del tallo.

where foggy days represent up to a little more than 2.5 months (Table 1). According to Hatfield and Prueger (2015), research is needed to quantify the interactions between temperature, soil moisture and species, and thus understand the possible strategies of crops for their development under different climatic conditions.

On the other hand, the stem diameter of the plants increased linearly in HO and MM, while in MCh, the highest growth (up to 40%) was recorded between 52 and 82 days. MCh plants had 15 to 47 % more leaves (small, lanceolate and thinner) and more leaf area than those of MM and HO, respectively. If the last record is analyzed (110 days), it is possible to verify that the HO leaves were much thicker (5.01 mg·cm⁻²) than those of MCh (4.32 mg·cm⁻²) and MM (3.50 mg·cm⁻²); however, the highest LDW and SDW values were obtained in MCh plants. These data show that the amount of solar radiation that the plant intercepts and uses during its development, together with moisture and nutrients, are determining factors in growth to obtain high yields (Pereira, Storck, Lopes, Martin, & Bisognin, 2016).

Physiological efficiency indices

The RGR indicates the efficiency of the plant to produce

crecimiento fue más lento. En contraste, las plantas de HO aumentaron su altura constantemente desde el primero hasta el último día de muestreo. Esto se refleja en el crecimiento de 0.383 y 0.328 cm por día en las plantas de MCh y MM, respectivamente, y de 0.625 cm en las plantas de HO. En dicho sitio, gran parte de los días del año son soleados y con temperaturas más altas que en MCh y MM, donde los días con niebla representan hasta poco más de 2.5 meses (Cuadro 1). De acuerdo con Hatfield y Prueger (2015), es necesario realizar investigaciones para cuantificar las interacciones entre la temperatura, la humedad del suelo y la especie, y así entender las posibles estrategias de los cultivos para su desarrollo bajo diferentes condiciones climáticas.

Por otra parte, el diámetro del tallo de las plantas incrementó linealmente en HO y MM; mientras que en MCh, el mayor crecimiento (hasta 40 %) se registró entre los 52 y 82 días. Las plantas de MCh tuvieron de 15 a 47 % más hojas (pequeñas, lanceoladas y más delgadas) y mayor superficie foliar que las de MM y HO, respectivamente. Si se analiza el último registro (110 días), es posible verificar que las hojas de HO fueron mucho más gruesas (5.01 mg·cm⁻²) que las de MCh (4.32 mg·cm⁻²) y MM (3.50 mg·cm⁻²); sin embargo, los valores más altos de PSH y PST se obtuvieron en

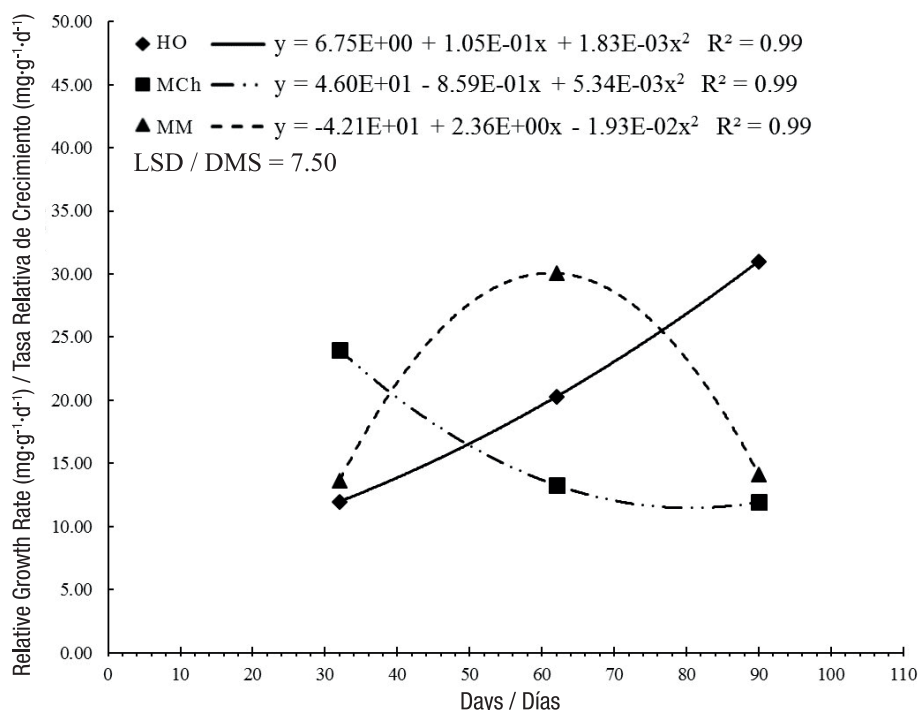


Figure 1. Relative growth rate in *Stevia pilosa* plants in Huasca de Ocampo (HO), Mineral del Chico (MCh) and Mineral del Monte (MM) in the state of Hidalgo, Mexico. LSD: Least significant difference.

Figura 1. Tasa relativa de crecimiento en plantas de *Stevia pilosa* en Huasca de Ocampo (HO), Mineral del Chico (MCh) y Mineral del Monte (MM), estado de Hidalgo, México. DMS: Diferencia mínima significativa.

biomass in a given period. Figure 1 shows that the RGR of *S. pilosa* was different at the three sites studied. In MCh, the highest values were recorded in the early sampling dates, indicating efficiency in biomass production because there were large leaves; however, at later dates, the leaves were smaller and some were senescent.

In HO and MM, *S. pilosa* grew and continued the meristematic activity in such a way that they doubled and tripled the RGR, respectively, between 32 and 62 days; stem and vegetative bud growth increased and there were new ramifications. MM plants were very efficient in producing biomass up to 60 days; afterwards, leaf size decreased. HO plants slowly produced their biomass only in the first days, then it increased notably as time passed, which was related to the presence of rainfall.

The net assimilation rate (NAR) records the speed of net photosynthesis over a period of time. Figure 2 indicates that, in the first 30 days, the highest values ($5.01 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$) were recorded in MCh, while the value was three times lower in MM and HO. This shows, indirectly, that plants are less efficient autotrophically, so their survival depends largely on root reserves. A particular case was that of HO plants, where the NAR increased in each sampling, which is directly related to leaf weight per area (cm^2) and the efficiency of the foliage in the production of photoassimilates (Morales

las plantas de MCh. Estos datos demuestran que la cantidad de radiación solar que la planta intercepta y usa durante su desarrollo, en conjunto con la humedad y nutrientes, son factores determinantes en el crecimiento para obtener altos rendimientos (Pereira, Storck, Lopes, Martin, & Bisognin, 2016).

Índices de eficiencia fisiológica

La TRC indica la eficiencia de la planta para producir biomasa en un periodo determinado. En la Figura 1 se puede apreciar que la TRC de *S. pilosa* fue diferente en los tres sitios estudiados. En MCh, los valores más altos se registraron en las primeras fechas de muestreo, lo que indica eficiencia en la producción de biomasa porque hubo hojas grandes; sin embargo, en fechas posteriores, las hojas fueron más pequeñas y algunas fueron senescentes.

En HO y MM, *S. pilosa* creció y continuó la actividad meristemática de tal forma que duplicaron y triplicaron la TRC, respectivamente, entre los 32 y 62 días; el crecimiento del tallo y yemas vegetativas incrementó y hubo nuevas ramifications. Las plantas de MM fueron muy eficientes en la producción de biomasa hasta los 60 días; posteriormente, el tamaño de las hojas disminuyó. Las plantas de HO produjeron lentamente su biomasa solo en los primeros días, después aumentó notablemente conforme el tiempo pasó, lo cual estuvo relacionado con la presencia de lluvias.

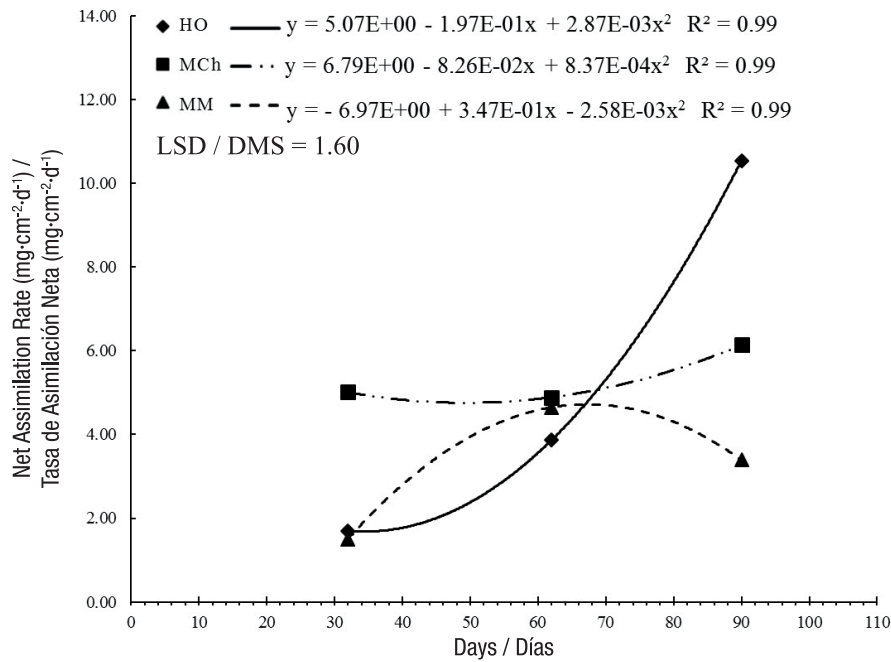


Figure 2. Net assimilation rate in *Stevia pilosa* plants during their growth in Huasca de Ocampo (HO), Mineral del Chico (MCh) and Mineral del Monte (MM) in the state of Hidalgo, Mexico. LSD: least significant difference.

Figura 2. Tasa de asimilación neta en plantas de *Stevia pilosa* durante su crecimiento en Huasca de Ocampo (HO), Mineral del Chico (MCh) y Mineral del Monte (MM) estado de Hidalgo, México. DMS: diferencia mínima significativa.

et al., 2015). In addition, there was greater exposure to direct sunlight at this site, a situation that modifies the intensity and quality of light captured by the organs that perform photosynthesis (Casierra-Posada & Peña-Olmos, 2015), which allowed for the replacement of the biomass losses, respiration and movement of photosynthates to the reproductive organs.

Plant growth and development are influenced by, among other factors, the intensity and quality of the light captured by the organs that perform photosynthesis. SLA steadily increased in the HO and MM plants. This result is related to leaf thickness and light availability, as noted by Quero et al. (2008). According to Figure 3, at 32 days, the highest values corresponded to MCh plants with $291.68 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. In HO and MM plants, SLA increased as a function of time; the second site generated the highest value ($324.25 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) in the last sampling (110 days). As SLA is the most sensitive index to environmental changes and the most prone to ontogenetics, excessive shading causes it to increase and has a negative impact on NAR (Morales et al., 2015), as observed in the present study.

Wright, Reich, and Westoby (2001) determined positive correlations between SLA, photosynthetic capacity and nutrient content, and showed that when there are high SLA rates there is less hardness in the leaves and higher nutritional quality in the plant. Information about *S. pilosa* is very scarce; however, based on the

La tasa de asimilación neta (TAN) registra la velocidad de la fotosíntesis neta en un lapso. La Figura 2 indica que, en los primeros 30 días, los valores más altos ($5.01 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$) se registraron en MCh, mientras que el valor fue tres veces menor en MM y HO. Esto muestra, en forma indirecta, que las plantas son menos eficientes autotróficamente por lo que su sobrevivencia depende en gran parte de las reservas de la raíz. Un caso particular fue el de las plantas de HO, donde la TAN incrementó en cada muestreo, lo cual está relacionado directamente con el peso de hoja por área (cm^2) y con la eficiencia del follaje en la producción de fotoasimilados (Morales et al., 2015). Además, en este sitio hubo mayor exposición a la luz directa del sol, situación que modifica la intensidad y calidad de luz captada por los órganos que realizan la fotosíntesis (Casierra-Posada & Peña-Olmos, 2015), lo cual permitió reponer las pérdidas de biomasa, respiración y movimiento de fotosintatos a los órganos reproductivos.

El crecimiento y desarrollo de un vegetal están influenciados, entre otros factores, por la intensidad y la calidad de la luz captada por los órganos que realizan la fotosíntesis. El AFE incrementó constantemente en las plantas de HO y MM. Este resultado está relacionado con el espesor de la hoja y la disponibilidad de la luz, tal como lo mencionan Quero et al. (2008). Acorde con la Figura 3, a los 32 días, los valores más altos correspondieron a las plantas de MCh con $291.68 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. En las plantas de HO y MM, el AFE

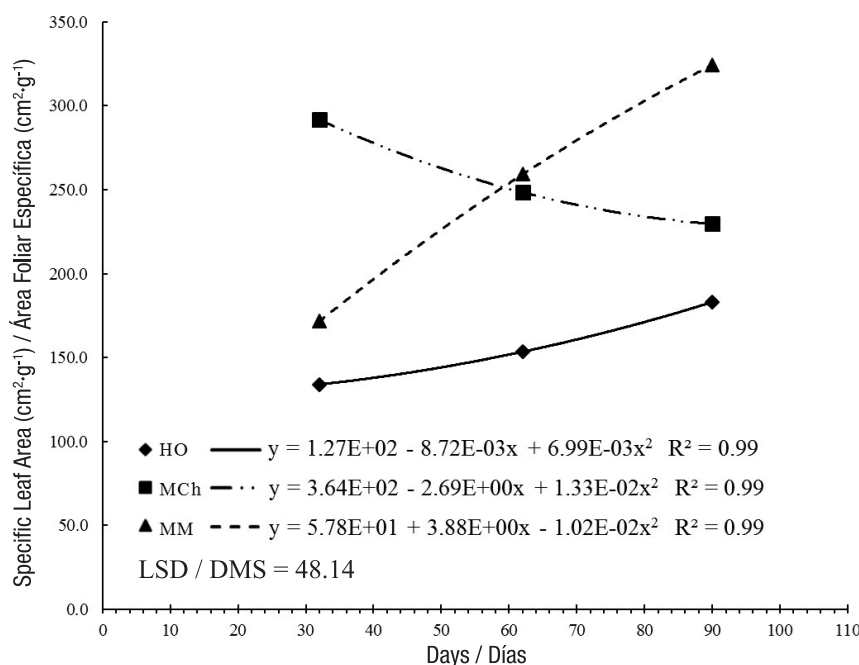


Figure 3. Specific leaf area in *Stevia pilosa* plants during growth in Huasca de Ocampo (HO), Mineral del Chico (MCh) and Mineral del Monte (MM) in the state of Hidalgo, Mexico. LSD: least significant difference.

Figura 3. Área foliar específica en plantas de *Stevia pilosa* durante el crecimiento en Huasca de Ocampo (HO), Mineral del Chico (MCh) y Mineral del Monte (MM) estado de Hidalgo, México. DMS: diferencia mínima significativa.

work done, it is possible to affirm that significantly lower values reflect greater leaf hardness, which can be interpreted as an adaptation to the environment (Romero-Figueroa et al., 2017).

The LAR, which represents the assimilative surface per unit dry weight, exhibited the same trend as the SLA. Plants that grew in MCh had the densest leaves at 30 days, but the leaves became thinner as time went by; in contrast, in MM, the LAR was 20 % higher at 110 days (Figure 4). These differences are mainly due to the shading conditions and low temperatures that modify the metabolic and respiratory activities of the plant. In addition, the increase or decrease in the LAR value means that changes in LA are much more critical in flowering and seed formation than in the initial phase of growth (Pommerening & Muszta, 2016).

The discrepancy in the behavior of the indices over time is largely due to climatic conditions, the number of samples taken and the limited information on the precise phenological stages of the species.

Metabolite concentration

Figure 5 shows the metabolite concentrations in *S. pilosa*. Plants from the three sites showed no significant statistical differences ($P > 0.05$) in phenol concentrations; mean values ranged from 1.79 to 2.6 mg·g⁻¹ dry matter. These concentrations are lower than those found by Gawel-Beben et al. (2015) in *S. rebaudiana* leaves (6 to

incrementó en función del tiempo; el segundo sitio generó el valor más alto (324.25 cm²·g⁻¹) en el último muestreo (110 días). El AFE es el índice más sensible a cambios ambientales y el más propenso a los ontogenéticos, por lo que, el sombreado excesivo provoca aumento del AFE y repercute negativamente en la TAN (Morales et al., 2015), tal como se observó en el presente estudio.

Wright, Reich, y Westoby (2001) determinaron correlaciones positivas entre el AFE, la capacidad fotosintética y el contenido nutrimental, y demostraron que cuando hay índices altos de AFE hay menor dureza en las hojas y mayor calidad nutrimental en la planta. La información sobre *S. pilosa* es muy escasa; no obstante, con base en el trabajo realizado, es posible afirmar que los valores significativamente menores reflejan mayor dureza de la hoja, lo cual se puede interpretar como una adaptación al ambiente (Romero-Figueroa et al., 2017).

La RAF, que representa la superficie asimiladora por unidad de peso seco, presentó la misma tendencia que el AFE. Las plantas que crecieron en MCh tuvieron las hojas más densas a los 30 días, pero las hojas se hicieron más delgadas conforme el tiempo pasó; en contraste, en MM, la RAF fue 20 % más alta a los 110 días (Figura 4). Estas diferencias se deben principalmente a las condiciones de sombreado y temperaturas bajas que modifican las actividades metabólicas y respiratorias de la planta. Además, el aumento o disminución en

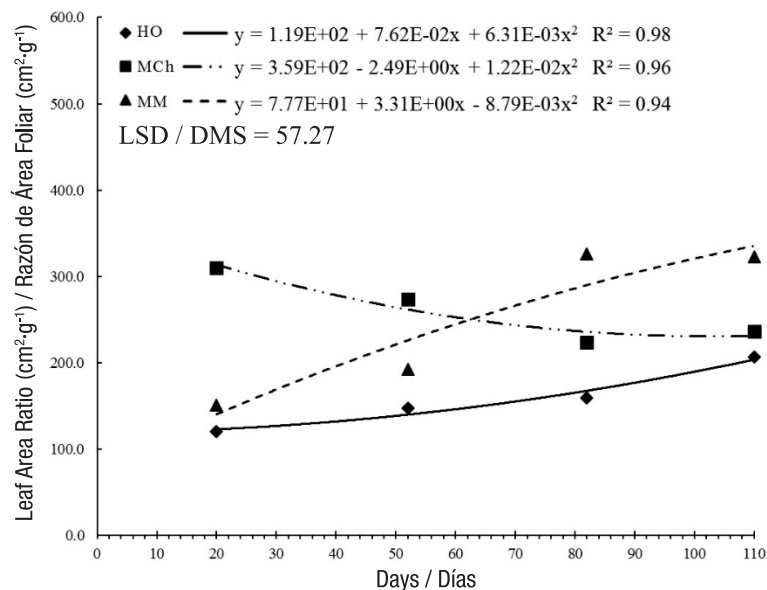


Figure 4. Leaf area ratio in *Stevia pilosa* plants during their growth in Huasca de Ocampo (HO), Mineral del Chico (MCh) and Mineral del Monte (MM) in the state of Hidalgo, Mexico. LSD: least significant difference.

Figura 4. Razón de área foliar en plantas de *Stevia pilosa* durante su crecimiento en Huasca de Ocampo (HO), Mineral del Chico (MCh) y Mineral del Monte (MM) en el estado de Hidalgo, México. DMS: diferencia mínima significativa.

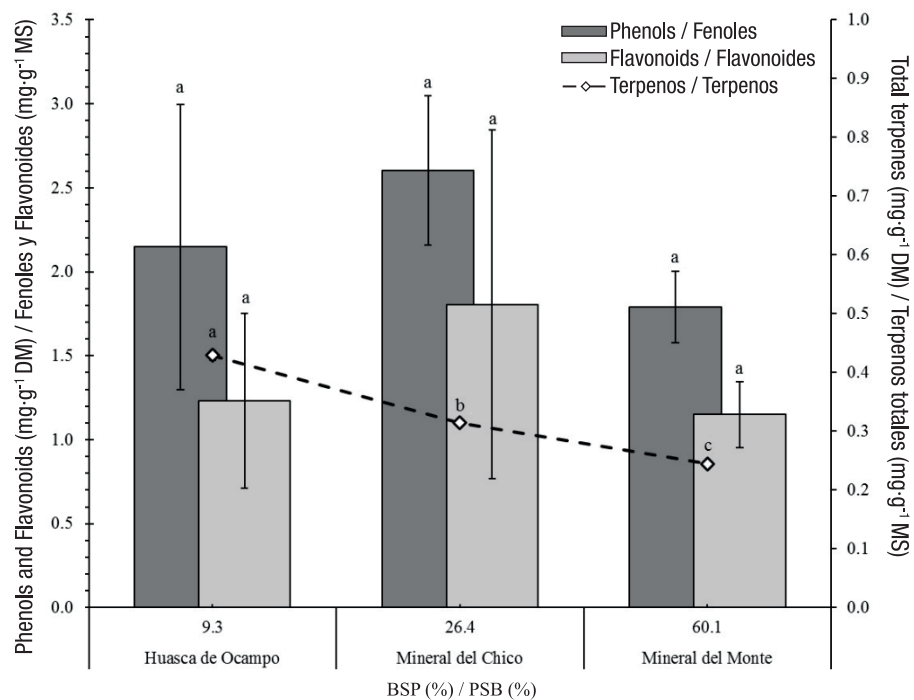


Figure 5. Concentrations of phenols, flavonoids and total terpenes in *Stevia pilosa* plants and their relationship with the base saturation percentage (BSP) of the soils at three sites in the state of Hidalgo, Mexico. Different letters indicate significant differences in metabolite concentrations among sites, according to Tukey's test ($P \leq 0.05$).

Figura 5. Concentración de fenoles, flavonoides y terpenos totales en plantas de *Stevia pilosa* y su relación con el porcentaje de saturación de bases (PSB) de los suelos de tres sitios del estado de Hidalgo, México. Letras distintas indican diferencias significativas en las concentraciones de metabolitos entre sitios, de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

16 mg·g⁻¹ dry matter). Flavonoid concentration was also similar among sites ($P > 0.05$) and ranged from 1.3 to 1.8 mg·g⁻¹ dry matter; in this regard, Gawel-Beben et al. (2015) reported values from 2.2 to 3.5 mg·g⁻¹. On the other hand, the analysis showed significant statistical differences ($P \leq 0.05$) in total terpenes (TT) and, on the basis of what was reported by Cerda-García-Rojas and Pereda-Miranda (2001), it follows that this type of metabolite in *S. pilosa* is of the diterpenic type. In addition, TT was found to have an inverse correlation with the percentage of exchangeable bases; that is, the greater the amount of TT, the lower the presence of cations in the exchange system. In general, the presence or absence of secondary metabolites in the plants has to do with the climatic conditions and elevation of the site (Cui, Nakamura, Tian, Kayahara, & Tian, 2006), as well as with the stress generated by the presence of pests and diseases (Magangana & Makunga, 2016), soil nutrient content (Zhao et al., 2016) and the interaction with other species.

In studies of the genus *Stevia*, triterpenic metabolites and sesquiterpenic lactones (García & Pereda, 2002) have been reported to have anti-inflammatory (Hohmann et al., 2016) and cancer prevention properties (Sampaio, Edrada-Ebel, & Da Costa, 2016), which is why it is important to identify the metabolites and study their properties.

Although there is little information about the management or the edapho-environmental relationship in the production of secondary metabolites of Mexican *Stevias*, it is possible to infer that factors such as water availability, microorganisms in the rhizosphere (Borda, Pardo, Montaña, & Martínez, 2011), temperature (Kumar et al., 2015) and light quality (Ahmad, Rab, & Ahmad, 2016) can increase the concentration of phenols, flavonoids and diterpenes.

Nutrient analysis

According to Table 4, the concentration and extraction of minerals in *S. pilosa* varied significantly ($P \leq 0.05$) depending on the sampling site. The plants with the highest extraction yields were those of MCh and the lowest yields were those of MM. The elements most extracted by the plant were N, K, Ca and Mg, and the least extracted were Fe, Zn, Mn and Mo. A similar trend was found by Khiraoui et al. (2017) in an analysis of *S. rebaudiana* from six sites in Indiana, where K, Ca and Mg were the minerals with the highest amount in plant tissue, and Mn, Fe and Zn the lowest. These results are related to the resilience capacity of the wild plant, the contrasting edaphoclimatic conditions among the sites and the development of the species. On the other hand, Rather, Singh, Suhail, and Patel (2019) report that Ca and K are the minerals with the highest concentration in the plant and Fe, P and Na the lowest.

el valor de la RAF significa que los cambios en el AF son mucho más críticos en la floración y formación de semilla que en la fase inicial del crecimiento (Pommerening & Muszta, 2016).

La discrepancia en el comportamiento de los índices a través del tiempo se debe en gran medida a las condiciones climáticas, al número de muestreos realizados y a la poca información sobre las etapas fenológicas precisas de la especie.

Concentración de metabolitos

La Figura 5 muestra las concentraciones de metabolitos en *S. pilosa*. Las plantas de los tres sitios no mostraron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) en la concentración de fenoles; los valores promedio variaron de 1.79 a 2.6 mg·g⁻¹ de materia seca. Estas concentraciones son inferiores a las encontradas por Gawel-Beben et al. (2015) en hojas de *S. rebaudiana* (6 a 16 mg·g⁻¹ de materia seca). La concentración de flavonoides también fue similar entre sitios ($P > 0.05$) y varió de 1.3 a 1.8 mg·g⁻¹ de materia seca; al respecto, Gawel-Beben et al. (2015) reportaron valores de 2.2 a 3.5 mg·g⁻¹. Por otra parte, el análisis mostró diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$) en el total de terpenos (TT) y, de acuerdo con lo reportado por Cerda-García-Rojas y Pereda-Miranda (2001), se deduce que este tipo de metabolitos en *S. pilosa* son de tipo diterpénico. Asimismo, se encontró que el TT tiene una correlación inversa con el porcentaje de bases intercambiables; es decir, a mayor cantidad de TT menor presencia de cationes en el sistema de intercambio. En general, la presencia o ausencia de los metabolitos secundarios en las plantas tiene que ver con las condiciones climáticas y la altitud del lugar (Cui, Nakamura, Tian, Kayahara, & Tian, 2006), así como con el estrés generado por la presencia de plagas y enfermedades (Magangana & Makunga, 2016), el contenido nutrimental del suelo (Zhao et al., 2016) y la interacción con otras especies.

En estudios del género *Stevia* se han reportado metabolitos triterpénicos y lactonas sesquiterpénicas (García & Pereda, 2002) que tienen propiedades antiinflamatorias (Hohmann et al., 2016) y de prevención del cáncer (Sampaio, Edrada-Ebel, & Da Costa, 2016), motivo por el cual es importante la identificación de los metabolitos y el estudio de sus propiedades.

A pesar de que existe poca información sobre el manejo o la relación edafoambiental en la producción de metabolitos secundarios de *Stevias* mexicanas, es posible inferir que factores como la disponibilidad de agua, microorganismos en la rizósfera (Borda, Pardo, Montaña, & Martínez, 2011), temperatura (Kumar et al., 2015) y calidad de luz (Ahmad, Rab, & Ahmad, 2016) pueden incrementar la concentración de fenoles, flavonoides y diterpenos.

Table 4. Nutrient extraction from *Stevia pilosa* plants developed in three locations in the state of Hidalgo, Mexico. Cuadro 4. Extracción nutrimental de plantas de *Stevia pilosa* desarrolladas en tres localidades del estado de Hidalgo, México.

Site/Sitio	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Zn	Mn	Mo
(mg·g ⁻¹ dry matter)/(mg·g ⁻¹ materia seca)										
Huasca de Ocampo	8.25 a	1.61 a	3.68 a	3.11 b	2.42 a	1.62 a	0.58 a	0.33 a	0.78 a	0.08 a
Mineral del Chico	8.80 a	2.07 a	3.81 a	4.41 a	2.32 a	1.84 a	0.98 a	0.32 a	0.68 ab	0.12 a
Mineral del Monte	6.15 b	1.83 a	2.42 b	2.67 b	1.71 b	0.63 b	0.36 b	0.36 b	0.40 b	0.10 a

Apparently, the genus *Stevia* has the same tendency in mineral concentration and extraction.

Conclusions

The edaphoclimatic conditions at the three sites in the state of Hidalgo modify the presence, form of growth and development of *Stevia pilosa*. The plants with the highest growth, biomass production and nutrient extraction were found in Mineral del Chico, where there is a humid climate and soil with greater chemical fertility, while the highest production of total terpenes was found in plants from Huasca de Ocampo, where the climate is dry and soils are poor in nutrients. This study represents the first research documenting the development, nutrient content and secondary metabolites of *S. pilosa in situ*.

Acknowledgments

The authors wish to thank the National Science and Technology Council (CONACYT) for the postgraduate scholarship granted to the first author.

End of English version

References / Referencias

- Ahmad, N., Rab, A., & Ahmad, N. (2016). Light-induced biochemical variations in secondary metabolite production and antioxidant activity in callus cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert). *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 154, 51–56. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.11.015
- Álvarez, G. R., Torres, V. J., Román, L., Hernández, J., García, R. C. C., & Nathan, P. J. (2005). Absolute configuration of the a-methylbutyryl residue in longipinene derivatives from *Stevia pilosa*. *Phytochemistry*, 66(6), 639–642. doi: 10.1016/j.phytochem.2004.12.001
- Azarpour, E., Moraditochae, M., & Bozorgi, H. R. (2014). Effect of nitrogen fertilizer management on growth analysis of rice cultivars. *International Journal of Biosciences*, 4(5), 35–47. doi: 10.12692/ijb/4.5.35-47

Análisis nutrimental

De acuerdo con el Cuadro 4, la concentración y extracción de los minerales en *S. pilosa* variaron significativamente ($P \leq 0.05$) en función del sitio de muestreo. Las plantas con los rendimientos más altos en extracción fueron las de MCh y las de menor rendimiento fueron las de MM. Los elementos más extraídos por la planta fueron N, K, Ca y Mg, y los de menor extracción fueron Fe, Zn, Mn y Mo. Una tendencia similar fue encontrada por Khiraoui et al. (2017) en un análisis de *S. rebaudiana* de seis sitios en Indiana, donde K, Ca y Mg fueron los minerales con mayor cantidad en el tejido vegetal, y Mn, Fe y Zn los más bajos. Estos resultados se relacionan con la capacidad de resiliencia de la planta silvestre, las condiciones edafoclimáticas contrastantes entre los sitios y el desarrollo de la especie. Por otro lado, Rather, Singh, Suhail, y Patel (2019) reportan que el Ca y K son los minerales de mayor concentración en la planta y el Fe, P y Na los de menor concentración. Al parecer, el género *Stevia* tiene la misma tendencia en concentración y extracción mineral.

Conclusiones

Las condiciones edafoclimáticas presentes en los tres sitios del estado de Hidalgo modifican la presencia, forma de crecimiento y el desarrollo de *Stevia pilosa*. Las plantas con mayor crecimiento, producción de biomasa y extracción nutrimental se encontraron en Mineral del Chico, donde hay clima húmedo y suelo de mayor fertilidad química, mientras que la mayor producción de terpenos totales se encontró en plantas provenientes de Huasca de Ocampo, donde el clima es seco y los suelos son pobres en nutrientes. Este estudio representa la primera investigación en la que se documenta el desarrollo, contenido nutrimental y metabolitos secundarios de *S. pilosa in situ*.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de posgrado otorgada al primer autor.

Fin de la versión en español

- Borda, M. D., Pardo, J. M. G., Montaña, J. S. L., & Martínez, M. M. (2011). Influencia de la materia orgánica y *Azotobacter nigricans* en un cultivo de *Stevia rebaudiana*. *Universitas Scientiarum*, 16(3), 282–293. doi: 10.11144/javeriana.CS16-3.iroom
- Bremner, J. M., & Mulvaney, C. S. (1982). Nitrogen-total. In A. L. Page, R. H. Miller, & D. R. Keeney (Eds.), *Methods of soil analysis. Chemical and microbiological properties* (2nd ed., pp. 595–624). Madison, WI, USA: American Society of Agronomy-Soil Science Society of America. doi: 10.2134/agronmonogr9.2.2ed.c31
- Cabrera, H. M. (2002). Respuestas ecofisiológicas de plantas en ecosistemas de zonas con clima mediterráneo y ambientes de alta montaña. *Revista Chilena de Historia Natural*, 75(3), 625–637. doi: 10.4067/S0716-078X2002000300013
- Calderón, G., & Rzedowski, J. (2005). *Flora fanerogámica del Valle de México*. México: Instituto de Ecología, A. C. - Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Retrieved from http://www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/librosDig/pdf/Flora_del_Valle_de_Mx1.pdf
- Cannon, J., Li, D., Wood, S. G., Owen, N. L., Gromova, A., & Lutsky, V. (2001). Investigation of secondary metabolites in plants. A general protocol for undergraduate research in natural products. *Journal Chemistry Education*, 78(9), 1234–1237. doi: 10.1021/ed078p1234
- Casierra-Posada, F., & Peña-Olmos, J. E. (2015). Modificaciones fotomorfológicas inducidas por la calidad de la luz en plantas cultivadas. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 39, 84–92. doi: 10.18257/raccefy.276
- Cerda-García-Rojas, C. M., & Pereda-Miranda, R. (2001). The phytochemistry of *Stevia*: a general survey. In A. D. Kinghorn (Ed.), *Stevia. The genus Stevia* (vol. 19, pp. 87–118). London: CRC Press. Retrieved from <https://www.taylorfrancis.com/books/e/9780429217487>
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoids content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178–182. Retrieved from <https://search.proquest.com/openview/8ed5f78aa3317908039c7a8ca3740050/1?pq-origsite=gscholar&cbl=906352>
- Cui, T., Nakamura, K., Tian, S., Kayahara, H., & Tian, Y. (2006). Polyphenolic content and physiological activities of chinese hawthorn extracts. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(12), 2948–2956. doi: 10.1271/bbb.60361
- García, R. C., & Pereda, M. R. (2002). The phytochemistry of the *Stevia*: a general survey. In A. D. Kinghorn (Ed.), *Stevia: The genus Stevia; medicinal and aromatic plants-industrial profiles* (vol. 19, pp. 86–118). London, UK: Ed. Taylor & Francis.
- Goyal, S., Samsher, K., & Goyal, R. K. (2010). *Stevia (Stevia rebaudiana)* a bio-sweetener: a review. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 61(1), 1–10. doi: 10.3109/09637480903193049
- Harborne, J. B. (1998). *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis* (3rd ed.). London, UK: Chapman & Hall.
- Hatfield, J. L., & Prueger, J. H. (2015). Temperature extremes: Effect on plant growth and development. *Weather and Climate Extremes*, 10(A), 4–10. doi: 10.1016/j.wace.2015.08.001
- Hernández, L. R., Catalan, C. A. N., & Joseph-Nathan, N. P. (1998). The chemistry of the genus *Stevia* (Asteraceae). *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Física y Naturales*, 22(83), 229–279. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/270511131_THE_CHEMISTRY_OF_THE_GENUS_STEVIA_ ASTERACEAE
- Hohmann, M. S. N., Longhi-Balbinot, D. T., Guazelli, C. F. S., Navarro, S. A., Zarpelon, A. C., Casagrande, R., ... Verri, W. A. (2016). Sesquiterpene lactones: structural diversity and perspectives as antiinflammatory molecules. In Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in natural products chemistry* (pp. 243–264). New York, NY, USA: Elsevier.
- Hunt, R. (2017). Growth analysis, individual plants. In B. Thomas, D. J. Murphy, & B. G. Murray (Eds.), *Encyclopedia of applied plant sciences* (2nd ed., pp. 579–588). London, UK: Academic Press.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2015). División municipal del estado de Hidalgo. Retrieved June 6, 2017 from http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/hgo/territorio/div_municipal.aspx?tema=me&e=13
- Gawel-Bęben, K., Bujak, T., Nizioł-Łukaszewska, Z., Antosiewicz, B., Jakubczyk, A., Karaś, M., & Rybczyńska, K. (2015). *Stevia rebaudiana* Bert. leaf extracts as a multifunctional source of natural antioxidants. *Molecules*, 20(4), 5468–5486 doi: 10.3390/molecules20045468
- Jarma, O. A. J., Combatt, C., & Cleves, C. (2010). Aspectos nutricionales y metabolismo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni): una revisión. *Agronomía Colombiana*, 28(2), 199–208. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v28n2/v28n2a09.pdf>
- Jarma, A., Rengifo, T., & Araméndiz-Tatis, H. (2006). Fisiología de estevia (*Stevia rebaudiana*) en función de la radiación en el Caribe colombiano. II. Análisis de crecimiento. *Agronomía Colombiana*, 24(1), 38–47. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180316238005>
- Khiraoui, A., Bakha, M., Amchra, F., Ourouadi, S., Booulli, A., Al-Faiz, C., & Hasib, A. (2017). Nutritional and biochemical properties of natural sweeteners of six cultivars of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves grown in Morocco. *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 8(3), 1015–1022. Retrieved from <http://www.jmaterenvironsci.com/>
- Kumar, P. P., Mahajan, M., Prasad, R. V., Pathania, V., Singh, B., & Singh, P. A. (2015). Harvesting regimes to optimize yield and quality in annual and perennial

- Stevia rebaudiana* in alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacognosy Research*, 2(4), 258–263. doi: 10.4103/0974-8490.69128
- Magangana, T. P., & Makunga. N. P. (2016). The effect of various factors on seed germination and the influence of abiotic stresses on growth productivity, physiology and differences in metabolite profiles (diterpene glycosides) of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *South African Journal of Botany*, 103, 324–325. doi: 10.1016/j.sajb.2016.02.080
- Mishra, G., & Kumar, R. (2016). Plant litter decomposition: drivers insight to the ecological process. *European Journal of Biological Research*, 6(3), 176–185. doi: 10.5281/zenodo.58752
- Molina, M. J. L., Galván, V. R., Patiño, S. A., & Fernández, N. R. (2012). Plantas medicinales y listado florístico preliminar del municipio de Huasca de Ocampo, Hidalgo, México. *Polibotánica*, 34, 239–271. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/621/62123051012.pdf>
- Morales, M. E. J., Morales-Rosales, E. J., Díaz-López, E., Cruz-Luna, A. J., Medina-Arias, N., & Guerrero-De la Cruz, M. (2015). Tasa de asimilación neta y rendimiento de girasol en función de urea y urea de liberación lenta. *Agrociencia*, 49(2), 163–176. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952015000200005
- Nassi, D. N., Roncucci, N. N., Triana, F., Tozzini, C., & Bonari, E. (2011). Productivity of giant reed (*Arundo donax* L.) and miscanthus (*Miscanthus x giganteus* Greef et deuter) as energy crops: growth analysis. *Italian Journal of Agronomy*, 6(3), 141–147. doi: 10.4081/ija.2011.e22
- Ortiz-Solorio, C. A. (2019). *Edafología*. México: Editorial Trillas.
- Pereira, C., Storck, L., Lopes, S., Martin, T. N., & Bisognin, D. A. (2016). Dry biomass and glycosides yield from *Stevia rebaudiana* leaves under different harvesting times. *Bioscience Journal*, 32(6), 1462–1471. doi: 10.14393/BJ-v32n6a2016-31574
- Pommerening, A., & Muszta, A. (2016). Relative plant growth revisited: Towards a mathematical standardisation of separate approaches. *Ecological Modelling*, 320, 383–392. doi: 10.1016/j.ecolmodel.2015.10.015
- Quero, J. L., Villar, R., Marañón, T., Zamora, R., Vega, D., & Sack, L. (2008). Relating leaf photosynthetic rate to whole-plant growth: drought and shade effects on seedlings of four *Quercus* species. *Functional Plant Biology*, 35(8), 725–737. doi: 10.1071/FP08149
- Rather, H. A., Singh S., Suhail, B., & Patel, G. (2019). *Stevia* (Meethi Patti) as an alternative form of sugar. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(2), 453–457. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/332256012_Stevia_Meethi_Patti_as_an_alternative_form_of_sugar
- Rincón, G. N., Olarte, Q. M. A., & Pérez, N. J. C. (2012). Determinación del área foliar en fotografías tomadas con una cámara Web, un teléfono celular o una cámara semiprofesional. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 65(1), 6399–6405. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179924340010>
- Romero-Figueroa, J. C., Rodríguez-Mendoza, M. N., Escalante-Estrada, J. A. S., Gutiérrez-Castorena, M. C., Peña-Valdivia, C. B., Cueto-Wong, J., & Burguete-Hernández, E. (2017). Dinámica de crecimiento de *Stevia* cultivada en sustratos orgánicos en invernadero. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(3), 341–350. Retrieved from <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/40-3/11r.pdf>
- Sampaio, B. L., Edrada-Ebel, R. A., & Da Costa, F. B. (2016). Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. *Scientific Reports*, 6, 1–14. doi: 10.1038/srep29265
- Servicio Meteorológico Nacional (SMN). (2010). Información climatológica por estado. Retrieved June 2, 2017 from <http://smn.cna.gob.mx/es/informacion-climatologica-ver-estado?estado=hgo>
- Soejima, A., Tanabe, A. S., Takayama, I., Kawahara, T., Watanabe, K., Nakazawa, M., ... Yahara, T. (2017). Phylogeny and biogeography of the genus *Stevia* (Asteraceae: Eupatorieae): an example of diversification in the Asteraceae in the new world. *Journal of Plant Research*, 130(6), 953–972. doi: 10.1007/s10265-017-0955-z
- Tholl, D., Chen, F., Petri, J., Gershenzon, J., & Pichersky, E. (2005). Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from *Arabidopsis* flowers. *Journal Plant*, 42(5), 757–771. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02417.x
- Van Reeuwijk, L. (2002). *Procedures for soil analysis* (6th. ed.). The Netherlands: International Soil Reference and Information Centre-Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved from https://www.isric.org/sites/default/files/ISRIC_TechPap09.pdf
- Villavicencio, M. A., & Pérez, E. B. (2006). *Plantas útiles del estado de Hidalgo* (1.^a ed.) Pachuca, México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Villagómez-Flores, E., Hinojosa-Espinosa, O., & Villaseñor, J. L. (2018). The genus *Stevia* (Eupatorieae, Asteraceae) in the state of Morelos, Mexico. *Acta Botánica Mexicana*, 125, 1–35. doi: 10.21829/abm125.2018.1315
- Wahid, A. M., Farooq, I., Hussain, R., Rasheed R., & Galani S. (2012). Responses and management of heat stress in plants. In P. Ahmad & M. N. V. Prasad (Eds.), *Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change* (pp. 135–137). New York, USA: Springer.
- Waterman, P. G., & Mole, S. (1994). *Analysis of phenolic plant metabolites (Methods in Ecology)*. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.
- Wright, I. J., Reich, P. B., & Westoby, M. (2001). Strategy shifts in leaf physiology, structure and nutrient content between species of high- and low-rainfall and high- and low-nutrient habitats. *Functional Ecology*, 15(4), 423–434. doi: 10.1046/j.0269-8463.2001.00542.x
- Zaman, M. M., Chowdhury, M. A. H., & Chowdhury, T. (2015). Growth parameters and leaf biomass yield of stevia

(*Stevia rebaudiana*, Bertoni) as influenced by different soil types of Bangladesh. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, 13(1), 31–37. doi: 10.3329/jbau.v13i1.28708

Zhao, Y. H., Jia, X., Wang, W. K., Liu, T., Huang, S. P., & Yang, M. Y. (2016). Growth under elevated air temperature

alters secondary metabolites in *Robinia pseudoacacia* L. seedlings in Cd- and Pb-contaminated soils. *Science of the Total Environment*, 565, 586–594. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.05.058

