UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

ANALISI DEI PRINCIPALI FATTORI CHE INFLUENZANO LE CARATTERISTICHE PRODUTTIVE E QUALITATIVE IN *STEVIA REBAUDIANA* BERTONI

ANALYSIS OF THE MAIN FACTORS INFLUENCING THE PRODUCTION AND QUALITATIVE CHARACTERISTICS IN *STEVIA REBAUDIANA* BERTONI

Studente:
GAIA MORETTI

Relatore:
PROF. FRANCO CAPOCASA

Correlatore:
DOTT. LUCA MAZZONI

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

Indice

INTRODUZIONE 1

1. CENNI STORICI 2

2. CLASSIFICAZIONE TASSONOMICA E CARATTERI BOTANICI 3

2.1 Foglie 3

2.2 Fiori 4

2.3 Semi 5

3. ESIGENZE PEDO-CLIMATICHE 6

3.1 Fotoperiodo 6

3.2 Temperatura 7

3.3 Suolo 8

4. COLTIVAZIONE 9

4.1 Propagazione 9

4.2 Impianto 11

4.3 Esigenze nutrizionali 12

4.4 Stress biotici 13

4.5 Esigenze idriche 14

5. PROPRIETÀ DI *STEVIA* 15

6. IL PANORAMA VARIETALE 18

7. INFLUENZA DI DIVERSI FATTORI SULLA PRODUTTIVITÀ DI STEVIA 19

7.1 Fattori genetici 19

7.2 Fattori nutrizionali 24

7.3 Fattori ambientali 30

7.3.1 Tipo di suolo 30

7.3.2 Luce e temperatura 35

7.3.3 Stress abiotici 37

7.3.4 Regime di irrigazione 42

8. CONCLUSIONI 47

9. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA 49

INTRODUZIONE

Alla base di questo studio vi è l'analisi di una pianta poliennale originaria del Paraguay chiamata *Stevia rebaudiana* Bertoni, molto chiacchierata negli ultimi anni per le sue particolari proprietà.

Le foglie di questa pianta sono il punto di massima concentrazione di specifici composti detti glicosidi steviolici i quali le conferiscono il potere dolcificante, mediamente superiore di 300 volte rispetto a quello del saccarosio.

Ancora più interessante è la correlazione tra lo scopo per cui si utilizza e gli effetti benefici che offre al consumatore perché nonostante il suo potere dolcificante, è priva di zuccheri e di calorie ed è quindi una buona alternativa da offrire alle persone ad esempio iperglicemiche.

Se in Europa la commercializzazione è sempre stata soggetta a controversie, in Paesi come America Latina, Giappone, Paraguay, Messico, Brasile e Cina è tradizionalmente coltivata ed usata.

L'EFSA (European Food Safety Authority) però ha recentemente ammesso la Stevia sul mercato europeo ed a così che è arrivata in Italia. Dal 2011, gli estratti di stevia sono stati commercializzati esclusivamente sotto forma di additivi alimentari e inseriti in specifiche categorie di alimenti quali a "ridotto valore energetico" o "senza zuccheri aggiunti".

Il seguente elaborato si propone di illustrare dapprima la storia e le caratteristiche dell'arbusto dalle cui foglie sono estratti i glicosidi steviolici, la struttura e le proprietà.

Pongo l'attenzione in maggior modo sui fattori influenzanti la produttività, la crescita di Stevia e il loro effetto positivo o negativo su di essa, analizzando una serie di esperimenti svolti in diverse parti del mondo.

1. CENNI STORICI

La *Stevia Rebaudiana* Bertoni è originaria della valle del Rio Monday nel Nord-est del Paraguay. Le prime notizie sull'esistenza di questa pianta risalgono al suo uso da parte degli indigeni Guaranì che la chiamavano caà-ehe (erba dolce) e la utilizzavano per coprire il gusto amaro dell'*Ilex paraguayensis* con cui si preparava un infuso chiamato: "Mate" (il the del Paraguay) leggermente eccitante per un basso contenuto di caffeina.

Secoli dopo, nel 1797 il botanico Antonio José Cavanilles creò il genere Stevia sulla base di quattro specie messicane, giunte all'Orto botanico di Madrid grazie alla Real Expediciòn Botànica a Nueva España, dedicandolo al botanico Pedro Jaime Esteve. (https://www.bio-mondo.eu/stevia/)

Nel 1899 il botanico Mosè Giacomo Bertoni catalogò per la prima volta la pianta, dandole inizialmente il nome di *Eupatorium rebaudianum*, in onore del chimico paraguayano Ovidio Rebaudi, che fu il primo ad analizzare chimicamente la pianta. Bertoni classificò ben 250 varianti della pianta; oggi il nome completo con cui la conosciamo dà merito ad entrambe le figure storiche degli uomini che ce l'hanno fatta conoscere: *Stevia rebaudiana* Bertoni.

La Stevia nonostante ciò rimase a lungo poco conosciuta fino a che non venne coltivata in Inghilterra durante la Seconda Guerra Mondiale (1942), a seguito del razionamento dello zucchero. Negli anni a seguire, la prima coltivazione ai fini commerciali iniziò in Paraguay, terra natia, e solo successivamente in Giappone che nei primi anni settanta già la introdusse come dolcificante per cibi e bevande. Da qui in poi la Stevia ha conosciuto un prosperoso mercato grazie anche agli studi e alle ricerche fatte per capire più a fondo le proprietà e quindi le potenzialità di una pianta fino ad ora ignorata.

Nel 2008 l'organizzazione americana FDA (Food and Drug Administration) ha conferito all'estratto di Stevia ad alta purezza lo stato di GRAS (Generally Recognized As Safe) consentendone l'utilizzo in cibi e bevande.

Nel 2011 l'EFSA (European Food Safety Authority) approva l'utilizzo dei Glicosidi Steviolici in cibi e bevande.

Recentemente il paese che coltiva maggiormente Stevia ai fini commerciali è la Cina, che la esporta principalmente in Giappone. Naturalmente ora che il mercato si è allargato sia in Europa che in Nord America si aprono nuovi spazi per le colture intensive, si cercherà anche la meccanizzazione del processo che fino ad oggi non è avvenuta.

2. CLASSIFICAZIONE TASSONOMICA E CARATTERI BOTANICI

Regno: Angiosperme
Classe: Dicotiledoni
Gruppo: Monochlamydae
Ordine: Asterales
Famiglia: Asteraceae
Sottofamiglia: Asteroideae
Tribù: Eupatorieae (Cabrera *et al.*, 1996)
Genere: *Stevia*
Specie: *Rebaudiana*

Figura 1. Piantina Di Stevia rebaudiana

La *Stevia rebaudiana* appartiene alla famiglia delle Compositae (Asteraceae), descritta dapprima dal botanico paraguayano Moises Santiago Bertoni (1857-1929), di Asuncion, come *Eupatorium rebaudianum*, fu poi esattamente classificata, nel genere Stevia,da William Botting Hemsley (1843-1924), ricercatore inglese dell'Orto Botanico di Kew.

È una pianta arbustiva perenne che in piena maturazione raggiunge i 70 cm di altezza circa; i fusti sono una struttura che si rinnova annualmente, semi-legnosa, con tendenza a flettersi, più o meno ricoperti di peluria (Fig.1).

2.1 Foglie

Le foglie sono piccole, lanceolate, oblunghe, e dentellate, la cui disposizione sul fusto ha andamento alternato; hanno un'habitus di crescita erbaceo (Singh e Rao 2005).

Esse variano notevolmente in termini di qualità a causa di molti fattori ambientali, tra cui le condizioni del suolo, i metodi di irrigazione, la luce solare, la purezza dell'aria, le pratiche agricole, l'igiene, la lavorazione e lo stoccaggio.

2.2 Fiori

I fiori sono piccoli, bianchi e sono perfetti (ermafroditi) con organi maschili e femminili, portati in piccoli corimbi da due a sei fiori (Marsolais *et al*., 1998; Dwivedi 1999) (Fig.2).

La pianta può iniziare la fioritura dopo che si sono formate almeno quattro foglie vere e impiega più di un mese per passare attraverso i vari stadi dello sviluppo dei fiori e produrli tutti (Taiariol 2004; Ramesh *et al*., 2006). I corimbi, a loro volta, sono raggruppati in formazioni a pannocchia.

Figura 2. Pianta fiorita di Stevia

I fiori di Stevia sono auto-incompatibili e probabilmente l'impollinazione avviene per via entomofila.

La Stevia è una pianta brevidiurna che fiorisce da gennaio a marzo nell'emisfero australe e da settembre a dicembre nell'emisfero boreale. La fioritura in condizioni di breve giorno si verifica a seconda della sensibilità della cultivar alla lunghezza del giorno che varia da 8 a 14 ore (Valio e Rocha 1977; Zaidan *et al*., 1980; Chalapathi 1997).

2.3 Semi

I semi sono contenuti in particolari frutti indeiescenti, detti acheni, di circa 3 mm di lunghezza: ogni achenio è dotato di pappo composto di circa venti setole (Goettemoeller e Ching 1999).

Shock (1982), Duke (1993), Carneiro *et al*., (1997) e Lester (1999) hanno riportato una percentuale scarsa e molto variabile di semi vitali. I semi fertili sono solitamente di colore scuro, mentre i semi infertili sono solitamente chiari (Fig.3). I semi sono molto piccoli (1000 semi pesano 0,3 -1,0 g) e di conseguenza le piantine si sviluppano lentamente, raggiungendo una dimensione adatta per il trapianto sul campo a 4560 DAP (days after planting).

Figura 3. Semi sterili(a) e semi fertili(b)

I vari organi della pianta contengono differenti quantità di glicosidi steviolici, il cui contenuto decresce nell'ordine: foglie, fiori, gambi, semi e radici, queste ultime prive di steviosidi. La dolcezza delle foglie risulta essere due volte superiore a quella relativa all'infiorescenza. Le diverse concentrazioni di stevioside nei differenti organi della pianta hanno fatto ipotizzare a Metivier e Viana (1979) che lo stevioside potrebbe fungere da protettore delle parti aeree della pianta rendendola così inappetibile ai predatori erbivori.

Il contenuto massimo di steviosidi è stato rilevato nei germogli più giovani e nelle aree con intensa attività di crescita, mentre un minor quantitativo di tali componenti è stato osservato nelle parti più senescenti dei germogli stessi.

3. ESIGENZE PEDO-CLIMATICHE

La Stevia è stata coltivata con successo nelle più disparate aree geografiche nel mondo sebbene sia originaria delle regioni nord-orientali degli altipiani del Paraguay, alle latitudini di 23° - 24° Sud (Shock, 1982) e alla longitudine di 54° - 56° Est (Alvarez, 1984): è proprio l'estrema versatilità della suddetta pianta a conferirle importanza. La Stevia è coltivata come coltura perenne nelle regioni subtropicali, comprese alcune parti degli Stati Uniti, mentre viene coltivata come coltura annuale nelle Regioni ad alta latitudine (Goettemoeller e Ching, 1999).

I risultati indicano che il rendimento agronomico dipende principalmente dai caratteri genetici della pianta e di conseguenza dall'espressione fenotipica, che in definitiva è governata da fattori climatici e ambientali (Ermakov e Kotechetov, 1996). Così come la maggior parte delle piante, la crescita e la fioritura della stevia sono garantite da radiazione solare, lunghezza del giorno, temperatura, acqua tellurica e vento.

Per la coltivazione della Stevia il clima ideale potrebbe essere considerato quello subtropicale semi-umido, con temperature che vanno da -6°C a 43°C con una media di 23°C (Brandle e Rosa, 1992). Bertoni (1905) aveva descritto l'area di distribuzione della Stevia tra 22° 30' - 25° 30' latitudine Sud e tra 55° - 57° longitudine Ovest, mentre Sunk (1975) la descrisse più precisamente tra 22° - 24° latitudine Sud e 55° - 56° longitudine Ovest, rispettivamente, all'interno di altitudini corrispondenti a 200 - 700 m.

3.1 Fotoperiodo

La Stevia è altamente sensibile alla lunghezza del giorno e richiede 12-16 ore di luce solare. Ciò ha indotto molti ricercatori ad esaminare l'effetto della lunghezza del giorno e della notte e della variazione di temperatura sulla coltivazione e sui livelli di stevioside presenti (Zaidan *et al.*, 1980). Risultati sperimentali hanno evidenziato che le piante mantenute in condizioni di giorno lungo hanno internodi lunghi e un singolo e robusto fusto principale, che sostiene orizzontalmente foglie ovali; inoltre, nelle stesse condizioni, si è avvertita una certa influenza sulla fioritura delle piante. Valio e Rocha (1966) sostengono che potrebbe essere necessario un fotoperiodo di 13 – 14 ore, infatti analizzando la fioritura della pianta a 8, 10, 12 e 13 ore di luce giornaliera si riscontra una maggiore percentuale di fioritura a 13 ore. Questo ha portato i ricercatori a credere che la Stevia sia un'obbligata brevi-diurna con una lunghezza critica del giorno di circa tredici ore (Lester, 1999). Poiché la sintesi dei glicosidi viene ridotta al momento della fioritura o poco prima, quando la fioritura avviene in condizioni di lungo

fotoperiodo, si verifica una maggior produzione di glicosidi. Di conseguenza, la produzione di Stevia si è rivelata più adatta ad ambienti esposti alla luce naturale per molte ore al giorno, laddove la crescita vegetativa è più lunga e quindi i contenuti di steviosidi glicolici sono più alti. Oltre al semplice incremento in resa della foglia, è aumentata del 50% anche la concentrazione di stevioside rispetto alle piante cresciute con una bassa esposizione solare (Metivier e Viana, 1979).

Nel suo habitat nativo, le piante di Stevia iniziano la fioritura nel periodo compreso fra gennaio e marzo, che corrisponde al periodo compreso fra luglio e settembre nell'emisfero settentrionale. Nel caso in cui la Stevia cresca ad una temperatura di circa 25° C, in condizioni continue di fotoperiodo a 16 ore al giorno, questa è destinata a rimanere in una fase vegetativa indeterminata (Monteiro *et al.*, 2001). La correlazione tra la pianta di Stevia e il fotoperiodo risulta quindi evidente: così come i giorni corti favoriscono la fioritura, i giorni lunghi favoriscono la resa in biomassa. La conclusione dei ricercatori in merito all'influenza del fotoperiodo sulla pianta tende a dimostrare che la coltivazione nelle zone temperate, sotto lunghe giornate estive, sarebbe l'ideale per ottenere alti rendimenti di stevioside anche se la produzione di semi risulterebbe difficoltosa.

3.2 Temperatura

La Stevia è una pianta amante del sole dato che origina da un ambiente caldo, umido e con clima soleggiato (Jia,1984). Nel suo habitat naturale la Stevia cresce insieme ad erbe alte, e quindi in penombra, di conseguenza la produttività è scarsa. Slamet e Tahardi (1988) hanno confermato che l'ombra riduce il tasso di crescita e di fioritura; inoltre, una riduzione del 60% di luce ritarda la fioritura (diminuendo la percentuale di piante fiorite) e la produzione di biomassa vegetale. È stato riscontrato che la temperatura influisce sulla disponibilità di nutrienti del suolo, sulla germinazione e sulla crescita della pianta e dei germogli, sulla sopravvivenza invernale, sulla fotosintesi e sulla respirazione della pianta. Secondo Sumida (1980), l'intervallo di temperatura ottimale per la crescita della Stevia è 15-30° C, anche se la pianta può tollerare una temperatura critica di 0-2° C. Tuttavia, gli stessi autori hanno individuato come limite di temperatura assoluto i -3 °C. Mizukami e colleghi (1983) affermano che la variazione di temperatura tra notte e giorno è un altro fattore determinante per la produzione di stevioside e che le piante cresciute meglio e con una maggior resa di stevioside sono quelle sottoposte ad un regime di 25 °C di giorno e 20 °C di notte.

3.3 Suolo

La presenza della Stevia in natura si osserva in suoli acidi, poco fertili, sabbiosi, o in terreni pesanti con ampia ritenuta idrica (Shock, 1982). La medesima può essere coltivata in una vasta gamma di terreni, tuttavia, avendo scarsa tolleranza alla salinità, non dovrebbe essere coltivata in terreni salini (Chalapathi *et al.*, 1997). La tipologia di terreno più adatta alla coltivazione della Stevia è quella avente un rifornimento di umidità e drenaggio adeguato (Ramesh *et al.*, 2006). Ciò si verifica, in natura, in zone come i bordi delle pianure fertili dell'Argentina e delle praterie; può altresì crescere anche nelle praterie e nei boschi della macchia mediterranea o ancora sulle aree alpine (Lester, 1999).

4. COLTIVAZIONE

La coltivazione di Stevia è stata segnalata già negli anni '70 (Mitsuhashi *et al*., 1975; Miyazaki *et al*., 1978). Nella fase iniziale della coltivazione, il raccolto di Stevia mostrava molto più vigore rispetto alle popolazioni naturali (Shock, 1982), un fatto che suggerisce che con pratiche di gestione delle colture adeguate ci si potrebbe aspettare un raccolto rigoglioso con il massimo potenziale. Al giorno d'oggi la coltivazione commerciale viene estesa / tentata in Giappone, Asia sud-orientale e Stati Uniti (Sakaguchi e Kan, 1982), ma viene effettuata anche in alcune aree semitropicali, regioni collinari umide himalayane e colline dell'Assam in India (Dwivedi, 1999). Poiché la pianta non sopravvive al clima invernale, viene coltivata in Europa come coltura fogliare in condizioni di serra (Commissione europea, 1999).

Sono stati effettuati vari studi sulla coltivazione, propagazione e selezione di *Stevia rebaudiana* Bert. I fattori da considerare per il sito di semina/trapianto sono:

- la disponibilità di acqua per l'irrigazione: lo stress idrico può indurre la fioritura precoce e quindi ridurre la produzione di foglia, anche se le piante, una volta affrancate, sono molto resistenti e possono sopravvivere per tutta l'estate senza essere irrigate.
- Temperature: sopra i 20 °C si ha una crescita ragionevole ma temperature superiori a 35 °C possono indurre stress termico e ridurre la crescita. La Stevia è tollerante a leggere gelate (non inferiori a - 10 °C). Bassa umidità con temperature elevate vengono difficilmente tollerate.
- Suoli: sono preferiti terreni acidi e leggeri, piuttosto che alcalini. Ristagni idrici in terreni pesanti possono essere tollerati una volta che le piante si sono stabilite.
- Latitudini: latitudini meridionali, con più giornate estive, incoraggiano la produzione vegetale e inibiscono la produzione di fiori, ma questo è compensato dalla stagione di crescita inferiore a causa delle basse temperature invernali

4.1 Propagazione

Generalmente la germinazione dei semi di Stevia è una problematica (Felippe e Lucas, 1971; Randi, 1980; Randi e Felippe, 1981; Rocha e Valio, 1972): i semi seminati a basse temperature hanno mostrato scarsa germinazione.

Alvarez *et al*., (1994) sostiene che non è possibile seminare i semi appena dopo la raccolta, ma è necessario conservarli in contenitori sigillati e alla temperatura di 4 °C, in quanto a

temperatura ambiente perdono vitalità. In alternativa si possono conservare a temperatura ambiente ma con umidità controllata (Cabanillas e Diaz, 1999). Inoltre, gli studi hanno riportato che la germinazione è migliore a 25 ° C (Felippe e Randi, 1984, Randi e Felippe, 1981) e a questa temperatura il 63,2% del totale dei semi germinati (90,03%) si verificava dopo 101,4 ore.

La propagazione della Stevia avviene attraverso **semi** (Fig,4) o **talee** (Fig.5).

Figura 4. Propagazione per semi

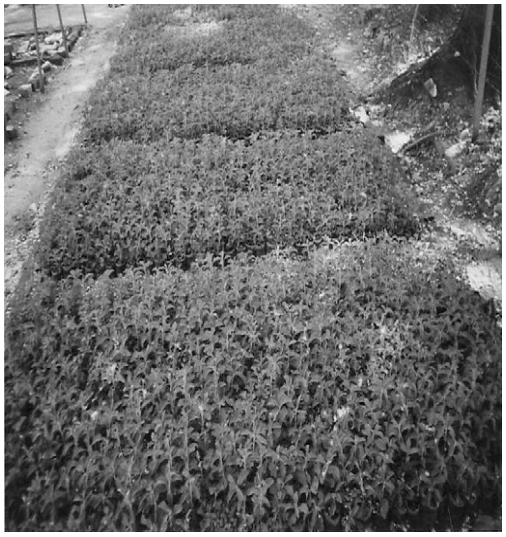

Figura 5. Propagazione per talee

I semi vengono fatti germinare in serra durante la primavera e le piante poi, verso la fine di maggio, vengono trapiantate in campo. Il ciclo di produzione delle plantule è solitamente di 6-7 settimane.

La propagazione per talee presenta diverse problematiche tra cui l'elevato costo. Considerando che spesso la Stevia si coltiva come annuale, l'unico metodo utilizzabile per abbattere i costi è la propagazione delle piante attraverso la semina (Brandle *et al*., 1998). Di avviso opposto sono Ramesh e collaboratori (2006), i quali ritengono che, vista la scarsa germinazione dei semi, la pratica da utilizzare per produrre le piantine che verranno trapiantate in campo è la riproduzione per talea, efficace ma con input di lavoro elevati e la crescita delle piante derivate da talea e il contenuto di steviosidi sono più uniformi rispetto alle piante da seme. Per quanto riguarda la riproduzione per talea, se le talee vengono prese dai germogli dell'anno in corso, la radicazione è del 98 – 100%. La radicazione è del 96,7 se le talee derivano dai germogli laterali e del 92,3% se prelevate dalla parte apicale del germoglio principale (Gvasaliya *et al*., 1990).

La messa a dimora di Stevia va effettuata evitando le condizioni climatiche sfavorevoli alla pronta radicazione. Il periodo estivo non è del tutto adatto, in quanto non si verificano condizioni di umidità del suolo che possono aiutare la radicazione. Inoltre, l'autunno, ovvero una semina tardiva, è sconsigliata in quanto presenta una bassa temperatura e un minor periodo per l'attività vegetativa della pianta (Ramesh *et al.*, 2006). Le piante aumentano la loro produttività quando vengono trapiantate in primavera, in quanto la radicazione e la ripresa vegetativa sono più rapide.

4.2 Impianto

Per quanto riguarda la densità di impianto, essa va valutata in modo da evitare che le piante interferiscano tra loro nella ricezione della luce, tenendo ben presente il tipo di apparato radicale e soprattutto l'ambiente dove è situata la coltura (Ramesh *et al.*, 2006). In Giappone sono stati effettuati diversi studi per testare la densità d'impianto che vanno da 40.000 a 400.000 piante per ettaro (Katayama *et al*., 1976). Le prime prove hanno indicato che sesti d'impianto a bassa densità (60 x 20 cm) facevano aumentare la crescita e la resa; altre prove, dimostrano che con densità superiore (60 x 10 cm) non veniva ridotta la a resa in foglia secca (Murayama *et al*., 1980). Al contrario Lee e collaboratori (1980) sostengono che altezza della pianta, numero di rami e numero di nodi sono influenzati dalla densità d'impianto (50 – 70 cm tra le file e 10 – 30 cm sulla fila), ma la resa delle foglie secche diminuisce con l'aumentare della densità. In accordo con quanto sopra, Donalisio *et al*., (1982) avevano raccomandato una popolazione vegetale di 80.000 - 100,00 0 piante ad ha. È stata anche tentata la riduzione della spaziatura tra le file. Una distanza di 50 x 20 cm (Filho *et al*., 1997) o 45 x 22,5 cm (Chalapathi, 1996) hanno funzionato bene, ma Angkapr adipta *et al*., (1986) ha provato anche una spaziatura ancor più stretta di 25 x 25 cm la quale non è consigliabile considerando l'ampia diffusione radicale della pianta.

Più precisamente, la resa in biomassa fogliare aumenta con l'aumentare della densità fino a 83.000 e 111.000 piante a ettaro per il primo anno di produzione (Brandle *et al.*, 1998). La massima resa di Stevia è stata ottenuta con una spaziatura di 70x25 cm in Abkhazia, Georgia (Gvasaliya *et al*., 1990). Pertanto, è consigliabile effettuare prove in ciascuna zona di impianto per stabilire un'adeguata densità di popolazione di piante per quella particolare area (Fig.6).

Figura 6. Coltivazione sperimentale di Stevia rebaudiana in fase di prefioritura

4.3 Esigenze nutrizionali

Le esigenze di nutrienti della Stevia sono da basse a moderate, in quanto questa coltura è adattabile a suoli poveri, come quelli del suo habitat naturale in Paraguay. Nelle colture estensive atte alla commercializzazione del prodotto, la concimazione si rende necessaria (Donalisio *et al*., 1982; Goenadi, 1985). Questa tesi è rafforzata dalle prove effettuate in Corea, le quali hanno dimostrato che grazie a moderati apporti di fertilizzanti (N, P, K) è aumentata la resa in foglia (Lee *et al.*, 1980). I risultati dal Giappone hanno dimostrato che, al momento del massimo accumulo di sostanza secca, la Stevia da 1,4% N, 0,3% P e 2,4% K (Katayama *et al*., 1976).

I sintomi visivi della carenza di nutrienti in Stevia erano: ingiallimento delle foglie (in mancanza di N), foglie verde scuro (in mancanza di P) e foglie clorotiche e chiazzate con carenza di K. Anche il Mg ha una grande importanza perché dosi non esaustive di esso causano una ridotta crescita dell'apparato radicale.

Deficit di azoto, potassio e magnesio riducono la crescita vegetativa della foglia, e in definitiva determinano una riduzione del valore di mercato della pianta. Le carenze di azoto, fosforo, potassio e zolfo diminuiscono la resa in peso secco della pianta, riducendo il rapporto germogli-radici, mentre la carenza di magnesio aumenta la resa stessa.

Per quanto riguarda le carenze dei micronutrienti si sono riscontrate necrosi apicali, clorosi e necrosi a forma di " V" rovesciata ed infine piccole foglie verde chiaro per Ca, Mg e S rispettivamente. Le informazioni disponibili sono molto scarse, forse per il fatto che Stevia

predilige terreni con pH basso, condizione che assicura l'apporto di micronutrienti; tuttavia, si sono osservate lievi risposte anche in questo tipo di terreni. Esperimenti condotti con soluzioni nutritive indicano che il boro fornito a 10 ppm causa riduzione di crescita, fioritura, peso della radice e macchie fogliari. Poco prima, o durante la fioritura, la produzione di una tonnellata di foglie secche, ha richiesto, 89, 26, 638, 207, e 13 g/ha di B, Cu, Fe, Mn e Zn, rispettivamente. Per la produzione di seme corrispondente a una tonnellata di foglie secche, l'apporto di micronutrienti richiesto è di 226, 76, 2550, 457 e 33 g/ha di B, Cu, Fe, Mn e Zn, rispettivamente (Filho *et al*., 1997).

4.4 Stress biotici

Come tutte le colture estensive, anche per *S. rebaudiana* è necessario un efficace controllo delle malerbe onde evitare perdite ingenti di produzione, ma soprattutto infestazioni in campo di semi indesiderati, i quali provocano danni che si ripercuotono nel tempo, considerando che in paesi come l'Australia la coltura può rimanere nel terreno anche 3 o più anni (Rank e Midmore, 2006). Inoltre, il lento tasso di crescita iniziale delle piantine di Stevia favorisce la concorrenza delle infestanti. Per contrastare questa problematica, oltre all'utilizzo di erbicidi consentiti, si è tentata la lotta alle malerbe tramite l'aumento della densità d'impianto dimostrando che con un elevato numero di piantine per ettaro (200.000 piante/ha) e con l'utilizzo di teli pacciamanti (film plastici di colore nero) si conseguono buoni risultati. Secondo Rank e Midmore (2006), la plastica interferisce con la produzione di germogli secondari, anche se la ricerca sul posizionamento dei fori nei film plastici può ovviare al problema. Inoltre, qualsiasi materiale plastico deve essere di colore bianco sulla pagina superiore, in quanto durante il periodo estivo, con plastica totalmente nera, le piante andrebbero incontro ad un eccessivo calore derivato dall'assorbimento delle radiazioni luminose.

Per quanto riguarda i prodotti erbicidi di sintesi, uno dei più conosciuti e usati, senza apparenti controindicazioni per Stevia, è il Triflularin. Attualmente non ci sono pubblicazioni riguardo a erbicidi sicuri per Stevia (Ramesh *et al*., 2006).

Le avversità che colpiscono *S. rebaudiana* sono: oidio (*Erysiphe cichoracearum* DC), moria dei semenzai (*Rhizoctonia solani* Kuehn.) e marciume del fusto (*Sclerotium dephinii* Welch.) In Canada si sono verificate due importanti malattie fungine, *Septoria steviae* e *Sclerotinia sclerotiorum.* La Septoria è caratterizzata da depressioni e lesioni lucide di color grigio olivo a volte circondate da un alone clorotico che a mano a mano si fondono

rapidamente; mentre la Sclerotinia è caratterizzata da lesioni marroni sulla parte basale del fusto, seguite dalla perdita di turgore ed infine dal crollo completo delle piante attaccate. In india, a Palampur, il marciume radicale ha colpito per lo 0,1% sul totale della coltura (Megeji *et al*., 2005). Thomas (2000) inoltre, ha segnalato infestazioni di insetti come afidi, cocciniglie, ragnetti rossi e aleurodidi.

4.5 Esigenze idriche

La conoscenza del fabbisogno idrico delle colture in diverse fasi di crescita comporta una maggiore resa delle colture e un uso razionale delle risorse idriche. L'habitat naturale di *S. rebaudiana* è caratterizzato da umidità persistente, ma non da inondazioni prolungate, cresce quindi in zone con falde acquifere elevate oppure con terreno costantemente umido (Ramesh *et al*., 2006). Questo è un elemento rilevante, e correlato, nella coltivazione di questa pianta, in quanto suggerisce l'importanza di un'irrigazione ottimale per ricavare delle buone rese. Per le colture di Stevia a fini economici, l'irrigazione risulta essere necessaria (Donalisio *et al*., 1982). Non richiede frequenti irrigazioni, anche se è suscettibile allo stress idrico, inoltre l'acqua di irrigazione non dev'essere di scarsa qualità, a causa della bassa tolleranza della pianta a regimi di pH elevati (Shock, 1982). Con valori di umidità del suolo che vanno dal 43 al 47,6% la crescita di Stevia risulta essere ottimale (Ramesh *et al.*, 2006). Mentre il fabbisogno di acqua al giorno risulta essere di 2,33 mm/pianta. È molto importante l'irrigazione che segue il trapianto, quella prima della raccolta delle foglie quella successiva alla raccolta (Andolfi *et al*., 2002). L'evapotraspirazione media della coltura (ETe) è dell'ordine di 5,75 mm/giorno.

I differenti metodi irrigui prevedono l'irrigazione a pioggia con solchi tra le file oppure con l'ausilio di gocciolatori. I gocciolatori sotto pianta sono l'opzione preferita in quanto permettono irrigazioni più frequenti (e con minor portata) senza irrigare inutilmente l'interfilare, che è sede delle erbe infestanti.

5. PROPRIETÀ DI *STEVIA*

La Stevia è commestibile ed idonea al consumo umano e viene prevalentemente utilizzata per i suoi principi attivi (Glicosidi Steviolici) dal potere fino a 350 volte più dolcificante del comune zucchero.

Le caratteristiche fisico-chimiche più importanti sono contenute nelle foglie della pianta: si tratta di glucosidi di un terpene tetraciclico (sostanza caratterizzata dalla presenza nella sua struttura di 4 unità isopreniche) il cui aglicone è denominato Steviolo. Le foglie di Stevia contengono una miscela di almeno otto diversi glicosidi diterpenici tetraciclici (Brandle *et al*., 1998) quali: stevioside, rebaudioside A, rebaudioside B, rebaudioside C, rebaudioside D e rebaudioside E, dulcoside A e steviolbioside, i cui poteri dolcificanti sono rispettivamente 250-300 volte, 350-450 volte, 300-350 volte, 50-120 volte, 200-300 volte, 250-300 volte, 50-120 volte e 100-125 volte superiori al saccarosio (Crammer e Ikan, 1986). Dei quattro edulcoranti (stevioside, rebaudioside A, rebaudioside C, dulcoside A) che si trovano in concentrazioni maggiori nelle foglie, lo stevioside e il rebaudioside A sono i componenti più dolci della Stevia e si presentano, se raffinati, come una polvere inodore quasi bianca o, se ottenuti mediante estrazione acquosa oppure idroalcolica, come un liquido trasparente. Lo stevioside ha un retrogusto leggermente amaro, simile alla liquirizia, mentre il rebaudioside A possiede una minore astringenza. Poiché, nelle varietà native, lo stevioside costituisce solitamente il 60% del totale dei glicosidi, mentre il rebaudioside A il 30%, si ottiene un effetto complessivo sul gusto che porta nelle stesse un retrogusto di liquirizia.

La Stevia è principalmente nota come edulcorante: da un punto di vista biochimico gli edulcoranti, naturali o di sintesi, vengono classificati in "edulcoranti intensivi" e "edulcoranti polioli" (o di massa), in base al loro potere addolcente. Questo parametro attribuisce ad ogni singola sostanza un determinato valore numerico, calcolato sulla base della capacità dolcificante, prendendo come riferimento il potere edulcorante del saccarosio (posto uguale a 1). I dolcificanti, dal punto di vista chimico, si suddividono in edulcoranti naturali ed edulcoranti sintetici, tra cui il più diffuso e contestato è l'aspartame. Tra i dolcificanti naturali, oltre ai noti fruttosio, sorbitolo, xilitolo, mannitolo, maltitolo, lactitolo e isomalto, troviamo la *Stevia rebaudiana*.

Ma le frontiere della Stevia si spingono ben oltre il potere dolcificante, in quanto studi condotti da oltre 20 anni testimoniano molteplici utilizzi di essa in campo medico: alla Stevia vengono riconosciute proprietà antipertensive, antimicrobiche, anti-iperglicemiche, acariogene e antiplacca, diuretiche e antidiabetiche.

- effetto antiipertensivo: uno studio del 2003 è stato realizzato su 168 pazienti con ipertensione essenziale, ai quali sono state somministrate capsule contenenti 500 mg di stevioside o placebo, 3 volte al giorno, per due anni. I pazienti vennero visitati mensilmente. Dopo 3 mesi, è stato osservato un abbassamento notevole di circa il 10% della pressione sistolica e diastolica nei pazienti che assumevano la Stevia; l'effetto è durato per l'intero periodo osservato, mentre i pazienti trattati con il placebo non hanno mostrato nessun cambiamento significativo ($P< 0,001$).
- azione antimicrobica: la ricerca ha chiaramente dimostrato che *Streptococcus mutans, Pseudomonas aeruginos, Proteus vulgaris* e altri microrganismi non crescono alla presenza dei costituenti non nutritivi della Stevia. Ciò, unitamente al sapore naturalmente dolce dell'erba, fa sì che sia un ingrediente adatto per collutori e paste dentifrice.
- perdita di peso: è evidente che la sostituzione dello zucchero con un edulcorante privo di calorie contribuisce alla riduzione dell'apporto calorico e, conseguentemente, insieme ad un'alimentazione sana e uno stile di vita attivo, favorisce il dimagramento.
- azione ipoglicemizzante: si può affermare che non fornendo calorie la Stevia è intuibilmente un dolcificante che non ha proprietà iperglicemizzanti. La vera sorpresa è stata l'aver scoperto che ha un vero e proprio potere ipoglicemizzante che è stato esaminato in uno studio a lungo termine effettuato su ratti affetti da diabete di tipo 2, ai quali furono somministrati estratti di Stevia (stevioside, purezza 99,6%) per 6 settimane, nella misura di 0,025 g/ Kg di peso corporeo/ giorno. I test di tolleranza al glucosio hanno evidenziato un effetto ipoglicemizzante, una migliorata risposta insulinica e in concomitanza, una riduzione dei livelli di glucagone.
- Essendo priva di zucchero la Stevia non provoca placca e carie dentaria
- Azione antidiabetica: la presenza di stevioside e rebaudoside A sembra influenzare il normale funzionamento delle cellule beta del pancreas le quali hanno il compito di produrre l'ormone insulina che contrasta lo sviluppo del glucosio. I principi attivi della Stevia influenzano queste cellule portandole a produrre una maggiore quantità di insulina, eliminando quindi gli eccessi di glucosio, riportando l'indice glicemico alla normalità.

D’altro canto, il potenziale cancerogeno dello stevioside è di particolare interesse, e una serie di indagini che utilizzano differenti modelli sperimentali sono stati condotte per valutare gli effetti mutageni di stevioside e steviolo. L’analisi genetica batterica ha rivelato che lo stevioside non è mutageno. Nessuna evidenza di cancerogenicità dello stevioside è stata ottenuta da studi in vivo nel topo.

Una preoccupazione in merito all’anti fertilità e agli effetti teratogeni dello stevioside è stata sollevata dopo che è stato dimostrato che decotti di Stevia diminuiscono il tasso di nati vivi nei ratti, tuttavia, studi successivi per confermare questo risultato hanno dato esito negativo (Sincholle e Marcorelles, 1989).

Pezzuto e collaboratori (1985) hanno riferito che lo steviolo metabolicamente attivo è mutageno, un risultato che è stato confermato in un altro studio più recente (Matsui *et al*., 1996). Tuttavia, il metabolita steviolo mutageno non è ancora stato identificato e non è noto se l'attivazione dello steviolo si verifichi effettivamente negli esseri umani. Soejarto (1985) e Kinghorn (1992) hanno concluso che le foglie di stevia e lo stevioside sono sicuri per il consumo umano.

A causa del potenziale rischio mutagenico delle molecole degli estratti di Stevia, la commercializzazione e l’utilizzo dei suoi estratti ha subito un blocco. In Europa si è avuto il blocco totale nel 2002 sia come erba tal quale che come derivati. L’unico utilizzo ammesso nella Comunità Europea è come pianta ornamentale. Il primo Paese europeo che ha commercializzato Stevia come additivo alimentare è stato la Francia, grazie a una direttiva che consentiva l’approvazione, in un singolo Stato membro, di additivi alimentari per un periodo di due anni (Tedone *et al*., 2011). Successivamente l’Autorità Garante sulla Sicurezza Alimentare (EFSA) in data 14 aprile 2010 ha permesso l’uso di Stevia come additivo alimentare (EFSA, 2010).

L’utilizzo della Stevia e dei suoi derivati è stato ammesso dalla Unione Europea, come per l’Italia (Regolamento UE N. 1131/2011 della Commissione dell’11 novembre 2011). La dose giornaliera ammissibile per i glicosidi steviolici è pari a 4 mg/kg peso corporeo (European Food Safety Authority [EFSA], 2010). Si tratta, comunque, di dosi basse e non facili da rispettare. Se pensiamo, ad esempio, ad una bustina monouso di estratto (che in genere pesa 1 g) che possiamo trovare al bar ed utilizzare per addolcire un caffè, consumandola una persona adulta di 70 kg assume una dose di 14.3 mg/kg di glicosidi steviolici, ben superiore alla dose massima ammissibile.

6. IL PANORAMA VARIETALE

La Stevia è ampiamente consumata, da secoli, nei paesi sudamericani e da alcuni decenni nei paesi asiatici; pertanto sono state sviluppate e selezionate molte varietà e cultivar.

Oggi in commercio si trovano quindi **diverse varietà di Stevia**, tutte appartenenti alla specie *Stevia rebaudiana* Bertoni, che si caratterizzano per:

- provenienza e origine
- concentrazione dei principi attivi dolcificanti
- resistenza alla siccità ed agenti atmosferici
- fabbisogno idrico

Dal punto di vista della produzione le varietà e cultivar principali sono la "Criolla", la "Morita" e la "Eirete":

Native Variety (Criole/Criolla): è il ceppo originario ed ha un sapore meno dolce rispetto ad altre (Reb A >15% da cui dipende il sapore dolce, Steviosides: >70% da cui dipende il sapore amarognolo tipo liquirizia), è però la più resistente alla mancanza d'acqua ed è utilizzata da secoli dalle popolazioni sudamericane per le proprietà medicinali

Stevia Eirete: è un ibrido sviluppato in Paraguay per la coltivazione intensiva: ha un potere dolcificante maggiore della Native ed ha una crescita omogenea adatta alla coltivazione in pieno campo

Stevia Morita II: selezionata per ottenere maggiore concentrazione di Reb A, ha un potere dolcificante maggiore della Native (Re A >55%, Steviosides >15%) ma è più sensibile alla mancanza d'acqua

Stevia Morita III: deriva dalla II, ha stesso sapore dolce, ma ha meno bisogno di acqua, con un risparmio del 20% in consumo idrico

Katupyry: varietà selezionata recentemente in Paraguay per la coltivazione in suoli aridi e dotata di elevato potere dolcificante. (http://www.vivaiostevia.it/la-stevia/le-varieta.html)

7. INFLUENZA DI DIVERSI FATTORI SULLA PRODUTTIVITÀ DI STEVIA

La principale caratteristica che denota la qualità della pianta di Stevia è il suo contenuto di glicosidi steviolici cioè componenti dolcificanti che comprendono dieci diversi glicosidi tra cui lo stevioside e il rebaudioside A, che corrispondono a più del 70% dei glicosidi presenti nelle foglie di Stevia. L'apporto totale dei glicosidi steviolici ammonta al 8-10% del peso secco della foglia.

La dolcezza della Stevia è dunque attribuibile alla presenza dei glicosidi, che sono dei composti solubili in acqua, con un potere edulcorante circa trecento volte maggiore dello zucchero di canna.

Altre importanti caratteristiche da osservare per la valutazione della produttività della Stevia sono legate a:

Altezza della pianta

Numero di foglie

Area fogliare

Peso secco e fresco delle foglie

7.1 Fattori genetici

La produttività e la qualità della *Stevia rebaudiana*, differisce in base al genotipo utilizzato durante l'impianto della coltura.

In Francia sono state osservate e confrontate le prestazioni di quindici genotipi (Tabella 1) di *Stevia rebaudiana* in base al contenuto di biomassa secca e di glicosidi steviolici. Questo studio indaga le prestazioni di quindici cloni di diversa origine al secondo anno di produzione, nelle condizioni ambientali della Francia sud-occidentale.

Tre genotipi sono stati forniti dalla banca del gene EUSTAS (Hortilab, Telgte, Germania). Questi genotipi sono già stati valutati in condizioni reali sul campo in Europa (Lankes and Grosser, 2015). Undici genotipi provengono dalla collezione OVIATIS (Lacaussade, Francia) e sono stati precedentemente selezionati da fornitori in Argentina, Paraguay, Spagna e Israele.

L'ultimo dei quindici genotipi era proveniente dal Paraguay ed era di tipo "Eirete".

I genotipi della banca genetica EUSTAS e la raccolta OVIATIS provenivano da talee in vitro e sono stati prodotti come cloni in condizioni di serra parzialmente regolate per 7 settimane e poi trapiantate sul campo alla fine di giugno 2016.

Tabella 1. Risorse genetiche di S. rebaudiana studiate in condizioni di campo nel Sud-Ovest della Francia: fornitore, paese del fornitore, nome delle risorse genetiche, anno di raccolta, tipo di materiale vegetale utilizzato e origine prima della selezione

Provider	Country	Name	Year of collection	Plant material	Origin before selection
EUSTAS gene bank	Germany	C	2016	In vitro cuttings	Colombia
		Gawi	2016	In vitro cuttings	Unknown
		D	2016	In vitro cuttings	Paraguay
OVIATIS collection	France	E161718	2011	In vitro cuttings	Argentina
		E8	2011	In vitro cuttings	Argentina
		EspLac1	2013	In vitro cuttings	Spain
		EspLac2	2013	In vitro cuttings	Spain
		FP	2011	In vitro cuttings	Argentina
		GF	2014	In vitro cuttings	Argentina
		S6030-1	2015	In vitro cuttings	Israel
		Lac4	2013	In vitro cuttings	Argentina
		Larrère	2013	In vitro cuttings	Argentina
		Septo4	2014	In vitro cuttings	Argentina
		Septo5	2014	In vitro cuttings	Argentina
SteviaStore	Paraguay	Eirete	2015	Cuttings	Paraguay

Le piante sono state trapiantate manualmente su dodici file ed è stata installata la pacciamatura in plastica con irrigazione a goccia.

Le prestazioni genotipiche sono state studiate durante il secondo anno di produzione. La raccolta delle piante è stata condotta nella fase di fioritura nel settembre 2017.

Sono stati misurati il numero di steli principali, altezza della pianta e diametri est-ovest e nord-sud. Dopo la misurazione, le piante sono state tagliate a mano a circa 10 cm dal suolo e le biomasse aeree sono state raccolte. Foglie e steli freschi sono stati separati a mano prima di essiccarli a 40 ° C per 60 ore. Per ciascun genotipo, è stata calcolata la resa di glicosidi steviolici (SG) espressa in g / pianta (figura 7A), il loro contenuto (in %) e il peso secco delle foglie (figura 7B-C)

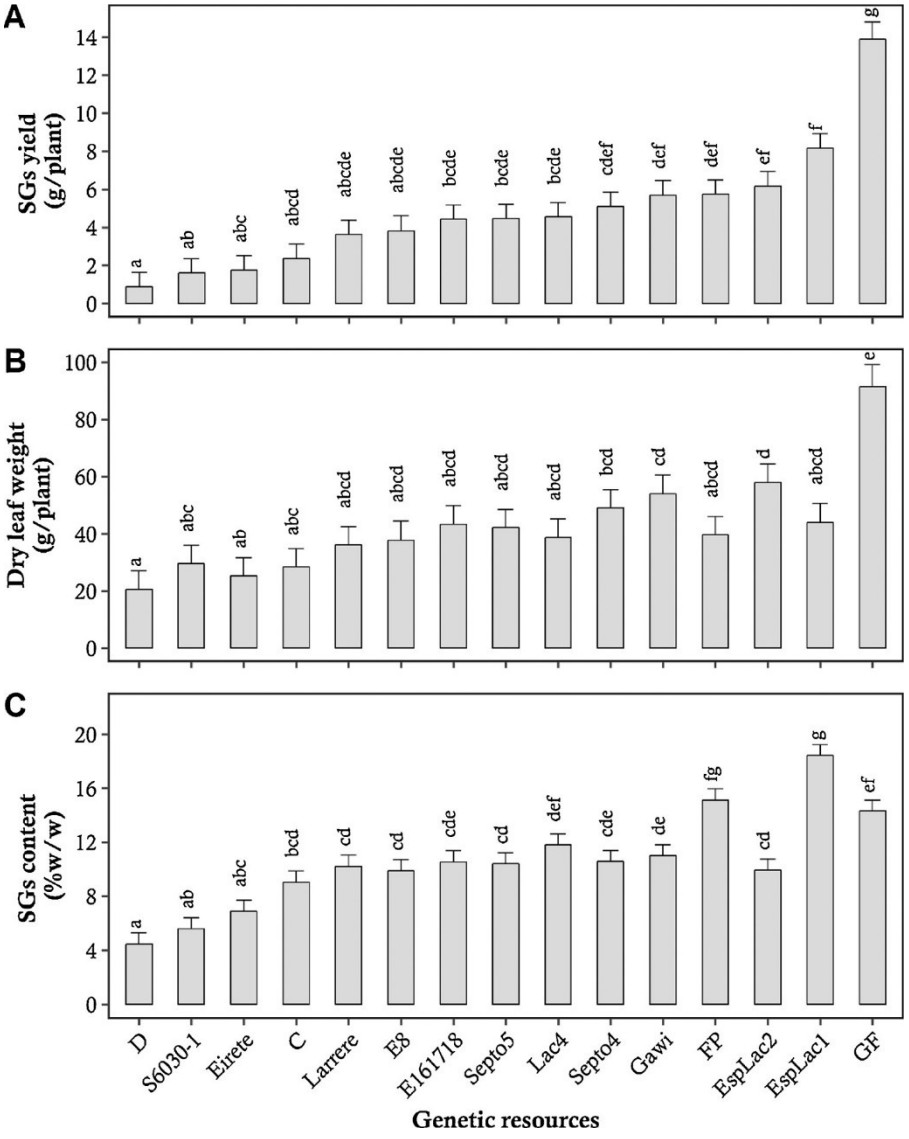

Figura 7. Resa dei genotipi di S. rebaudiana durante la raccolta nella fase di fioritura ottenuta in condizioni di campo a Liposthey (Francia): resa SG espressa in g / pianta (A), peso fogliare secco espresso in g / pianta (B) e SG contenuto espresso in% p / p (C).

A seconda del genotipo, le rese di SG variavano da 0,9 g / pianta per il genotipo "D" a 13,9 g / pianta per il genotipo "GF", corrispondente a una variabilità di 15 volte.

L'analisi di comparazione tra tutti i genotipi ha rivelato che la resa di SG peggiore osservata in "D", "S6030-1" ed "Eirete" variava da 0,9 a 1,8 g / pianta ed era significativamente diversa da quella di "EspLac1", " EspLac2 "," FP "e" Gawi ", le cui rese SG erano notevolmente più elevate e variavano da 5,7 a 8,2 g / pianta. Il genotipo con la maggior resa di glicosidi steviolici è "GF" con 13,9 g / pianta, risultato significativamente differente dal resto delle risorse genetiche.

I genotipi sono stati anche confrontati in base al peso delle foglie secche espresso in g / pianta (Figura 7B). Il peso delle foglie secche ha mostrato un'ampia variabilità che ha spaziato da 20,5 a 91,5 g di foglia secca / pianta. Tra le risorse genetiche studiate, solo "GF" ha mostrato una differenza significativa rispetto alle altre. Nelle condizioni di campo dell'esperimento, questo genotipo era il miglior produttore di biomassa fogliare con circa 3.000 kg di foglia secca / ha. Fatta eccezione per "FP" e "EspLac1", la distribuzione dei genotipi era circa la stessa per quanto riguarda il peso secco delle foglie (Fig.7B) e la resa di SG (Figura 7A).

Tra i genotipi, il contenuto totale di SG variava tra il 4,5 e il 18,4% in peso (figura 7C), segno di un'ampia variabilità in *S. rebaudiana*. Per questo parametro, "EspLac1" presentava un contenuto di SG significativamente più alto (18,4% in peso / peso netto) ed era significativamente diverso dal resto delle risorse genetiche, ad eccezione di "FP" e "GF" con quantità SG di 15,1 e 14,33% peso/peso secco fogliare rispettivamente. Sei genotipi tra cui "Lac4", "Gawi", "E161718", "Septo4", "Septo5" e "Larrere", presentavano un contenuto intermedio di SG compreso tra l'11,8 e il 10,2% in peso, mentre i genotipi "D", "S6030-1" ed "Eirete", avevano il contenuto più basso di SG con meno del 7% in peso (figura 7C).

Le differenze che si osservano possono essere in parte attribuite all'effetto genotipo ma è stato anche descritto che il contenuto di SG è fortemente influenzato dalle condizioni pedoclimatiche, dall'età dello stand di piante e dalla sua fase di sviluppo.

Importante in questo esperimento è stata anche la valutazione della composizione dei glicosidi steviolici, fondamentale per valutare il potenziale economico del genotipo in base alla presenza di glicosidi legati al gusto dolce (RebA, RebD, RebM, RebB) rispetto a quelli legati al gusto amaro (ST, RebC, DulA, Rub, SB).

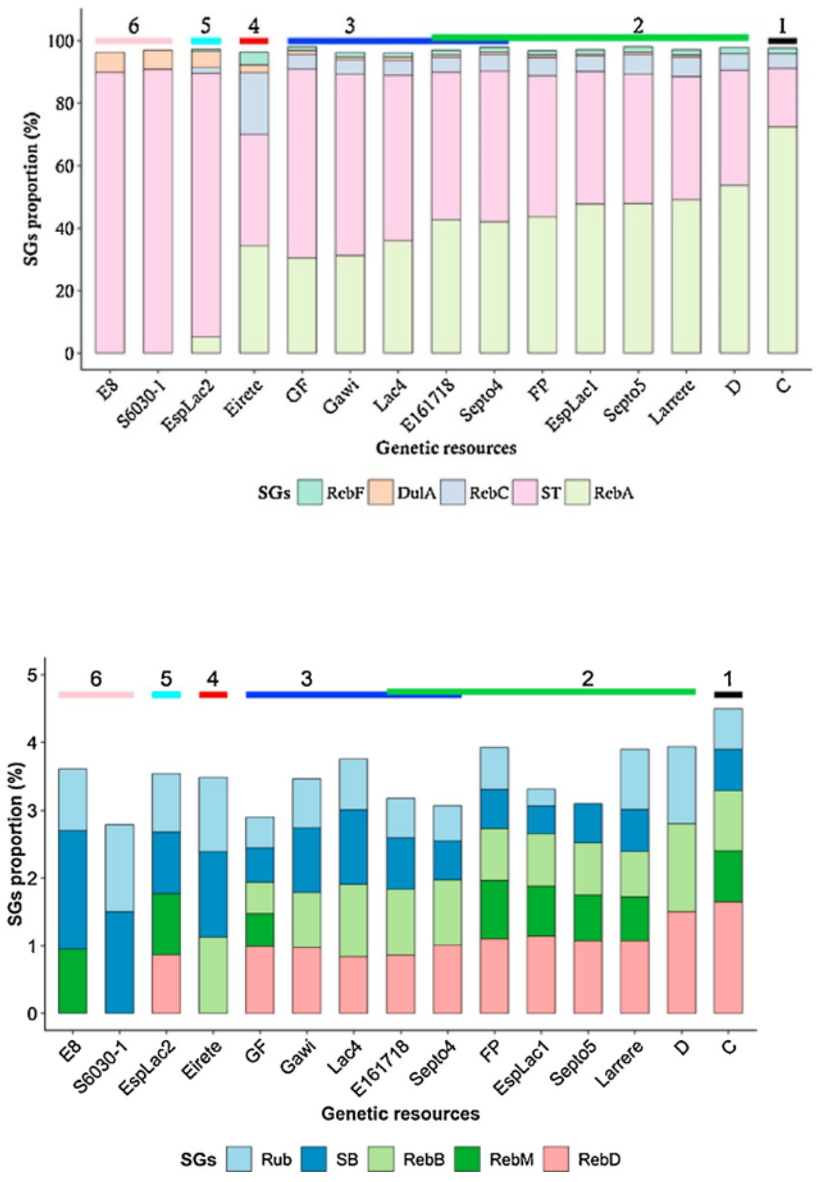

Figura 8. Proporzione di SG per 15 genotipi studiati classificati in base ai risultati HCPC (Hierachical Clustering on Principal Component). Le barre orizzontali sopra gli istogrammi rappresentano i cluster(gruppi).

Il genotipo "C" sembrava essere il migliore in termini di SG legati al sapore dolce con il 72% di RebA e un rapporto RebA / ST di 3.9. È interessante notare che questo genotipo mostrava anche un alto livello di RebM e RebD di SG (2,5%; Fig. 8), che possono contribuire alla sua qualità gustativa. Gli altri genotipi sono stati discriminati dal loro rapporto RebA / ST

(Fig. 8), compreso tra 1,47 e 0,87 per il gruppo 2, da 0,97 a 0,5 per il gruppo 3. "EspLac2" (cluster 5) ha mostrato una grande percentuale di ST (84%). I genotipi del gruppo 6 ("E8" e "S6030-1") non avevano alcun RebA, RebF e RebC. Secondo i risultati della prova, i genotipi appartenenti ai gruppi 1 e 2 hanno mostrato il maggiore potenziale economico, grazie alla loro più alta percentuale di RebA.

In questo studio, si è osservato un genotipo particolarmente interessante, "C" della collezione EUSTAS, che accumula il 72% di RebA tra gli SG totali ma anche una quantità significativa di RebM e D che regalano un'elevata dolcezza. La composizione chimica è determinata dal genotipo ed è scarsamente influenzata dall'ambiente. Il confronto della composizione del genotipo "C" su siti e anni dimostra che i profili SG sono stabili. Nel primo anno di produzione, il genotipo "C" ha raggiunto il 71% di RebA tra gli SG totali in un esperimento sul campo in Francia (Hastoy *et al*., 2016) e circa il 75% in Portogallo (Lankes and Grosser, 2015). Nel secondo anno di produzione, "C" ha mostrato il 72% di RebA in Francia e circa il 69% in condizioni danesi (Grevsen e Sorensen, 2016).

7.2 Fattori nutrizionali

La crescita e la resa di Stevia sono influenzate in maniera significativa dalla disponibilità e dalla quantità dei nutrienti ai quali è sottoposta. Le prove di questo sono state osservate in numerosi esperimenti tra cui quello svolto nel Dipartimento di Agronomia dell'Università di Scienze Agrarie, in India, nel periodo dal 2004-05 al 2005-06 da Y. R. Aladakatti, Y. B Palled, M. B. Chetti, S. I. Halikatti, S. C. Alagundagi, P. L. Patil, V. C. Patil e A. D. Janawade, intitolato "Effect of nitrogen, phosphorus and potassium levels on growth and yield of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni.)".

L'esperimento è stato condotto per valutare la risposta della Stevia a diversi livelli di azoto, fosforo e potassio, su un terreno argilloso con elevata capacità di ritenzione idrica (78%), pH pari a 8, carbonio organico dello 0,64% e N disponibile, P_2O_5 e K_2O rispettivamente di 285 kg ha^{-1}, 26 kg ha^{-1} e 620 kg ha^{-1}. La prova consisteva nel sottoporre le colture a 3 livelli di azoto (N1 - 200 kg ha^{-1}, N2 - 300 kg ha^{-1}, N3 - 400 kg ha^{-1}), 3 livelli di fosforo (P1 - 100 kg ha^{-1}, P2 - 150 kg ha^{-1}, P3 - 200 kg ha^{-1}) e 2 livelli di potassio (K1 - 100 kg ha^{-1}, K2 - 200 kg ha^{-1}).

Le piantine di Stevia di due mesi sono state piantate con una spaziatura comune di 30 cm x 30 cm il 24 giugno 2004 e i nutrienti N, P, K sono stati applicati una settimana dopo il trapianto sottoforma di urea, di-ammonio fosfato (DAP) e muriato di potassio (MOP) rispettivamente.

Le piantine sono state mantenute per due anni e successivamente sono state tagliate uniformemente 10 cm sopra il livello del suolo e la biomassa verde è stata essiccata. Le foglie di Stevia essiccate sono state tolte dal gambo e asciugate separatamente sotto la luce del sole per un giorno e conservate in sacchi di iuta puliti.

I dati raccolti hanno rivelato che l'aumento dei livelli di azoto da 200 kg ha^{-1} (N1) a 400 kg ha^{-1} (N3) ha provocato un progressivo aumento dell'altezza delle piante, del numero di rami e foglie delle piante (Tabella 2). N3 cioè 400 kg ha^{-1} ha registrato un'altezza delle piante significativamente più alta (57,00 cm) e il numero massimo di rami (52,5) e di foglie (847,7) per pianta. La dose di azoto di 200 kg ha^{-1}(N1) ha registrato l'altezza della pianta più bassa (49,58 cm), con il minor numero di rami (43,8) e di foglie (750,4) per pianta.

Anche l'aumento dei livelli di fosforo ha provocato una crescita dell'altezza della pianta, del numero di rami e foglie delle piante. La minor dose di fosforo P2 (150 kg ha^{-1}) ha registrato l'altezza della pianta, il numero di rami per pianta e il numero di foglie per pianta di 53,72 cm, 49,3 e 817 rispettivamente, che erano alla pari con i parametri registrati con P3 cioè 200 kg ha^{-1} (56,1 cm, 51,1 e 843,4).

I livelli di potassio non hanno influenzato in modo significativo nessuno dei tre parametri calcolati, al momento del raccolto.

Tabella 2. Parametri di crescita della Stevia al momento della raccolta, influenzati dal programma di irrigazione e dalla geometria delle piante

*Treatment	Plant height at harvest (cm)			Number of branches plant $^{-1}$			Number of leaves plant $^{-1}$		
	2004-05	2005-06	Pooled	2004-05	2005-06	Pooled	2004-05	2005-06	Pooled
Nitrogen levels (N)									
N_1 (200 kg ha^{-1})	50.6	48.5	49.6	39.9	47.7	43.8	728.8	772.0	750.4
N_2 (300 kg ha^{-1})	55.2	53.6	54.4	46.5	54.7	50.2	805.0	844.2	824.6
N_3 (400 kg ha^{-1})	57.9	56.0	57.0	48.5	56.5	52.5	825.2	870.1	847.7
S.Em.±	0.91	0.92	0.94	0.53	0.73	0.85	11.95	13.35	12.55
C.D. (P=0.05)	2.63	2.65	2.72	1.54	2.12	2.46	34.35	38.37	36.08
Phosphorous levels (P)									
P_1 (100 kg ha^{-1})	51.9	50.4	51.20	41.9	50.2	46.1	740.7	783.5	762.1
P_2 (150 kg ha^{-1})	54.8	52.6	53.7	45.2	53.3	49.3	794.7	839.3	817.0
P_3 (200 kg ha^{-1})	57.0	55.1	56.1	47.8	55.3	51.1	823.4	863.4	843.4
S.Em.±	0.91	0.92	0.94	0.53	0.73	0.85	11.95	13.35	12.55
C.D. (P=0.05)	2.63	2.65	2.72	1.54	2.12	2.46	34.35	38.37	36.08
Potassium levels (K)									
K_1 (100 kg ha^{-1})	53.9	52.1	52.9	44.3	52.3	48.1	776.7	820.9	798.8
K_2 (200 kg ha^{-1})	55.3	53.4	54.3	45.7	53.6	49.5	795.9	836.5	816.2
S.Em.±	0.74	0.61	0.64	0.44	0.60	0.54	9.76	10.90	10.25
C.D. (P=0.05)	NS	NS	NS	1.26	NS	NS	NS	NS	NS
Absolute control	40.5	36.6	38.6	24.3	21.9	23.1	319.8	307.9	313.8
Control v/s Treatment									
S.Em.±	2.26	1.83	1.93	1.28	1.77	1.60	28.62	31.81	29.96
C.D. (P=0.05)	6.49	5.25	5.54	3.69	5.10	4.60	82.10	91.22	85.94
All interactions	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

2004-05 : average of first five cuttings 2005-06 : average of next consecutive five cuttings Pooled : Average of 1 to 10 cuttings

Come è possibile osservare, il controllo assoluto, non disponendo delle sostanze nutritive, ha registrato un'altezza della pianta significativamente più bassa (38,6 cm), il minor numero di rami (23,1) e foglie per pianta (313,8) (Tabella 2).

L'altezza della pianta alla raccolta quindi è stata significativamente influenzata da livelli più alti di azoto, fosforo e potassio che a loro volta erano responsabili di un numero maggiore di rami e numero di foglie per pianta, che si traducevano in una maggiore resa fogliare.

Questi risultati sono in accordo anche con quelli ottenuti dagli esperimenti effettuati da Chalapathi *et al*., (1999) a Bangalore, Buana e Goenadi (1985) in Brasile e Kawatani *et al*., (1980) in Giappone;

I vari fattori nutrizionali sono incisivi anche per la valutazione di ulteriori parametri, riportati nella tabella qui sotto, cioè la resa cumulativa della biomassa fresca, la resa delle foglie fresche e la resa fogliare secca della Stevia (Tabella 3).

Tabella 3. Resa di biomassa fresca, foglie fresche e foglie secche di Stevia influenzata da diversi livelli di nutrienti.

*Treatment	Fresh biomass yield(t ha^{-1})			Fresh leaf yield (t ha^{-1})			Dry leaf yield (t ha^{-1})		
	2004-05	2005-06	Pooled	2004-05	2005-06	Pooled	2004-05	2005-06	Pooled
Nitrogen levels (N)									
N_1 (200 kg ha^{-1})	72.59	79.14	75.87	38.29	40.09	39.19	9.24	9.76	9.50
N_2 (300 kg ha^{-1})	84.07	91.61	87.84	43.96	46.86	45.41	10.66	11.22	10.94
N_3 (400 kg ha^{-1})	87.25	96.56	91.90	45.72	49.18	47.45	11.12	11.72	11.42
S.Em.±	1.37	1.09	1.48	0.78	0.83	0.74	0.23	0.18	0.19
C.D.(P=0.05)	3.95	3.13	4.28	2.25	2.40	2.14	0.65	0.53	0.53
Phosphorous levels (P)									
P_1 (100 kg ha^{-1})	76.47	81.79	79.13	40.18	41.72	40.95	9.68	10.06	9.87
P_2 (150 kg ha^{-1})	82.04	91.17	86.61	43.19	46.67	44.93	10.52	11.18	10.85
P_3 (200 kg ha^{-1})	85.04	94.35	89.87	44.60	47.73	46.17	10.83	11.46	11.14
S.Em±	1.37	1.09	1.48	0.78	0.83	0.74	0.23	0.18	0.19
C.D.(P=0.05)	3.95	3.13	4.28	2.25	2.40	2.14	0.65	0.53	0.53
Potassium levels (K)									
K_1 (100 kg ha^{-1})	80.22	87.48	83.85	42.08	44.70	43.39	10.19	10.73	10.78
K_2 (200 kg ha^{-1})	82.39	90.73	86.56	43.23	46.05	44.64	10.49	11.07	10.46
S.Em.±	1.12	0.89	2.01	0.63	0.59	0.57	0.19	0.13	0.15
C.D.(P=0.05)	NS	2.56	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Absolute control	36.61	33.48	35.04	17.14	14.86	16.00	4.70	3.76	4.23
Control v/s Treatment									
S.Em.±	3.29	2.61	2.76	1.87	1.73	1.67	0.54	0.39	0.44
C.D.(P=0.05)	9.45	7.5	7.92	5.37	4.97	4.79	1.55	1.12	1.27
All interactions	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

La più alta resa di biomassa fresca (91,9 t ha^{-1}), resa fogliare fresca (47,45 t ha^{-1}) e resa delle foglie secche (11,42 t ha^{-1}) sono state registrate con un livello di azoto pari a N3, ovvero 400 kg ha^{-1} , alla pari con N2 cioè 300 kg ha^{-1} ed entrambi erano superiori a N1. Il livello di fosforo P3 (200 kg ha^{-1}) ha registrato la più alta biomassa fresca (89,87 t-ha^{-1}), resa fogliare fresca (46,17 t ha$^{-1)}$ e resa foglia secca (11,14 t ha^{-1}) che erano alla pari con P2 cioè 150 kg ha^{-1} (86,61 t ha^{-1}, 44,93 t ha^{-1}, 10,85 t ha^{-1} rispettivamente), ma superiore a P1.

La dose di K non influenzava particolarmente nessuno dei tre parametri, come in precedenza.

Una maggiore quantità di biomassa fresca, resa fogliare fresca e resa fogliare secca della Stevia con livelli di nutrienti N, P e K più elevati potrebbero essere attribuiti al numero maggiore di rami e foglie per pianta di Stevia e ovviamente alla più elevata altezza della pianta.

La biomassa fresca significativamente inferiore (35,04 t ha^{-1}) è stata ottenuta con il controllo assoluto rispetto a tutti gli altri trattamenti applicati con sostanze nutritive, a causa del minor numero di rami e foglie per pianta. In conformità a questi risultati, la crescita e la

resa di Stevia sono aumentate in modo significativo con l'aumento dei tassi di N, P e K fino a 60:30:45 kg ha^{-1} per coltura con il più alto rendimento di foglie secche che era pari a 40:20:30 kg ha^{-1} per coltura.

Quindi, nonostante la Stevia sia originaria di paesi con basse disponibilità nutritive e quindi si adatta bene a terreni poveri, una moderata presenta di elementi garantisce un aumento della crescita e della qualità della pianta, soprattutto per quanto riguarda l'azoto.

Un'ulteriore prova di questo, è stata fornita dall'Univerisità di Queensland, in Australia, con un esperimento che valutava la risposta delle piante di Stevia all'omissione di nutrienti durante la loro crescita, osservando in particolare la concentrazione e il contenuto di glicosidi steviolici per pianta. La composizione della soluzione nutritiva completa era: N (10.054 mmol), P (1.17), K (3.36), Ca (3.35), Mg (1.5), S (1.5), Fe (0,51), Mn (0,01), Cu (0,0012), M0 (0,0002), B (0,323), Zn (0,0022), Cl (0,1767) e Na (0,0005)

Tabella 4. Effetto delle diverse carenze nutrizionali su stevioside e Reb-A, concentrazione totale delle foglie e contenuto SG totale delle foglie di Stevia al momento del raccolto (a quattro settimane dopo i trattamenti imposti).

Treatments	Stevioside (% dw)	Reb-A (% dw)	Total SG (stevioside + Reb-A) (% dw)	Total SG leaf content (mg/ plant)
no Zn	7.8 a	4.2 a	12.1 a	350.0 ab
no P	7.2 ab	3.5 a	10.7 a	18.3 d
no N	6.4 abc	2.4 a	9.0 ab	38.6 d
no Cl	6.1 abcd	3.0 a	9.2 ab	314.5 abc
no Mn	6.0 abcd	3.5 a	9.6 ab	323.0abc
no S	6.0 abcd	3.1 a	9.2 ab	78.2 cd
no Fe	5.6 abcd	3.9 a	9.6 ab	109.6 bcd
complete	5.2 bcde	3.6 a	8.9 ab	379.7 a
no B	5.1 bcde	3.4 a	8.6 ab	198.6 abcd
no Mo	5.1 bcde	3.7 a	8.9 ab	414.3 a
no NPK	4.7 bcde	1.3 a	6.1 bc	14.3 d
no Ca	4.3 cdef	3.7 a	8.1 bc	96.1 cd
no K	4.0 cdef	2.4 a	6.5 bc	209.3 abcd
no Mg	3.8 def	2.1 a	5.9 bc	125.0 bcd
no micro	2.8 ef	1.1 a	4.0 c	20.8 d
no Cu	1.9 f	1.1 a	3.0 c	116.8 bcd

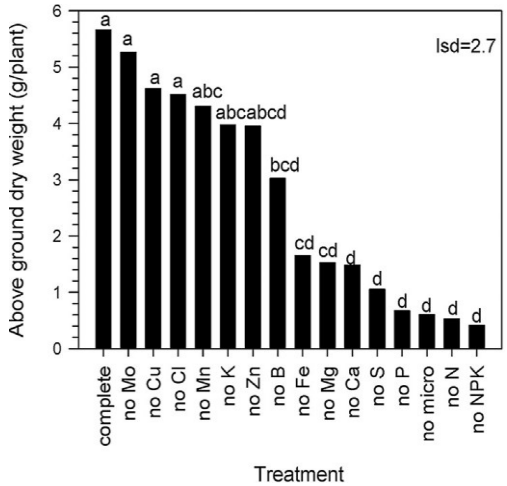

Figura 9. Biomassa totale fuori terra della stevia (g / pianta) coltivata con diverse carenze nutrizionali. Piante raccolte dopo 4 settimane di trattamento. I trattamenti con la stessa lettera non differiscono in modo significativo.

Come si osserva dalla tabella 4 la mancanza di N non ha ridotto la concentrazione di SG (sebbene non l'abbia aumentata, almeno non per Reb-A) ma, a causa del suo marcato effetto negativo sulla biomassa, il contenuto di SG per le piante in deficienza di N era 10 volte inferiore a quello del controllo. Ciò implica che, coerentemente con l'ipotesi del bilancio del carbonio-nutriente (Herms and Mattson, 1992), poiché la disponibilità di N diventa limitata, il rapporto C: N più elevato porterebbe ad una maggiore concentrazione di composti a base di carbonio e la sintesi della clorofilla è ridotto a favore dell'accumulo prolungato di SG.

Il contenuto di SG nelle piante in deficienza di P è risultato ancora più inferiore rispetto a quello degli impianti a deficienza di azoto; era 20 volte inferiore a quella del controllo (Tabella 4).

Nelle piante carenti in K né la concentrazione di SG della foglia, né il contenuto complessivo di SG delle foglie è significativamente diverso da quello del trattamento completo, risultato che conferma l'ininfluenza positiva del K.

Infatti, la riduzione di qualsiasi macronutriente, ad eccezione di K, ha portato ad una marcata diminuzione del contenuto di SG nelle piante.

La carenza di Fe non ha influito sulla concentrazione di SG rispetto al controllo, questo perché la biomassa era marcatamente ridotta, così come il contenuto di SG per pianta (Tabella 4). Al contrario, la biomassa in impianti privi di Cu non è diminuita rispetto a quella del controllo, ma la concentrazione di SG per pianta era minore rispetto al controllo (Tabella 4).

Il trattamento con il deficit di zinco era l'unico con una concentrazione di stevioside per foglia significativamente più alta di quella del controllo (Tabella 4). Il contenuto di SG per pianta priva di Zn non differiva da quello del controllo perché era determinata da una biomassa inferiore. Lo stesso è stato per i trattamenti privi di Cl, Mn e Mo.

La biomassa totale fuori terra di Stevia cresciuta in soluzione senza i micronutrienti Mo, Cu, Cl, Mn e Zn e il macronutriente K, non differiva significativamente dalle piante coltivate nel trattamento completo dei nutrienti (Fig. 9).

Per quanto riguarda la composizione dei glicosidi steviolici, una maggiore concentrazione di Reb-A rispetto ad altri steviosidi è auspicabile dall'industria dei dolcificanti grazie al suo gusto più favorevole. Per la maggior parte dei trattamenti nell' esperimento, incluso il controllo dei nutrienti completo, la concentrazione di Reb-A era almeno del 50% rispetto a quella di stevioside (Tabella 4). Le eccezioni a questo erano i trattamenti privi di N, P, NPK o di tutti i micronutrienti in cui Reb-A era meno della metà del totale di SG questo a causa del

fatto che molto probabilmente la mancanza di N sopprime le glicosiltrasferasi dipendenti da UDP responsabili della trasformazione dello stevioside in Reb-A.

7.3 Fattori ambientali

7.3.1 Tipo di suolo

Terreni di diverso tipo influenzano la produzione vegetale in base alla loro capacità di fornire nutrienti per soddisfare i requisiti delle piante. Il suolo fornisce supporto fisico alle piante e elementi idrici e nutritivi necessari per la crescita e lo sviluppo di esse. La Stevia è stata coltivata in vasi di terracotta in alcuni terreni del Bangladesh per scegliere il / il terreno / i più adatto per la sua crescita e la resa fogliare. L'esperimento intitolato "Growth parameters and leaf biomass yield of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) as influenced by different soil types of Bangladesh" è stato condotto presso il Dipartimento di Chimica Agraria dell'Università di Bangladesh, Mymensingh, nel periodo da marzo a maggio 2010 da M. M. Zaman, M. A. H. Chowdhury e Tanzin Chowdhury**.** Sette tipi di suolo sono stati raccolti da diverse località del Bangladesh: acido, calcareo, non calcareo, carbone, terre saline, torba e suolo solfato acido. Una piantina di Stevia è stata piantata in ogni vaso durante la prima settimana di marzo 2010. L'esperimento è stato impostato con uno schema completamente randomizzato (CRD) con tre repliche. Il numero totale di vasi era 27 (9 trattamenti X 3 repliche). Le piante sono state raccolte a 60 DAP (days after planting), pulite, essiccate in forno a 60 ° C per 72 ore. Sono stati studiati l'altezza della pianta, i rami per pianta, le foglie per pianta, l'area delle foglie, il peso fogliare fresco e secco della Stevia.

Le proprietà fisiche dei diversi tipi di terreno in esame sono state presentate nella Tabella 5. I risultati indicano che la maggior parte dei terreni era di colore grigio chiaro tranne il terreno acido e torba che erano rispettivamente rossastro e nerastro. La maggior parte dei suoli erano argillosi ad eccezione del terreno non calcareo e dei terreni carboniosi che erano argillosi-sabbiosi. La densità apparente, la densità delle particelle e la capacità del campo variavano rispetto ai terreni e variavano tra 1,24-1,45, 2,20-2,58 e 27,03-30,19%, rispettivamente.

Tabella 5. Proprietà fisiche dei diversi tipi di suolo del Bangladesh utilizzati per la coltivazione della Stevia

Types of soil	Colour	Texture	Bulk density (g cc^{-1})	Particle density (g cc^{-1})	Field capacity (%)
Acid soil	Reddish	Clay	1.25	2.23	29.88
Calcareous soil	Light grey	Clay loam	1.41	2.50	28.10
Non calcareous soil	Light grey	Sandy clay loam	1.45	2.58	27.03
Charland soil	Light grey	Loam	1.43	2.54	27.15
Saline soil (4.43 dS m^{-1})	Light grey	Clay	1.26	2.24	29.70
Saline soil (6.08 dS m^{-1})	Light grey	Cay	1.24	2.21	30.19
Saline soil (8.68 dS m^{-1})	Light grey	Clay	1.24	2.20	29.98
Peat soil	Blackish	Clay loam	1.41	2.51	28.34
Acid sulphate soil	Light grey	Clay	1.27	2.26	29.52

I terreni presentavano anche caratteristiche chimiche differenti (Tabella 6). Il contenuto di pH, EC (conducibilità elettrica) e sostanza organica variavano tra tra 3,9- 8,0, 0,25-14,00 dS m^{-1} e 0,88-16,40%, rispettivamente. N totale, K scambiabile, il contenuto di P e S disponibili variano da 0,05-0,96%, 0,17-0,70 cmoli di terreno kg^{-1}, 3-12 e 11-735 µg di terreno g^{-1}, rispettivamente.

Tabella 6. Proprietà chimiche dei diversi tipi di suolo del Bangladesh utilizzati per la coltivazione della Stevia

Types of soil	pH	EC (ds m^{-1})	OM (%)	Total N (%)	Avail.P (µg g^{-1})	Exch.K (cmol kg^{-1})	Avail.S (µg g^{-1})
Acid soil	5,10	0,25	1,56	0,09	3,00	0,19	11,86
Calcareous soil	7,50	1,26	1,42	0,08	4,82	0,18	15,75
Non calcareous soil	6,70	0,67	1,80	0,11	12,00	0,17	11,00
Charland soil	7,00	0,61	0,88	0,05	6,95	0,18	19,50
Saline soil (4.43 dS m^{-1})	7,50	4,43	1,96	0,11	5,89	0,40	35,00
Saline soil (6.08 dS m^{-1})	7,80	6,08	2,49	0,14	6,94	0,46	43,40
Saline soil (8.68 dS m^{-1})	8,00	8,68	2,05	0,12	7,12	0,51	38,40
Peat soil	5,60	4,10	16,40	0,96	3,00	0,70	641,00
Acid sulphate soil	3,90	14,00	2,35	0,14	4,76	0,20	735,00

Avail.= Available
Exch. = Exchangeable
EC= Electric conducibility
OM= Organic Matter

I dati relativi agli effetti di diversi tipi di suolo del Bangladesh sulla crescita, i caratteri che contribuiscono alla resa e la resa fogliare della Stevia sono stati presentati nella Tabella 7.

Tabella 7. Effetti dei diversi tipi di suolo del Bangladesh sulla crescita, sulla resa della Stevia

Soil types	Plant height (cm)	Branch plant^{-1} (No.)	Leaf area plant^{-1} (cm^2)	Leaf fresh weight (g)	Leaf dry weight (g)	Yield increase over acid sulphate soil (%)
Acid	88,33a	8,67a	1865a	29,07ab	7,90ab	77,52
Calcareous	85,67ab	7,00ab	1555ab	26,10bc	7,05bc	58,43
Non-calcareous	91,33a	9,33a	2010a	31,09a	8,46a	90,11
Charland	84,00ab	6,67b	1336bc	25,05bc	6,79bc	58,58
Saline (4.43 dS m^{-1})	82,33b	6,33b	1181bcd	23,60cd	6,41cd	44,04
Saline (6.08 dS m^{-1})	81,00bc	6,67b	1028cd	21,90cde	5,99cde	34,61
Saline (8.68 dS m^{-1})	79,20c	6,00b	894cd	20,19def	5,49def	23,37
Peat	77,66d	5,67c	851cd	19,10ef	5,17ef	16,18
Acid Sulphate	75,33e	5,67c	712d	16,30f	4,45f	-

I parametri osservati sono:

- Altezza della pianta: diversi tipi di suolo hanno influenzato significativamente l'altezza della pianta della Stevia al momento del raccolto. La pianta più alta (91,33 cm) è stata registrata nel terreno non calcareo e tale valore non si differenzia statisticamente da quello delle piante coltivate nel terreno acido (88,33 cm), terreno calcareo (85,67 cm) e terreno di carbone (84,00 cm), ma è significativamente diverso dalle piante coltivate in suoli salini, torba e solfato acido. L'altezza più bassa (75,33 cm) è stata registrata dalla pianta cresciuta in terreno solfato acido.
- Numero di rami: il numero massimo di rami per pianta è stato contato sulla pianta coltivata in suolo non calcareo (9,33) che non si differenziava statisticamente dal numero di rami della pianta cresciuta in terreno acido (8,67) ma era statisticamente diversa da tutte quelle piante coltivate negli altri suoli. Le piante coltivate in terreni calcarei, carboniferi e salini di 6,08 dS m^{-1} hanno prodotto un numero statisticamente indifferente di rami per pianta. D'altra parte, il numero minimo di rami per pianta è stato ottenuto dalle piante coltivate in terreni solfati acidi e torba (5,67).

- Numero di foglie: Il numero più alto di foglie per pianta è stato contato dalle piante cresciute in terreno non calcareo (277) che non si differenziava statisticamente dal

numero di foglie della pianta cresciute in terreno acido (259). Le piante cresciute in terreni acidi, calcarei (232) e carbone (223) producevano un numero statisticamente simile di foglie. Suoli salini di 4.43 dS m^{-1} e 6.08 dS m^{-1} hanno anche prodotto un numero statisticamente non differente di foglie per pianta (210 e 195, rispettivamente)

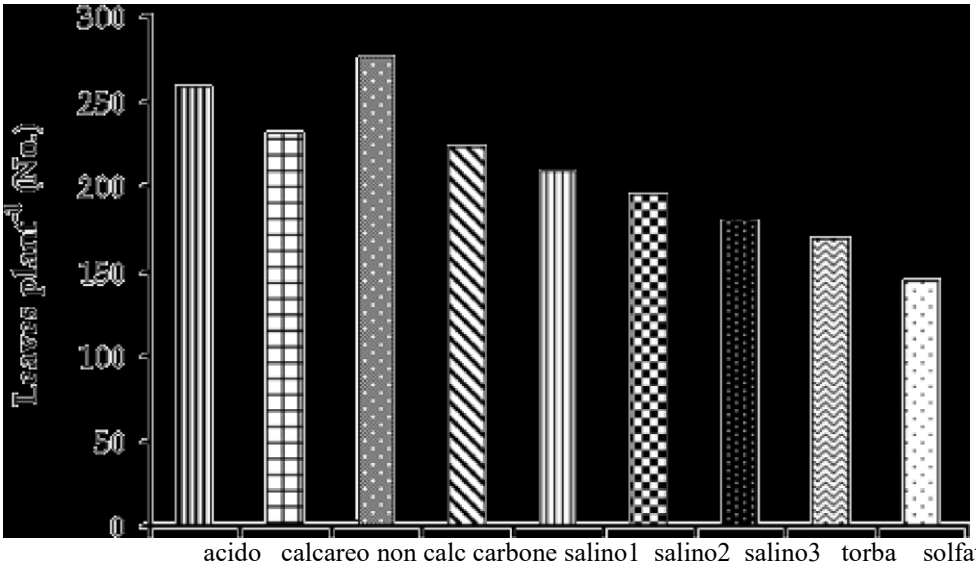

Figura 10. Effetti di diversi tipi di suolo del Bangladesh sul numero di foglie di stevia

. Il numero più basso di foglie è stato raccolto dalla pianta cresciuta in terreno solfato acido (145) che non si differenziava statisticamente da quello delle piante coltivate in terreno salino di 8,68 dS m^{-1} (180) e terreno di torba (170). Le prestazioni dei suoli in termini di produzione di foglie di Stevia erano del seguente ordine non calcareo> acido> calcareo> charland> salino (4.43 dS m^{-1})> salino (6.08 dS m^{-1})> salino (8.68 dS $m^{-1)}$> torba> terreni solfatici acidi.

- Area fogliare: l'area fogliare massima (2010 cm2 per pianta) è stata misurata nella pianta coltivata in terreno non calcareo, la quale non si differenziava statisticamente dall'area fogliare delle piante coltivate in acido (1865 cm^2 per pianta) e calcareo (1555 cm^2 per pianta). Il terreno di carbone (1336 cm^2 per pianta), calcareo (1555 cm^2 per pianta) e terreno salino di 4.43 dS m^{-1} (1181 cm^2 per pianta) ha prodotto aree fogliari statisticamente non differenti in ogni pianta. I 3 livelli di terreno salino e la torba hanno prodotto aree fogliari medesime. L'area fogliare minima (712 cm^2 per pianta) è stata

ottenuta dalla pianta cresciuta in terreno solfato acido pressoché identica alle piante coltivate in terreni salini e torba.

- Peso fogliare fresco: il maggior peso fogliare (31,09 g) è stato ottenuto dalle piante coltivate in terreno non calcareo, statisticamente indifferente dal peso fresco (29,07 g) della pianta cresciuta in terreno acido. Il peso fresco più basso (16,30 g) è stato ottenuto dalla pianta cresciuta in terreno solfato acido, il quale non si differenziava statisticamente da quello misurato nelle piante coltivate in torba (19,10 g) e terreno salino (20,19 g) di 8,68 dS m^{-1}.
- Peso fogliare secco: il peso secco più elevato è stato ottenuto dalle piante cresciute in terreno non calcareo (8,46 g) che era statisticamente non differente dal peso secco di quelle cresciute in terreno acido (7,90 g). Anche i pesi secchi delle piante coltivate in terreni calcarei (7,05 g) e carbone (6,79 g) non si differenziavano statisticamente. Il peso secco più basso è stato ottenuto dalla pianta cresciuta in terreno solfato acido (4,45 g) che era alla pari con i pesi secchi delle piante coltivate in torba (5,17 g) e terreno salino di 8,68 dS m^{-1} (5,49 g). L'aumento di resa in foglie secche degli altri suoli rispetto al terreno solfato acido variava tra il 16,18% per la pianta coltivata in torba e il 90,11% per la pianta in terreno non calcareo. La produzione di foglie secche di Stevia coltivata in diversi terreni del Bangladesh diminuiva secondo il seguente ordine: non calcareo> acido> calcareo> carbone > salino (4.43 dS m^{-1})> salino (6.08 dS m^{-1})> salino (8.68 dS m^{-1})> torba> terreni solfatici acidi.

Riassumendo, la pianta più alta (91,33 cm), il numero massimo di rami per pianta (9,33), il più alto numero di foglie per pianta (277), la superficie fogliare massima (2010 cm2/pianta), peso fogliare fresco e secco maggiori (31,09 g e 8,46 g) sono stati ottenuti dalle piante cresciute nel terreno non calcareo, risultati molti simili a quelle cresciute in terreno acido. I valori più bassi per tutti i parametri sono stati ottenuti dalle piante cresciute in terreno solfato acido, che non erano significativamente diversi da quelli delle piante coltivate nella torba. La variazione delle prestazioni dei diversi terreni per la coltivazione di Stevia può essere dovuta alle proprietà fisiche e chimiche dei suoli oggetto dell'esperimento. Tra le proprietà, il pH, il contenuto di sostanza organica, la salinità, i contenuti nutrizionali e la loro disponibilità sono i fattori principali che controllano la crescita e la resa di qualsiasi coltura.

La Stevia è una pianta subtropicale semi umida che cresce facilmente come qualsiasi altra coltura vegetale ma un terreno sabbioso con un pH leggermente acido-neutro e buon drenaggio è importante per la sua coltivazione. Midore e Rank (2002) hanno osservato che la Stevia può

anche essere coltivata su terreni relativamente poveri. Anche se cresce naturalmente su un terreno molto acido con pH 4-5, può essere coltivata bene anche su un terreno leggermente acido o leggermente alcalino (pH 6,5-7,5). Oddone (1999) ha suggerito che i terreni dovrebbero essere ben drenati ma con una ragionevole capacità di ritenzione idrica e preferibilmente con pH 5-7; il terreno alcalino dovrebbe essere evitato. Le migliori prestazioni sul terreno non calcareo possono essere dovute al suo pH moderato (6.7), bassa capacità di ritenzione idrica (27%), tessitura del suolo (terriccio sabbioso-argilloso). Allo stesso modo, il terreno acido con pH moderato (5.10) potrebbe essere la ragione per ottenere una resa migliore. Prestazioni molto scarse del suolo di torba possono essere dovute al contenuto di materia organica elevata (> 20%) e all'ambiente saturo d'acqua. La materia organica può occupare fino a 40 cm di profondità. La prestazione più scarsa del suolo solfato acido potrebbe essere principalmente dovuta al suo pH molto basso (3.9). Il terreno acido solfato contiene solfuri di ferro e quando l'innalzamento del livello del mare inonda la terra, il solfato presente nell'acqua di mare, si mescola con sedimenti di terra contenenti ossidi producendo una reazione chimica da cui si ottiene acido solforico. Il potenziale dei suoli solfatici acidi per la produzione vegetale è fortemente limitato da alcuni fattori ambientali come inondazioni salmastre, maree e probabilità di tempeste cicloniche. La carenza di P e la tossicità di Fe e Al sono i principali vincoli per la coltivazione in questo tipo di suolo.

7.3.2 Luce e temperatura

La bassa germinazione dei semi è un problema importante nella coltivazione della Stevia. Pertanto, sono stati studiati gli effetti della luce e della temperatura sulla prestazione di germinazione dei semi. Uno dei fattori determinanti dello sviluppo di una pianta è la temperatura poiché tutti i processi metabolici ne sono influenzati. Quindi la temperatura ottimale è considerevolmente importante per il tasso di germinazione dei semi di Stevia. Anche la luce è uno dei fattori importanti, soprattutto per la fotosintesi, che è significativa per i le attività cellulari delle piante e il loro sviluppo. Allo stesso tempo, la luce gioca un ruolo importante nella germinazione dei semi e la crescita delle piantule.

Nel 2012, presso la Facoltà di Agraria dell'Università di Akdeniz (Turchia), sono stati condotti esperimenti di germinazione in un incubatore programmato con lampade fluorescenti bianche, i quali sono racchiusi nell'articolo intitolato "The Effects of Light and Temperature on Germination of Stevia (*Stevia rebaudiana* BERT.) Seeds" e realizzati da E.Uçar, Y. Özyiğit, K. Turgut; i semi sono stati trattati con due luci (luce / buio) e quattro diverse

temperature (15ºC, 20ºC, 25ºC, 30ºC) (Tabella 8). Per ogni trattamento, sono stati contati 50 semi successivamente inseriti in piastre di Petri.

Tabella 8.Trattamenti utilizzati nel test di germinazione

Treatments	Temperature / Light Conditions
T1	15 ºC / light
T2	15 ºC / dark
T3	20 ºC / light
T4	20 ºC / dark
T5	25 ºC / light
T6	25 ºC / dark
T7	30 ºC / light
T8	30 ºC / dark

Nel trattamento al buio, le piastre Petri erano coperte completamente con un foglio di alluminio in modo che nessuna luce potesse entrare. Il primo giorno di germinazione è stato determinato quando la radice ha raggiunto la lunghezza del seme stesso. Il numero di semi germinati è stato contato ogni giorno e il conteggio finale è stato registrato dopo due settimane.

La percentuale di germinazione (GP%) è stata calcolata con la seguente formula:
GP = NGS / NTS x 100 (NGS =Numero di semi germinati, NTS = Numero di semi totali).

I risultati degli esperimenti sono presentati nella Tabella 9. Secondo essi, i primi giorni di germinazione sono stati influenzati significativamente dai trattamenti luce / buio e temperatura. La differenza tra i metodi di trattamento alla luce e a buio è risultata essere importante, e la media della prima germinazione in condizioni di luce (6,8 giorni) è stata più breve rispetto a quella al buio (7,3 giorni). La temperatura più bassa (15 ° C) ha dato il più lungo tempo di germinazione sia in condizioni di luce (9 giorni) che di buio (10 giorni), ed è risultata significativamente diversa dalle altre temperature (6 e 7 giorni). D'altra parte, i trattamenti a 20 ° C, 25 ° C e 30 ° C sono stati statisticamente circa gli stessi.

Tabella 9. Tempo di prima germinazione e percentuale di germinazione di semi di Stevia rebaudiana (Bert.) con temperatura e luce diverse

	First germination time (Days)**			Germination percentage (%)**		
Temperature (ºC)	Light	Dark	Means	Light	Dark	Means
15	9 A	10 A	10 A	31 C	31 B	31 C
20	6 B	7 B	7 B	59 AB	68 A	64 A
25	6 B	7 B	6 B	67 A	71 A	69 A
30	6 B	6 B	6 B	49 B	43 B	46 B
LSD	1.3314	1.0871	0.6688	14.257	13.446	9.1496
Means	6.8 B	7.3 A		51.5 A	53.1 A	

In condizioni di luce, la percentuale più elevata di germinazione è stata registrata a 25 ° C (67%) e seguita da 20 ° C (59%) e 30 ° C (49%). La percentuale di germinazione più bassa è stata ottenuta con 15 ° C (31%) ed era statisticamente importante. Con il buio, le percentuali di germinazione più elevate sono state determinate a 25 ° C (71%) e 20 ° C (68%) e quelle più basse sono state ottenute da 30 ° C (43%) e 15 ° C (31%). Sia alla luce che al buio, il trattamento a 15 ° C ha dato la percentuale di germinazione più bassa e seguito dal trattamento a 30 ° C. In questo esperimento,la temperatura di 25 ° C sembrava essere quella ottimale per una maggiore velocità di germinazione sia alla luce che al buio. Inoltre, 20 ° C potrebbe essere adatto per una maggiore velocità di germinazione, in particolare in assenza di luce.

In generale, le basse temperature hanno ritardato significativamente la germinazione e quindi sono state definite come ostacolo per essa. A volte la germinazione può essere influenzata negativamente anche dalle temperature più elevate (> 30 ºC) che risultano sfavorevoli e causano lesioni a semi e piantine, anche permanenti.

La temperatura è uno dei fattori ambientali più importanti che determinano il successo della germinazione e tutti i semi necessitano di una temperatura adeguata al loro sviluppo.

7.3.3 Stress abiotici

La tolleranza agli stress abiotici da parte di Stevia è spesso correlata alle concentrazioni dei principali glicosidi steviolici (stevioside e rebaudioside A) nella pianta. Tensioni ambientali come bassa/alta temperatura, ristagno idrico, siccità, disidratazione, salinità, tossicità da metalli e carenza di nutrienti influenzano sia la produttività delle piante che la crescita e lo sviluppo di esse.

La misura in cui vari stress abiotici influenzano la crescita e lo sviluppo delle piante dipende dalle specie vegetali, dalla cultivar, dal suo stadio fenologico, dalle composizioni degli ioni solubili, dall'intensità dello stress, dalla durata e dalle condizioni climatiche. Ogni pianta ha un limite di tolleranza allo stress oltre il quale la resa è ridotta. I sintomi della siccità e degli stress idrici comprendono la chiusura stomatica, il declino della fotosintesi, il degrado delle proteine, l'espansione lenta delle foglie e la diminuzione della respirazione e della produzione di biomassa.

Per comprovare ciò detto prima, è possibile fare riferimento ad uno studio che ha esaminato gli effetti a breve termine (4 settimane) di salinità, siccità e ristagno sulla crescita, le relazioni idriche, la fisiologia e le concentrazioni dei metaboliti secondari di due cultivar di *S. rebaudiana*: “Shoutain-2” (S) e “Fengtian” (F).

L'esperimento è stato condotto in una serra della Central Queensland University, a Rockhampton, in Australia. Le piante, provenienti dai semi delle 2 cultivar, sono state poste in una vasca contenente una soluzione idroponica a mezza resistenza e dopo 14 giorni, quando entrambe le cultivar raggiunsero un'altezza di 10-12 cm, furono trasferite in vasi contenenti terra.

Le piante di *S. rebaudiana* sono state esposte ai seguenti trattamenti: controllo, (0 mM NaCl e capacità campo al 100% (FC)), salinità (S1: 50 mM NaCl, S2: 100 mM NaCl), siccità (D1: 80% FC, D2: 50% FC) e ristagno (WL).

I trattamenti di salinità sono stati imposti gradualmente aumentando la concentrazione di NaCl della soluzione di irrigazione di 25 mM al giorno fino a quando la concentrazione di NaCl della soluzione ha raggiunto le concentrazioni preimpostate desiderate di 50 mM o 100 mM di NaCl. Il trattamento con ristagno è stato fatto immergendo i vasi in un secchio (26 cm di diametro × 24 cm di altezza) contenente acqua e mantenendo il livello dell'acqua a 2 cm sopra la giunzione tra germogli e radice; per imporre siccità, i vasi sono stati irrigati a saturazione e lasciati sgocciolare per 24 ore e sono stati pesati giornalmente mantenendo il contenuto di umidità al 100% (controllo), 80% o 50% FC.

Come ci si sarebbe potuto aspettare, le piantine di *S. rebaudiana* esposte a stress abiotici hanno mostrato una crescita ridotta rispetto ai controlli (Tabella 10). Il grado e l'entità della riduzione variava con la cultivar e lo stress. Ad esempio, per i trattamenti di salinità, la riduzione dell'altezza in “Fengtian” era inferiore (21% del controllo, in media per S1 e S2) rispetto a quello in “Shoutian-2” (55%). Nello stress idrico, le cultivar hanno mantenuto un'altezza simile (72-75% del controllo) in D1 e D2 (Tabella 10). Con il ristagno, le due cultivar hanno mostrato un'altezza simile ma una riduzione significativa (48-52%) rispetto al controllo.

L'incremento dell'altezza della pianta o della lunghezza della radice è uno degli indicatori più affidabili delle differenze di tolleranza tra genotipi sottoposti a vari stress abiotici. La nota riduzione dell'altezza della pianta in condizioni di siccità (Tabella 10) potrebbe essere attribuita a un declino dell'ampliamento cellulare e ad una maggiore senescenza fogliare nella pianta. Il ristagno spesso porta ad una crescita rachitica che può essere dovuta a carenza o completa assenza di ossigeno (anossia) nei terreni di coltura. Le differenze nelle risposte di crescita tra le cultivar di *S. rebaudiana* potrebbero essere dovute a differenze nella loro genetica o trattamenti agronomici a cui le piante sono esposte.

Tabella 10. Effetti di diversi stress abiotici su altezza delle piante, biomassa e contenuto di umidità di due cultivar di S. rebaudiana, cv. "Shoutian- 2" (SH) e cv. "Fengtian" (FE), cresciute per 4 settimane in vaso in una serra. Variabili: cultivar (C), trattamenti (T) ed effetto di interazione di cultivar e trattamento (CXT). I trattamenti comprendono: FC = Capacità di campo, cioè il controllo, salinità (S1 e S2; NaCl 50 e 100 mM), siccità (D1 e D2; 50% e 80% di FC) e ristagno idrico (WL).

Parameter	Cultivar	Control	Salinity		Drought		Waterlogging
		FC	S1	S2	D1	D2	WL
Plant height (cm)	SH	18,62	10,0	6,90	14,44	12,74	9,10
	FE	16,22	13,58	12,14	11,02	13,50	8,44
	Tmean	17,42^{d}	11,79^{b}	9,52^{a}	12,73^{c}	13,12^{c}	8,77^{a}
Total biomass (g DW/plant)	SH	4,32	1,30	1,16	2,66	2,43	0,45
	FE	7,50	4,04	2,81	2,16	2,01	0,53
	Tmean	5,91^{d}	2,67^{c}	1,98^{b}	2,41^{c}	2,22^{c}	0,49^{a}
Shoot dry weight (g/plant)	SH	3,52	0,98	0,85	2,17	1,95	0,33
	FE	6,44	2,94	2,27	1,61	1,49	0,38
	Tmean	4,98^{d}	1,96^{c}	1,56^{b}	1,89^{c}	1,72^{c}	0,35^{a}
Leaf dry weight (g/plant)	SH	2,96	0,83	0,75	1,82	1,7	0,31
	FE	5,86	2,49	1,95	1,36	1,29	0,28
	Tmean	4,41^{c}	1,66^{b}	1,35^{b}	1,59^{b}	1,5^{b}	0,3^{a}
Stem dry weight (g/plant)	SH	0,55	0,14	0,09	0,34	0,25	0,01
	FE	0,57	0,44	0,31	0,24	0,19	0,09
	Tmean	0,56^{c}	0,29^{b}	0,20^{b}	0,29^{b}	0,22^{b}	0,05^{a}
Root dry weight (g/plant)	SH	0,80	0,32	0,31	0,49	0,47	0,12
	FE	1,06	1,104	0,54	0,554	0,52	0,154
	Tmean	0,93^{e}	0,71^{d}	0,427^{b}	0,52^{c}	0,50^{c}	0,14^{a}
Leaf to stem DW ratio	SH	5,30	6,70	12,30	5,60	8,30	24,60
	FE	10,6	6,00	6,10	6,40	7,50	11,70
	Tmean	7,90^{b}	6,3^{a}	9,20^{c}	6,00^{a}	7,90^{b}	18,2^{d}
Shoot to root DW ratio	SH	4,42	3,06	2,66	4,15	5,29	3,19
	FE	6,04	2,78	4,39	2,79	3,23	2,54
	Tmean	5,23	2,92	3,53	3,47	4,26	2,86

L'accumulo di biomassa è stato influenzato dai tre trattamenti di stress e l'effetto variava tra le due cultivar. Complessivamente, il peso secco totale della biomassa, il peso secco dei germogli e delle foglie di “Fengtian” erano maggiori di quelli di “Shoutian-2”. La crescita di entrambe le cultivar è stata ridotta in condizioni di stress. La cultivar “Fengtian” ha mostrato una tolleranza al sale migliore di “Shoutian-2” facendo riferimento ai parametri di peso secco elencati precedentemente. Le piante esposte a livelli più elevati di siccità (D2) o salinità (S2) hanno mostrato una grave riduzione della biomassa (Tabella 10), rispetto a quelle coltivate sotto controllo o a livelli più bassi di stress di siccità o salinità (D1 o S1). Le piantine di entrambe le cultivar hanno mostrato una crescita notevolmente ridotta (~ 10% del controllo) sotto ristagno. Un effetto comune della siccità sulle piante coltivate è la riduzione della produzione di biomassa fresca e secca. La carenza idrica influisce in modo significativo sull'estensione del germoglio e sul rapporto radice / germoglio a livello dell'intero impianto. In questo studio, entrambe le cultivar di *S. rebaudiana* hanno mostrato una riduzione della produzione di biomassa secca.

L’effetto degli stress abiotici viene misurato anche a livello della composizione chimica delle piante, quindi calcolando la quantità di glicosidi steviolici. Nel presente esperimento, entrambe le cultivar di *S. rebaudiana* hanno mostrato un alto accumulo di SG (glicosidi steviolici) in presenza di stress abiotici. La cultivar “Fengtian” aveva concentrazioni significativamente più elevate di stevioside (Fig. 11A) e glicosidi steviolici totali (Fig. 11C) rispetto a “Shoutian-2,” con conseguente ST / SG più alto (Fig. 11F). Tuttavia, i suoi contenuti Reb A erano molto più bassi di quelli in “Shoutian-2” tranne in S2 e D1. Gli effetti del trattamento da stress erano evidenti per lo stevioside, Reb A (Fig. 11B) e il totale dei glicosidi (Fig. 11C). Lo stress a maggiore salinità ha causato un aumento dello stevioside in entrambe le cultivar. Poiché Reb A è risultato maggiore dal più alto trattamento di salinità in “Fengtian”, anche il contenuto di glicosidi steviolici è stato maggiore per quella cultivar. Il rapporto di Reb A / SG (Fig. 11E) è stato ridotto dalla salinità e quello di ST / SG (Fig. 11F) è aumentato in “Shoutian-2” e rimane invariato in “Fengtian”. Le concentrazioni di Reb A sono state ridotte dalla siccità (Fig. 11). Anche il ristagno riduce le concentrazioni di Reb A e SG. L'effetto dello stress da siccità in questo studio ha anche causato una diminuzione generale delle concentrazioni di ST e SG, sebbene il Reb A sia aumentato nel cv tollerante alla siccità, “Fengtian.”

Entrambe le cultivar hanno prodotto più ST e SG a 100 mM di NaCl (S2); ma solo la cv. “Fengtian” ha prodotto una quantità significativamente maggiore di Reb A al livello più

elevato di salinità. Solo “Shoutian-2” alla crescita della salinità ha mostrato una diminuzione del rapporto Reb A / ST, mentre un aumento significativo è stato notato nella cv. “Fengtian”.

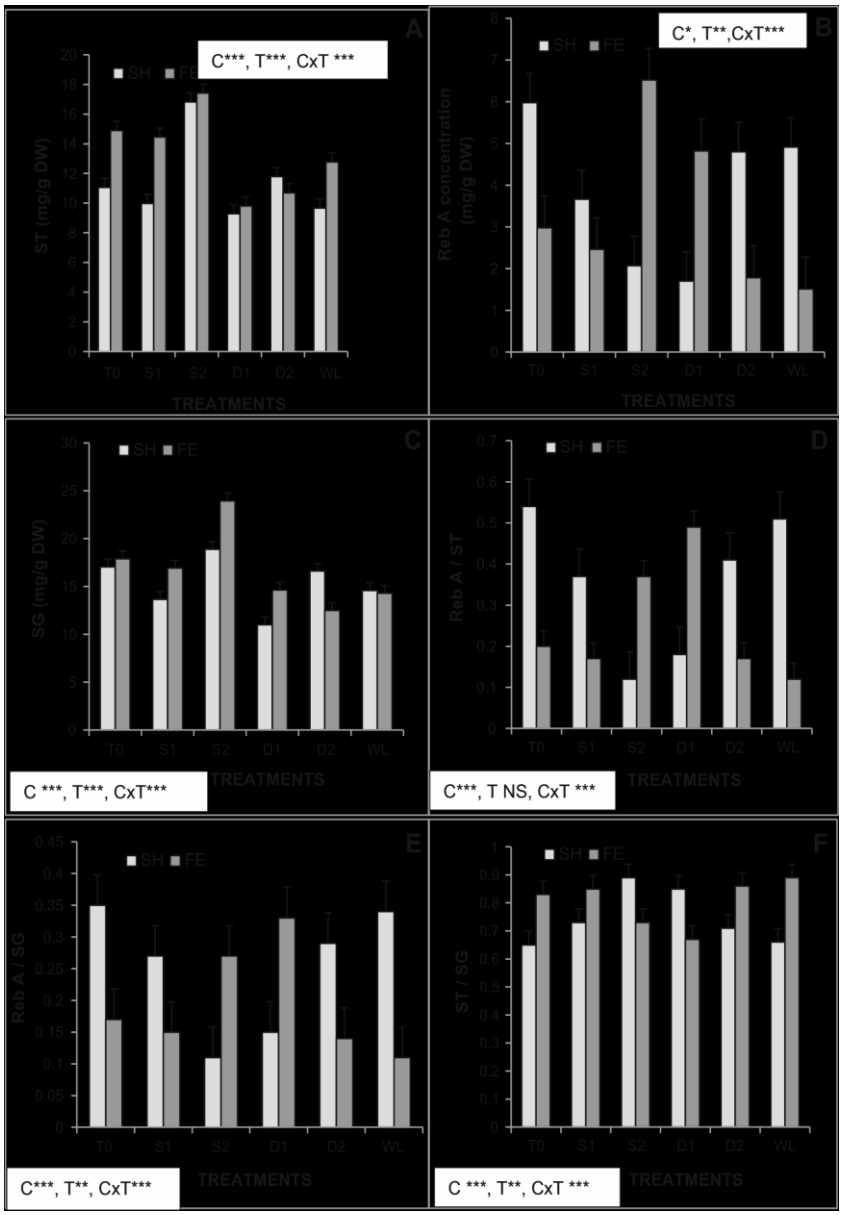

Figura 11. Effetti di diversi stress abiotici sulle concentrazioni di glicosidi steviolici nelle foglie di due cultivar di S. rebaudiana, cv. “Shoutian- 2” (SH) e cv.” Fengtian” (FE)

Quando si considera la resa di SG, l'elevata biomassa fogliare è un vantaggio. Dalla tabella 10 risulta chiaramente che entrambe le cultivar di *S. rebaudiana* presentavano un peso secco fogliare ridotto in condizioni di stress differenti. Ma era anche evidente che la cv. “Fengtian” ha prodotto una biomassa fogliare maggiore nel controllo e nel trattamento con salinità (S1, S2). È chiaro dalla Fig.11 che il contenuto di metaboliti secondari è stato influenzato dai diversi stress, ma in tutti i trattamenti di stress per entrambe le cultivar, le concentrazioni di

ST, Reb A e SG erano inferiori rispetto al controllo. Il rapporto Reb A / SG più favorevole è stato notato nel cv. “Fengtian” in condizioni di maggiore salinità e siccità minore.

“Shoutian-2” è una cultivar sensibile alla salinità mentre “Fengtian” è tollerante alla salinità e moderatamente tollerante alla siccità. Entrambe le cultivar sono suscettibili alle condizioni di ristagno. La cv. “Fengtian” produceva maggiore biomassa fogliare e conteneva più glicosidi steviolici in condizioni di stress rispetto alla cv. “Shoutian-2”.

In conclusione, “Fengtian “ha una tolleranza allo stress maggiore rispetto al cv. “Shoutian-2” ed è quindi raccomandata per la coltivazione commerciale.

7.3.4 Regime di irrigazione

Per valutare l’impatto sulla qualità e la produttività della Stevia da parte della disponibilità idrica, si è fatto riferimento ad una sperimentazione sul campo condotta nel 2006 e nel 2007 presso l’Istituto di ricerca sui sistemi agricoli e forestali mediterranei (ISAFoM) situato nella piana del fiume Volturno, un'area irrigua dell'Italia meridionale.

La sperimentazione ha coinvolto un genotipo di *Stevia rebaudiana* Bert. Le piante venivano propagate per talea in un vivaio privato da piante madri originarie del Paraguay. Lo scopo della prova era di valutare i cambiamenti indotti dai diversi livelli di irrigazione sul potenziale di resa, sul consumo di acqua e sulle caratteristiche qualitative di questa specie coltivata in campo aperto nell'Italia meridionale.

L’impianto è stato effettuato il 20 aprile 2006 con una densità di 5 piante m^2 (0,6 m di distanza tra le file) e gli appezzamenti hanno ricevuto rispettivamente un quantitativo di 150, 120 e 100 kg ha-1 di N, P e K in entrambi gli anni.

Sono stati testati tre regimi idrici: il controllo (T100), che ha ricevuto il 100% del consumo di acqua del suolo e due trattamenti di irrigazione deficitari che hanno ricevuto una restituzione d’acqua del 66% (T66) e del 33% (T33) del trattamento T100. L'acqua di irrigazione è stata distribuita settimanalmente utilizzando un sistema localizzato con ugelli di gocciolamento in linea che forniscono 4 litri all’ora. Si stima che il volume di irrigazione ripristini il profilo del suolo fino a una profondità di 0,40 m. L'evapotraspirazione delle colture (ETc) è stata stimata utilizzando il metodo del bilancio idrico del suolo e il contenuto di acqua del suolo è stato misurato gravimetricamente per uno strato di terreno da 0-0,60 m. Per calcolare il bilancio idrico delle colture, il contenuto di acqua del suolo di ciascun trattamento è stato monitorato prima e 24 ore dopo ogni irrigazione e all'inizio e alla fine della stagione di crescita.

Le piante sono state raccolte all'inizio della fioritura. I campioni per la determinazione analitica (glicosidi) sono stati prelevati da delle piante casuali prese come riferimento, per

ogni appezzamento (diversi trattamenti). Il contenuto di Stevioside e rebaudioside A è stato determinato su campioni prelevati da tutte le foglie e gli steli, essiccati e macinati separatamente dalle piante.

Per l'esperimento era importante conoscere anche le condizioni ambientali che erano tipiche di un'area mediterranea subumida (precipitazioni medie di 736 mm) con precipitazioni scarse durante l'estate che non compensavano l'evapotraspirazione estiva elevata (ET0). La temperatura media giornaliera dell'aria aumenta da 10 a 12 ° C in aprile a 24-25 ° C alla fine di luglio, per poi scendere a 18 ° C a settembre. Nel primo anno le precipitazioni sono ammontate a 56,2 mm nella prima decade di giugno e le piccole piogge sono state rilevate fino alla fine della stagione colturale, ad eccezione di un evento di 127,4 mm nella seconda decade di settembre. Quest'ultimo non è stato contabilizzato nel bilancio idrico poiché si è verificato dopo il secondo raccolto. Il secondo anno è stato più secco del primo, poiché l'unico evento piovoso (> 5 mm entro 24 ore) è stato monitorato alla ripresa del raccolto, mentre non si sono verificate precipitazioni da metà giugno all'inizio di settembre.

Tabella 11. Volume di irrigazione, volume di acqua stagionale, consumo di acqua, ETo e kc calcolato per l'intera stagione di irrigazione (stagione Irr) e per i due periodi di crescita di ogni anno sperimentale.

Period	Irrigation volume			Water volume			Water consumption				kc		
	T100	T66	T33	T100	T66	T33	T100	T66	T33	ETo	T100	T66	T33
DOY	*mm*												
Irr. season '06	522	344	172	603	426	254	606	417	229	5.26	0.97	0.67	0.37
141-204	280	185	93	312	217	124	310	200	114	5.82	0.85	0.55	0.31
204-262	241	159	80	291	209	130	296	217	114	4.70	1.08	0.80	0.42
Irr. season '07	550	363	182	615	428	247	623	423	252	5.32	1.02	0.67	0.39
142-210	299	197	99	354	252	154	350	260	168	5.74	0.90	0.67	0.43
210-259	251	166	83	261	176	93	273	163	84	4.9	1.14	0.68	0.35

Le condizioni climatiche, come previsto, hanno influenzato l'irrigazione stagionale in entrambi gli anni. Tuttavia, nel secondo anno i volumi di irrigazione erano 28 mm più alti rispetto al 2006 (522 mm nel 2006 rispetto a 550 mm nel 2007) nel trattamento con più acqua (Tab. 11), mentre per gli altri due trattamenti le differenze erano meno evidenti a causa della riduzione del regime di irrigazione. Il consumo di acqua (Tab. 11) è stato diviso in due periodi di crescita: 1) dall'inizio dell'irrigazione al primo raccolto, 2) dal primo raccolto fino all'ultima annaffiatura. Il primo periodo di crescita è stato lo stesso in termini di giorni tra i due anni, ma il secondo è stato più breve nel 2007, poiché i picchi di temperatura elevata registrati ad agosto hanno probabilmente contribuito a ridurre il periodo di crescita.
Il consumo di acqua per tutta la stagione (Tab. 11) rifletteva il comportamento dei volumi di acqua stagionali e le differenze, tra gli anni, erano trascurabili. Infatti, i trattamenti T100, T66

e T33 nel secondo anno hanno consumato solo 16,9, 5,3 e 23,5 mm, rispettivamente, più degli stessi trattamenti nel primo anno. In base alla fornitura stagionale di acqua, T66 e T33 consumavano circa il 30 e il 70% in meno di acqua rispetto al controllo (T100). I valori del coefficiente di raccolto (kc), calcolato come rapporto tra il consumo giornaliero di acqua e l'ET di riferimento medio, erano generalmente simili tra i due anni. Nei due periodi di crescita i valori di kc dei trattamenti T100 e T66 hanno mostrato un aumento nel secondo periodo, mentre questo comportamento è stato rilevato solo nel primo anno per il trattamento T33. Questa tendenza era dovuta all'elevata domanda di evaporazione che si verificava nel periodo dal primo al secondo raccolto.

L'esperimento valutava anche la crescita vegetativa e lo sviluppo nelle diverse prove. Le piante del secondo raccolto erano significativamente più alte di quelle degli stessi trattamenti del primo (Figura 12a). In ogni raccolto è stato registrato un aumento significativo dell'altezza della pianta con l'aumento dell'irrigazione. L'altezza massima di 0,56 m è stata ottenuta con il trattamento T100 nel secondo periodo di crescita.

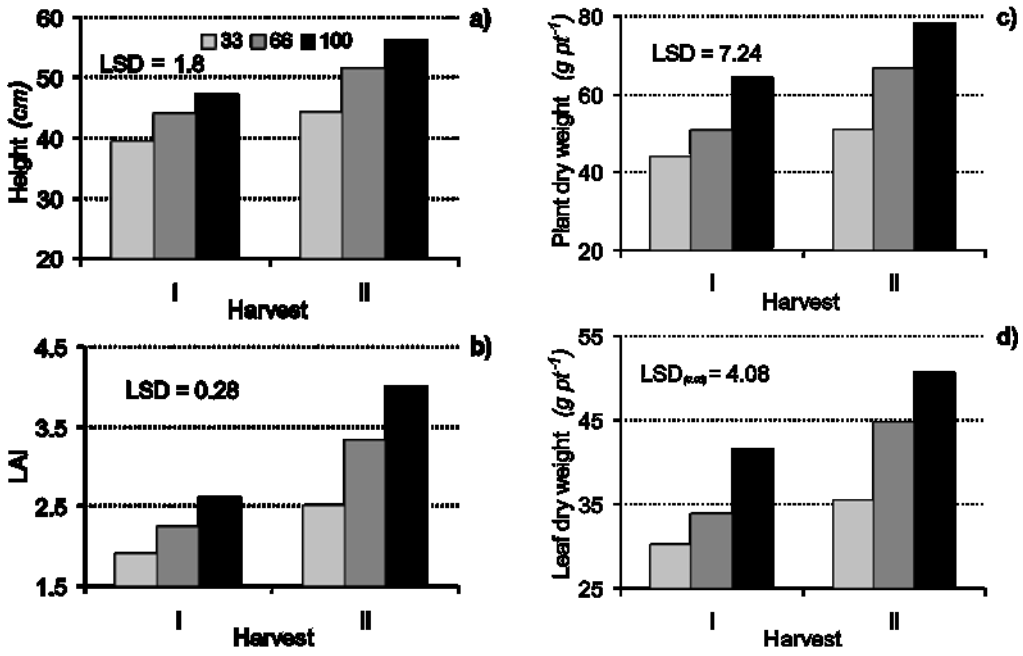

Figura 12. Altezza media (a), indice dell'area fogliare (LAI) (b), peso secco della pianta (c) e peso secco foglia (d) per ciascun raccolto e trattamento di irrigazione (T33, T66 e T100) per i due anni sperimentali. Viene anche riportata la differenza meno significativa (LSD) dell'interazione del raccolto x trattamento al livello di probabilità 0,05.

I dati relativi all'area fogliare (LAI) hanno mostrato lo stesso andamento dell'altezza della pianta (figura 12b). Il massimo LAI (4) è stato rilevato nel trattamento con maggior acqua. Il peso secco delle piante e delle foglie ha mostrato valori più alti al secondo taglio (Fig. 12c e

12d). In entrambi i tagli il trattamento più irrigato (T100) ha ottenuto la massima produzione di materia secca in termini di foglie e di accumulo totale di sostanza secca.

Le differenze tra i trattamenti di irrigazione sono state sempre significative nel secondo periodo di crescita, mentre nei due trattamenti di irrigazione deficitari del primo periodo, è stato osservato un leggero miglioramento di T66 rispetto a T33. Ciò era dovuto all'elevato contenuto di acqua del suolo nei primi periodi di crescita di entrambi gli anni, causato dalle precipitazioni primaverili, che hanno causato la mancanza di differenze tra i due trattamenti. La maggiore produzione di biomassa nel secondo periodo di crescita è dovuta alle migliori condizioni in termini di temperatura durante quel periodo e all'effetto di precedenti trattamenti di irrigazione. Pertanto, le piante più irrigate all'inizio del secondo periodo presentavano già un maggior numero di steli secondari e probabilmente un sistema radicale più sviluppato. La resa in foglia secca per ettaro ottenuta come media annuale è stata di 4,6, 3,9 e 3,3 t ha^{-1} per i trattamenti T100, T66 e T33, rispettivamente.

Tabella 12. Principale contenuto di glicosidi negli estratti di foglie e steli. La deviazione standard è riportata tra parentesi.

	Stevioside	Rebaudioside A
	% (w/w)	% (w/w)
Leaves	8.36 (± 0.53)	5.72 (± 0.27)
Stems	0.48 (± 0.02)	0.36 (± 0.01)

Interessante è anche la concentrazione dei glicosidi steviolici presente nelle piante sotto trattamento; il contenuto di quest'ultimi mostrava una maggiore quantità di stevioside rispetto a quella del rebaudioside A in foglie e steli (Tab. 12). Come riportato da molti autori (Bondarev *et al*., 2003/2004), nel presente esperimento il maggior contenuto di sostanze edulcoranti è stato trovato nelle foglie. L'analisi statistica non ha mostrato interazioni significative così come i principali effetti determinati dai regimi di irrigazione, tempo di raccolto e anni, dimostrando che i fattori genetici hanno controllato queste caratteristiche di qualità. Questo comportamento potrebbe essere spiegato poiché i campioni sono stati prelevati nella stessa fase fenologica della pianta in entrambi gli anni ad ogni epoca di raccolta. Data la mancanza di differenze nel contenuto di glicosidi, la produzione di edulcoranti è aumentata in base all'aumento della resa delle foglie secche con i livelli di irrigazione. Complessivamente, la resa totale di glicosidi per ogni anno era più alta nel trattamento T100 (0,26 e 0,38 t ha^{-1} di rebaudioside A e stevioside,

rispettivamente), mentre T66 e T33 hanno mostrato una produzione di rebaudioside di 0,22 e 0,19 t ha^{-1} e una produzione di stevioside di 0,33 e 0,28, rispettivamente.

Oltre all'evidente effetto positivo dell'irrigazione sulla crescita e sulla produzione delle piante, i risultati di questo lavoro confermano che questa specie è adattabile all'ambiente climatico dell'area di studio. Una corretta programmazione dell'irrigazione è fondamentale per ottenere buoni risultati come riportato da molti autori. Lo sviluppo vegetativo e la qualità della resa in termini di sostanze edulcoranti prodotte conferiscono a questa specie la possibilità di essere tagliate con successo. I risultati della gestione delle colture indicano che potrebbero essere raggiunti almeno due raccolti all'anno. Sono necessarie ulteriori indagini per valutare la durata economica di questa coltura sul campo, dal momento che negli stessi esperimenti condotti nell'Italia centro-settentrionale è stata ottenuta una buona resa per un massimo di otto anni, mentre nel campo attuale i lavori dopo la raccolta del secondo anno hanno osservato la presenza di malattie radicali in inverno e sono state contate molte piante morte, probabilmente causate dall'elevata ritenzione idrica del suolo nel sito sperimentale.

Al fine di sviluppare la coltivazione in campo aperto di questa specie, sono necessari ulteriori esperimenti sul campo (durata della pianta, potenziale di rendimento, ecc.) per redigere un protocollo di coltivazione e un programma di miglioramento genetico per sviluppare varietà che rispondano meglio agli ambienti locali.

8. CONCLUSIONI

Dagli esperimenti presi in considerazione si evince che la Stevia, nonostante sia una pianta originaria dei suoli del Paraguay, quindi con basse esigenze, risponde al meglio a livello di produttività, all'aumentare delle risorse a sua disposizione e al diminuire degli stress esterni.

Per quanto riguarda i fattori nutrizionali, hanno molto influito sulle dimensioni della pianta e di conseguenza sulla sua produttività di biomassa; i massimi livelli di crescita infatti si sono riscontrati con i trattamenti più alti di azoto e fosforo, mentre i livelli di potassio non sono stati significativi nel risultato. Anche il contenuto di glicosidi steviolici si è mostrato notevolmente maggiore nel trattamento completo di macroelementi mentre per le piante coltivate in carenza di N , il contenuto di glicosidi steviolitici e risultato 10 volte inferiore a quello del controllo e per quelle coltivate in deficienza di P era 20 volte inferiore.

Altro fattore influenzante, soprattutto sui parametri di crescita, è il tipo di suolo su cui Stevia viene coltivata per il tipo di caratteristiche chimiche e fisiche che favoriscono o meno le prestazioni. Dagli esperimenti svolti si è concluso che dal terreno di tipo non calcareo si sono ottenute le migliori prestazioni, seguito da quello di tipo acido dovute appunto al livello di pH, tessitura del suolo, saturazione di acqua e livello di carbonio organico. I valori più bassi di tutti i parametri sono stati ottenuti dalle piante cresciute in terreno solfato acido, che non erano significativamente diversi da quelli delle piante coltivate nella torba.

Per quanto riguarda il ruolo della temperatura e della luce, si è concluso che la germinazione dei semi di Stevia è stata favorita e accelerata da condizioni di luce e temperatura pari a 25 °C, caratterizzate da una percentuale di germinazione del 67%; la percentuale di germinazione più bassa è stata ottenuta con il trattamento a minor temperatura. Sia alla luce che al buio, il trattamento a 15 ° C ha dato la percentuale di germinazione più bassa e seguito dal trattamento a 30 ° C, risultati che indicano come le basse temperature siano un ostacolo per la crescita di Stevia.

Anche la presenta di stress abiotici e diversi regimi di irrigazione sono stati consideranti influenzanti la crescita e la produttività. Salinità, siccità e ristagno hanno causato, in tutti i trattamenti e in entrambe le cultivars prese in considerazione, una diminuzione nelle dimensioni e nella resa di biomassa. Sebbene sia moderatamene alto, anche il contenuto di

metaboliti secondari è stato influenzato dai diversi stress; La cultivar “Fengtian” aveva concentrazioni significativamente più elevate di stevioside e glicosidi steviolici totali rispetto a “Shoutian-2,” la quale però ha mostrato un maggior contenuto di rebaudioside A.
In generale, “Fengtian” ha una tolleranza allo stress maggiore rispetto a “Shoutian-2”.

L’ irrigazione ha influito positivamente sulla crescita e sulla produzione delle piante; una corretta programmazione dell'irrigazione è fondamentale per ottenere buoni risultati come riportato da molti autori, evitando ristagni idrici.

9. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

Abou-Arab, A. Esmat; Abou-Arab, A. Azza; Abu-Salem, M. Ferial, 2010. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. *African Journal of Food Science*, 4.5: 269-281.

Aladakatti, Y. R., Y.B Palled, M. B. Chetti, S. I. Halikatti, S. C. Alagundagi, P. L. Patil, V. C. Patil and A. D. Janawade, 2012. Effect of nitrogen, phosphorus and potassium levels on growth and yield of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 25.1: 25-29.

Alvarez, M, , 1984. Stevia rebaudiana Bert. estado atual do conhecimento. Universitadade Estaudual de Maringa, 118.

Andolfi, L., Ceccarini, L., and Macchia, M, 2002. Bio-agronomic characteristics of Stevia rebaudiana. Informatore Agrario, 58, 48–51

Angkapradipa, P., Warsito, T., and Faturachim, P, 1986. The N, P, and K requirements of Stevia rebaudiana on latosolic soil. Menara Perkebunan, 54, 1–6.

Angkapradipa, P., Warsito, T., and Katiman, M, 1986. Manuring of Stevia rebaudiana on andosol. Menara Perkebunan, 54, 131–137.

Bespalhok-Filho, João Carlos; Hattori, Kazumi, 1997. Embryogenic callus formation and histological studies from *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni floret explants. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 9: 185-188.

Bondarev N.I, Sukhanova M.A., Reshetnyak O.V., Nosov A.M, 2003/2004. Steviol glycoside content in different organs of Stevia rebaudiana and its dynamics during ontogeny. Biologia Plantarium, 47,2:261-264.

Brandle, J. E.; Rosa, N, 1992. Heritability for yield, leaf: stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. *Canadian Journal of Plant Science*, 72.4: 1263-1266.

Brandle, J. E.; Starratt, A. N.; Gijzen, M, 1998. *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. *Canadian Journal of plant science*, 78.4: 527-536.

Buana, L.; Goenadi, D. H, 1985. A study on the correlation between growth and yield in Stevia. *Menara perkebunan*, 53.3: 68-71.

Cabanillas, C.; Díaz, M. P, 1997. Influence of the conditions of storage on the seed quality of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni. In: *II WOCMAP Congress Medicinal and Aromatic Plants, Part 3: Agricultural Production, Post Harvest Techniques, Biotechnology 502*, p. 255-260.

Carneiro, J. W. P.; Muniz, A. S.; Guedes, T. A, 1997. Greenhouse bedding plant production of *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni. *Canadian Journal of Plant Science*, 77.3: 473-474.

Chalapathi, M. V, 1996. Methods of planting, fertilization, rooting and standardization of vegetative propagation techniques in Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Master of Science Agricultural Economics (Thesis)*.

Chalapathi, M. V., Kumar, N. D., Rao, G. G. E. and Jayaramaiah, R, 1999. Comparative performance of plant and ratoon crops of stevia. Indian Agrilcolture, 43: 211-212.

Chalapathi, M. V., Thimmegowda, S.; Sridhara, S.; Parama, V.R.R.; Prasad, T.G, 1997. Natural non-calorie sweetener Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) -A future crop of India. *Crop Research-Hisar*, 14: 347-350.

Crammer, B., and Ikan, R, 1986. Sweet glycosides from the stevia plant. Chem. Br. 22, 915–917.

De Lisi, A., Tedone, L., Montesano, V., Sarli, G., & Negro, D, 2011. Chemical characterisation of Thymus populations belonging from Southern Italy. Food Chemistry, 125(4), 1284-1286.

Debnath, M.; Ashwath, N.; Midmore, D. J, 2019. Physiological and morphological responses to abiotic stresses in two cultivars of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. *South African journal of botany*, 123: 124-132.

Donalisio, M. G., Duarte, F. R., and Souza, C. J, 1982. Estevia (Stevia rebaudiana). *Agronoˆmico*, Campinas (Brazil), 34, 65–68.

Duke, J, 1993. *Stevia rebaudiana*. *Duke J. ed. CRC Handbook of Alternative Cash Crops. CRC Press*, 422-424.

Dwivedi, R. S, 1999. Unnurtured and untapped super sweet nonsaccharifierous plant species in India. Current Science (Bangalore), 76: 1454-1461.

Ermakov, E. I.; Kochetov, A. A, 1996. Specificities of the growth and development of Stevia plants under different controllable light conditions. *Russian Agricultural Sciences*, 1: 9-11.

Felippe, G. M.; Lucas, N. M. C, 1971. Estudo da viabilidade dos frutos de *Stecia rebaudiana* Bert. *Hochmea, v.1*, p.95-105.

Filho, L. O. F., Malavolta, E., and Filho, O. F. D. L, 1997. Symptoms of nutritional disorders in stevia (Stevia rebaudiana). Scientia Agricola, 54, 53–61.

Goenadi, D. H, 1985. Effect of FYM, NPK, and liquid organic fertilizers of Stevia rebaudiana (Bert.). Menara Perkebunan, 53, 29–34.

Goettemoeller, Jeffrey; Ching, Alejandro, 1999. Seed germination in *Stevia rebaudiana*. *Perspectives on new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA*, 510-511.

Goyal, S. K., Samsher, Goyal, R. K., Calderon, J. S., Quijano, L., Gomez, F.,Liu, D. Y, 2010. Antioxidant mechanism of *Stevia rebaudiana* extract and antioxidant activity of inorganic salts. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61.1: 1-10.

Grevsen, K., Sorensen, J.N., 2016. 2nd year cultivation results of the Danish “Green Stevia” project-a natural sweetener for organic food products. In: Geuns, M.C. (Ed.), From F. to Fork, Proc. 9th Stevia Symp. 2016, EUSTAS, Sweden, 15-16th Sept. 2016, Jan, pp. 115–126.

Gvasaliya, V. P., Kovalenko, N. V., and Garguliya, M. Ch, 1990. Studies on the possibility of growing honey grass in Abkhazia conditions. *Subtropocheskie Kultury* 5, 149–156.

Hastoy, C., Cosson, P., Sclaunich, E., Jannot, P., Boutié, P., Cavaignac, S., Rolin, D., Schurdi-Levraud, V., 2016. Organic stevia production and Development of Simple Sequence Repeat (SSR) and Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Molecular Markers as a Tool for Stevia rebaudiana’s Germplasm Characterization and Future Breeding Purposes. In: Geuns, M.C. (Ed.), From F. to Fork, Proc. 9th Stevia Symp. 2016, EUSTAS, Sweden, 15-16th Sept. 2016, Jan, pp. 127–136.

Herms, D. A. And Mattson, W. J, 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *The Quarterly Review of Biology*, 67:283Y335

Jia, G. N, 1984. An experiment on the cultivation of Stevia rebaudiana. *Shanxi Agricultural Science*, 1: 20-21.

Kafle, Geeta Gautam; Midmore, David J.; Gautam, Resham, 2017. Effect of nutrient omission and pH on the biomass and concentration and content of steviol glycosides in stevia (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni) under hydroponic conditions. *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants*, 7: 136-142.

Katayama, O., Sumida, T., Hayashi, H., and Mitsuhashi, H, 1976. ‘‘The Practical Application of Stevia and R and D data’’. ISU Co., Japan, 747.

Kawatani, T., Kaneki, Y. and Tanabe, T. and Takahashi, T, 1980. On cultivation of Kaa-He-E (Stevia rebaudiana Bert).VI. Response of stevia to potassium fertilization rates and to the three major elements of fertilizer. *Nettai Nogyo*, 24, 105-112.

Kinghorn, A. D., Nanayakkara, N. P. D., Soejarto, D. D., Medon, P. J. & Kamath, S, 1982. J. Chromatogr. 237, 478-483.

Lankes, C., Grosser, P, 2015. Evaluation of Stevia rebaudiana genotypes at a location in the Alentejo region in Portugal. In: Geuns, J.M.C., Ceunen, S. (Eds.), Proc. 8th Stevia Symp. 2015, EUSTAS, pp. 167–176 Bonn, Ger.

Lavini, Antonella, 2008. Yield, quality and water consumption of *Stevia rebaudiana* Bertoni grown under different irrigation regimes in Southern Italy. *Italian Journal of Agronomy*, 135-143.

Lester, T, 1999. *Stevia rebaudiana* sweet leaf. *The Australian New Crops Newsletter*, 11.1: 53-61.

Lewis, W. H., Degenhardt, D. F., Kondra, Z. P., Stringam, G. R., & Potter, D, 1992. Early uses of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaves as a sweetener in Paraguay. *Economic Botany*, 46.3: 336-337.

Marsolais, Albert Anthony; Brandle, James; Sys, Elizabeth Ann, 1998. *Stevia plant namedRSIT 94-751*. U.S. Patent Application No 08/657,463.

Matsui, M., Matsui, K., Kawasaki, Y., Oda, Y., Noguchi, T., Kitagawa, Y.,Ishidate Jr, M, 1996. Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six in vitro and one in vivo mutagenicity assays. *Mutagenesis*, 11.6: 573-579.

Megeji, N. W., Kumar, J. K., Singh, V., Kaul, V. K., and Ahuja, P. S, 2005. Introducing Stevia rebaudiana—A natural zero calorie sweetener. *Current Science*, 88, 31–35.

Metivier, Jacques; Viana, Ana Maria, 1979, The effect of long and short-day length upon the growth of whole plants and the level of soluble proteins, sugars, and stevioside in leaves of *Stevia rebaudiana* Bert. *Journal of Experimental Botany*, 30.6: 1211-1222.

Midore, D.J. and Rank, A.H, 2002. A new rural industry-Stevia-to replace imported chemical sweetners. *Rural Industries Research and Development Corporation*.

Mitsuhashi, H., Uneo, J., and Sumita, T, 1975. Studies on the cultivation of Stevia rebaudiana. *Yakugaku Zasshi,* 95, 1507.

Miyazaki, Y., Watanabe, H., and Watanabe, T, 1978. The cultivation of Stevia rebaudiana. III. Yield and stevioside content of 2-year-old plants. *Eisei shikensho hokok*, 96, 86–89.

Mizukami, H., Shiba, K., and Ohashi, H, 1983. Effect of temperature on growth and stevioside formation of Stevia rebaudiana. *Shoyakugaku Zasshi* 37, 175–179.

Monteiro, W. R., Castro, M. D. M., Mazzoni-Viveiros, S. C., & Mahlberg, P. G, 2001. Development and some histochemical aspects of foliar glandular trichomes of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bert.-Asteraceae. *Brazilian Journal of Botany*, 24.3: 349-357.

Murayama, S., Kayano, R., Miyazato, K., and Nose, A.,1990. Studies on the cultivation of Stevia rebaudiana .II. Effect of fertilizer rates, planting density and seedling clones on growth and yield. *Science Bulletin of the college of Agriculture*, University of the Ryukyus, Okinawa 27, 1-8.

Pezzuto, J. M., Compadre, C. M., Swanson, S. M., Nanayakkara, D., e Kinghorn, A. D, 1985. Metabolically activated steviol, the aglycone of stevioside, is mutagenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 82(8), 2478−2482.

Ramesh, K.; Singh, Virendra; Megeji, Nima W, 2006. Cultivation of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni]: A comprehensive review. *Advances in Agronomy*, 89: 137-177..

Randi, A. M.; Felippe, G. M, 1981. Efeito de temperatura, luz e reguladores de crescimento na germinação de *Stevia rebaudiana* Bert. *Ciencia e cultura-Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciencia*.

Randi, Aurea Maria, 1980. Germinação de *Stevia Rebaudiana* Bert.

Sakaguchi, Mixue; Kan, Tatsuiko, 1982. Pesquisas Japonesas com *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni eo esteviosideo. *Ciencia e cultura-Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciencia*.

Shock, Clinton, 1982. Rebaudi's Stevia: natural noncaloric sweeteners. *California Agriculture*, 36.9: 4-5.

Sincholle, D. e Marcorelles, P. (1989). Study of the antiandrogenic activity of extracts of Stevia rebaudiana Bertoni (English abstr.). *Medicinal Plants Phytotherapy* 23: 282–287.

Singh, S. D.; Rao, G. P, 2005. Stevia: The herbal sugar of 21 st Century. *Sugar tech*, 7.1: 17-24.

Slamet, I. H., and Tahardi, S, 1988. The effect of shading and nitrogen fertilisation on the flowering of Stevia rebaudiana. *Menara Perkebunan* 56, 34–37.

Sumida, T, 1980. Studies on Stevia rebaudiana Bertoni as a possible new crop for sweetening resource in Japan. *Journal of the Central Agricultural Experiment Station*, 31, 1–71.

Sunk, T, 1975. Studies on Stevia rebaudiana like Edulcorante. *Japanese Journal of Crop Science.*

Taiariol, D. R, 2004. Characterization of the rebaudiana Stevia Bert.

Thomas, S. C. L, 2000. Medicinal Plants-Culture, Utilization and Phytopharmacology. *Technomic Publishing Company Incorporated in Lancaster, Basel*, 517.

Uçar, E., Özyiğit, Y., & Turgut, K, 2016. The Effects of Light and Temperature on Germination of Stevia (Stevia rebaudiana BERT.) Seeds. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 3.1: 37-40.

Valio, I. F. M.; Rocha, Rosely F, 1977. Effect of photoperiod and growth regulator on growth and flowering of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Japanese Journal of Crop Science*, 46.2: 243-248.

Yadav, A. K., Singh, S., Dhyani, D., & Ahuja, P. S, 2011. A review on the improvement of Stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Canadian Journal of Plant Science*, 91.1: 1-27.

Zaidan, Lilian Bp; Dietrich, Sonia Mc; Felippe, G. M, 1980. Effect of photoperiod on flowering and stevioside content in plants of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Japanese Journal of Crop Science*, 49.4: 569-574.

Zaman, M. M.; Chowdhury, M. A. H.; Chowdhury, Tanzin, 2015. Growth parameters and leaf biomass yield ofSstevia (*Stevia rebaudiana*, Bertoni) as influenced by different soil types of Bangladesh. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, 13.1: 31-37.

1. https://www.stevias.it/it/la-stevia
2. http://www.freedomyoga.it/archiviofiles/STEVIA%20REBAUDIANA.pdf
3. http://www.piantearomatichealbenga.it/Scheda.aspx?code=46&l=it
4. https://www.artoi.it/wp-content/uploads/2013/09/STEVIA-REBAUDIANA-BERTONI-articolo.pdf
5. http://www.vivaiostevia.it/la-stevia/le-varieta.html

RINGRAZIAMENTI

Rivolgo i miei più cari ringraziamenti al Professor Franco Capocasa e al correlatore Luca Mazzoni, che hanno sostenuto la mia idea per questa tesi e dedicato tempo per portarla a compimento.

Ringrazio ovviamente anche i miei genitori e mia nonna per il sostegno economico e morale e per aver sempre creduto in me, lasciandomi totalmente padrona delle mie scelte.