

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU

WYDZIAŁ PRZYRODNICZO - TECHNOLOGICZNY

KIERUNEK: OGRODNICTWO



mgr inż. JOANNA AGATA ŚNIEGOWSKA

Wpływ wybranych czynników agrotechnicznych na wzrost, plonowanie i skład chemiczny *Stevia rebaudiana* Bert.

The effect of selected agronomic factors on growth, yielding and chemical composition of *Stevia rebaudiana* Bert.

Praca doktorska zrealizowana

w Katedrze Ogrodnictwa

pod kierunkiem

Pani prof. dr hab. Anity Biesiady

Wrocław 2024

## SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI.....	2
1. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM .....	3
2. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM.....	5
3. WPROWADZENIE I PRZEGLĄD LITERATURY.....	7
4. HIPOTEZA BADAWCZA I CEL BADAŃ.....	16
5. MATERIAŁY I METODY.....	17
6. WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ .....	22
7. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ I DYSKUSJA.....	23
8. PODSUMOWANIE.....	45
9. WNIOSKI.....	47
10. BIBLIOGRAFIA .....	51
11. DOKUMENTACJA FOTOGRAFICZNA .....	62
12. PUBLIKACJE I MANUSKRYPTY BĘDĄCE W RECENZJI .....	67

## 1. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Obecne społeczeństwo boryka się z wieloma chorobami cywilizacyjnymi, które są powodowane przez siedzący tryb życia oraz niewłaściwy sposób odżywiania. Nadmierne spożycie cukru, rozpowszechnione w tak zwanych krajach pierwszego świata, jest jednym z kluczowych przyczyn coraz częstszego występowania otyłości, cukrzycy oraz insulinooporności wśród ludzi. Choroby te ujawniają się również u coraz młodszych osób niż w przeszłości. Zwiększenie dostępności substancji słodzących, które mogłyby stanowić substytut dla cukru może mieć wpływ na obniżenie spożycia cukrów prostych. Surowiec roślinny pochodzący z rośliny *Stevia rebaudiana* Bert., w przeciwieństwie do syntetycznych środków słodzących, może znaleźć większą akceptację w diecie przeciętnego konsumenta, gdyż większość ludzi preferuje produkty naturalnego pochodzenia. Stewia, poza słodkim smakiem, zawiera wiele witamin, minerałów oraz substancji bioaktywnych o charakterze prozdrowotnym, których nie zawierają sztuczne środki słodzące. Uprawa stewii w Polsce potencjalnie mogłaby zmniejszyć cenę tych roślin oraz słodzików z nich wytwarzanych ze względu na obniżenie kosztów produkcji i transportu, gdyż obecnie największe uprawy stewii znajdują się w Ameryce Południowej i Chinach. Stewia jest jednak rośliną tropikalną, zatem może nie nadawać się do uprawy w umiarkowanym klimacie Polski. Obecnie, w związku z postępującymi zmianami klimatu, średnia temperatura w Polsce ciągle rośnie, co może mieć znaczenie w uprawie stewii w przyszłości.

W ramach rozprawy doktorskiej pt. „Wpływ wybranych czynników agrotechnicznych na wzrost, plonowanie i skład chemiczny *Stevia rebaudiana* Bert.” oceniono możliwość uprawy stewii (*Stevia rebaudiana* Bert.) w umiarkowanym klimacie Polski z wykorzystaniem wybranych zabiegów agrotechnicznych w celu optymalizacji technologii uprawy i uzyskania dużego plonu dobrej jakości. W trzech doświadczeniach polowych, prowadzonych w latach 2014-2016, analizowano wpływ nawożenia wykorzystując różne dawki azotu wnoszone przedwegetacyjnie i pogłównie (0+50 kg N·ha<sup>-1</sup>, 50+50 kg N·ha<sup>-1</sup>, 100+50 kg N·ha<sup>-1</sup>, 150+50 kg N·ha<sup>-1</sup>) oraz formy nawozów azotowych w nawożeniu przedwegetacyjnym (saletra amonowa, siarczan amonu, mocznik), rozstawy (50 cm x 30 cm, 45 cm x 25 cm, 30 cm x 30 cm) jak również częstotliwości nawadniania upraw (dwa razy w tygodniu, raz w tygodniu, w okresie krytycznego niedoboru wody opadowej, brak podlewania). W doświadczeniach

wykorzystano rozsadę stewii produkowaną w wielodoniczkach w ogrzewanej szklarni. Doświadczenia zostały założone na początku czerwca, natomiast zbiór przeprowadzono w I lub II dekadzie września. W trakcie prowadzenia doświadczeń dwukrotnie pobrano materiał roślinny do analiz chemicznych. Liście stewii poddano analizie na zawartość suchej masy, polifenoli, cukrów redukujących, azotanów, witaminy C, chlorofilu a, chlorofilu b, karotenoidów, wapnia, potasu, magnezu, fosforu oraz glikozydów stewiolowych. Wykonano także pomiary parametrów biometrycznych obejmujące: wysokość roślin, zasięg boczny, liczbę pędów I rzędu oraz liczbę liści na pojedynczym pędzie. W trakcie zbioru określono plon całkowity ziela stewii, a także liści, pędów oraz odpadu. Zanalizowano także jednostkową masę pojedynczych roślin oraz liści i pędów z nich uzyskanych.

Doświadczenia polowe wykazały możliwość uprawy stewii jako rośliny jednorocznej w warunków klimatu południowo-zachodniej Polski oraz znaczący wpływ zastosowanych czynników na jej wzrost, plonowanie oraz jakość otrzymanego surowca. Rośliny stewii dorastały średnio do 57,3 cm wysokości, a ich zasięg boczny wynosił 29,3 cm. Wykazano wpływ nawożenia, rozstawy oraz częstotliwości nawadniania na plonowanie stewii. Średni plon ziela stewii uprawianej w Polsce wyniósł  $2,088 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$  i oscyłował w przedziale od  $1,377 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$  do  $2,580 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$ . Natomiast masa uzyskanych liści z plantacji stewii wyniosła średnio  $1,233 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$  i mieściła się w przedziale od  $0,763 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$  do  $1,490 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$ .

## 2. STRESZCZENIE W JEZYKU ANGIELSKIM

Today's society is struggling with many lifestyle diseases that are caused by a sedentary lifestyle and improper nutrition. Excessive sugar consumption, widespread in the so-called first world countries, is one of the key causes of the increasing incidence of obesity, diabetes and insulin resistance among people. These diseases are also appearing in younger people than in the past. Increasing the availability of sweeteners that could be a substitute for sugar may reduce the consumption of simple sugars. The plant raw material stevia derived from the *Stevia rebaudiana* Bert. plant, unlike synthetic sweeteners, may find greater acceptance in the average consumer's diet, as most people prefer natural products. Stevia, apart from its sweet taste, contains many vitamins, minerals and bioactive substances with health-promoting properties that are not present in artificial sweeteners. Cultivation of stevia in Poland could potentially reduce the price of these plants and sweeteners produced from them due to lower production and transport costs, as currently the largest stevia crops are in South America and China. However, it is a tropical plant, therefore it may not be suitable for cultivation in the temperate climate of Poland. Currently, due to ongoing climate change, the average temperature in Poland is constantly increasing, which may be important for the cultivation of stevia in the future.

As part of the doctoral dissertation entitled "The effect of selected agronomic factors on growth, yielding and chemical composition of *Stevia rebaudiana* Bert." the possibility of growing stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) in the temperate climate of Poland was assessed, using selected agrotechnical treatments in order to optimize the cultivation technology and obtain a large, good-quality crop. In three field experiments, conducted in 2014-2016, the impact of fertilization was analyzed using different doses of nitrogen introduced pre-vegetation and top dressing (0+50 kg N·ha<sup>-1</sup>, 50+50 kg N·ha<sup>-1</sup>, 100+50 kg N·ha<sup>-1</sup>, 150+50 kg N·ha<sup>-1</sup>) and forms of nitrogen fertilizers in pre-vegetation fertilization (ammonium nitrate, ammonium sulfate, urea), spacing (50 cm x 30 cm, 45 cm x 25 cm, 30 cm x 30 cm) as also the frequency of irrigation of crops (twice a week, once a week, during the period of critical rainwater shortage, no watering). The experiments used stevia seedlings produced in multi-pots in a heated greenhouse. The experiments were set up at the beginning of June, and the collection was carried out in the first or second decade of September. During the experiments, plant material was collected twice for chemical analyses. Stevia leaves were analyzed for the content of dry matter, polyphenols, reducing

sugars, nitrates, vitamin C, chlorophyll a, chlorophyll b, carotenoids, calcium, potassium, magnesium, phosphorus and steviol glycosides. Biometric parameters were also measured, including: plant height, lateral reach, number of first-order shoots and the number of leaves on a single shoot. During harvesting, the total yield of stevia herb, as well as leaves, shoots and waste was determined. The unit weight of individual plants and leaves and shoots obtained from them was also analyzed.

Field experiments have shown the possibility of growing stevia as an annual plant in the climate conditions of southwestern Poland and the significant impact of the factors used on its growth, yield and quality of the obtained raw material. Stevia plants grew on average to 57.3 cm in height, and their lateral spread was 29.3 cm. The influence of fertilization, spacing and irrigation frequency on stevia yield was demonstrated. The average yield of stevia herb grown in Poland was  $2.088 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$  and ranged from  $1.377 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$  to  $2.580 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$ . However, the weight of leaves obtained from stevia plantations was on average  $1.233 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$  and ranged from  $0.763 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$  to  $1.490 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$ .

### 3. WPROWADZENIE I PRZEGLĄD LITERATURY

Konsumpcja cukru w nadmiernych ilościach jest problemem współczesnego społeczeństwa. Cukier jest jednym z podstawowych surowców dla przemysłu spożywczego, głównie cukiernictwa. Obserwowany jest stale wzrastający trend konsumpcji cukru przez polskie społeczeństwo, spożywanego najczęściej w produktach przetworzonych. Na początku XIX w. cukier był uważany za dobro luksusowe, a jego spożycie na osobę w ciągu roku wynosiło ok. 5 kg, natomiast obecnie jest dobrem pierwszej potrzeby, a jego konsumpcja wyniosła w 2022 już 42,8 kg/rok (GUS, 2023). Problemem dla konsumentów jest tzw. dodatkowy, „ukryty” cukier występujący w wielu produktach spożywczych takich jak soki, napoje bezalkoholowe, napoje alkoholowe, pieczywo, płatki śniadaniowe, produkty mleczne, ketchupy, wyroby wędliniarskie, konserwy mięsne, rybne oraz jedzenie typu fast food. Coraz częściej cukier nazywany jest opisowo: „białą śmiercią”, „białą trucizną” lub „słodką trucizną” (Dychtoń, 2015). Z uwagi na jego nadmierną konsumpcję, związaną z niską ceną i łatwą dostępnością, ma on degeneracyjny wpływ na organizm ludzki, istotną rolę w rozwoju chorób cywilizacyjnych w społeczeństwie oraz właściwości silnie uzależniające. W ostatnich latach zarówno na świecie jak i w Polsce odnotowuje się coraz większy odsetek ludzi cierpiących na choroby związane z podwyższeniem poziomu cukru w organizmie. Wyniki badań wskazują, że nadmierne spożywanie produktów słodzonych, m.in. napojów gazowanych, podnosi ryzyko otyłości u dzieci i dorosłych oraz w dłuższej perspektywie czasu chorób cywilizacyjnych takich jak cukrzyca typu 2, nadciśnienie i choroby układu krążenia (Malik i Hu, 2022). Według danych NFZ do 2035 r. ponad 25% dorosłych kobiet i ponad 35% dorosłych mężczyzn w Polsce będzie chorych na otyłość, a na świecie będzie około 4 mld osób z nadwagą lub chorobą otyłościową. Raport NFZ szacuje, że konsekwencje choroby otyłościowej, takie jak: cukrzyca typu drugiego, nadciśnienie tętnicze, zwyrodnienia kolan wymagające endoprotezoplastyki, bezdech senny i stłuszczenie wątroby kosztowały NFZ tylko w 2023 r. blisko 3,8 mld zł. (NFZ, 2024). Koszty medyczne nie są jedynymi związanymi z nadwagą i otyłością, gdyż w kosztach pośrednich i bezpośrednich klasyfikują się także te związane z problemami technologicznymi, ekonomicznymi, logistycznymi i społecznymi. Szacuje się że w 2019 r. koszty te pochłonęły 2,19% światowego PKB, a jeśli utrzyma się obecna tendencja wzrostowa, to do 2060 r. wydatki te sięgną 3,29% światowego PKB (Okunogbe i in. 2022). Skala problemu została dostrzeżona już w 2011

roku, gdy Organizacja Narodów Zjednoczonych ogłosiła, iż po raz pierwszy w historii ludzkości choroby niezakaźne stanowią większy problem niż choroby o podłożu infekcyjnym. Spośród wymienionych w doniesieniu ONZ chorób znalazła się cukrzyca typu drugiego, zaburzenia na tle metabolicznym oraz otyłość. U podłoża tych schorzeń znajduje się właśnie nadmierne spożywanie cukru. Jak podaje World Obesity Atlas w 2023 roku aż 38% światowej populacji miała nadwagę lub otyłość, a w ciągu kolejnych 12 lat problem ten może dotknąć ponad 50% ludzi (Koliaki i in., 2023; Okręglika i in., 2017). Zmiany te sprawiły, że coraz istotniejsze wydaje się zastępowanie sacharozy substancjami pochodzącymi bezpośrednio z natury, prozdrowotnymi, o małej kaloryczności i dużej sile słodzącej. Wykorzystanie naturalnych substancji słodzących pochodzenia roślinnego do produkcji żywności i napojów może stanowić rozwiązanie problemów związanych z nadmiernym spożyciem cukrów w codziennej diecie. Jedną z roślin wykazujących unikatowe prozdrowotne właściwości, skutecznie zastępującą cukier, jest stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.). Słodki smak liści steвии wynika z zawartości glikozydów stewiolowych w tkankach rośliny. W przeprowadzonych badaniach dotyczących wpływu spożycia liści steвии na organizm ludzki i modelowe organizmy zwierzęce zaobserwowano, iż ma ono prozdrowotny wpływ na organizm, a glikozydy (głównie stewiozyd i rebaudiozyd A) są alternatywą dla sacharozy oraz sztucznych słodzików, dodatkowo niewykazującą skutków ubocznych na wskutek spożycia (Orellana-Paucar, 2023).

### **Systematyka, opis botaniczny i morfologia steвии**

Systematyka botaniczna steвии wg Reveala:

Gromada: okrytonasienne - *Angiospermae*

Podgromada: *Magnoliophytina*

Klasa: *Rosopsida*

Podklasa: astrowe - *Asteridae*

Nadrząd: astropodobne - *Asteranae*

Rząd: astrowce - *Astrales*

Rodzina: astrowate - *Asteraceae*

Rodzaj: stevia - *Stevia*

Gatunek: *Stevia rebaudiana* Bertoni



Rodzaj stewia (*Stevia*) należy do rodziny astrowatych (*Asteraceae*), rzędu astrowce (*Asterales*) oraz klasy okrytonasienne (*Magnoliophyta*). W celu ułatwienia identyfikacji przeszło 230. gatunków z tego rodzaju wielu monografistów taksonomicznych próbowało pogrupować znane rośliny w podrodzajach. Grashoff (1972) przypisał gatunki stewii występujące w Ameryce Północnej do 3 podrodzajów: *Corymbosae* obejmującego 38 gatunków, głównie bylin. Podrodzaj ten charakteryzuje się kwiatostanem typu baldachogrono, a szypułki kwiatowe są krótsze lub równe długości okrywy kwiatowej. Drugi podrodzaj *Podocephalae* składa się z 16 gatunków jednorocznych. Ich kwiatostany są luźne a szypułki kwiatowe dłuższe od okryw. Ostatnim podrodzajem stewii występującej w Ameryce Północnej jest *Fruticosae*, który składa się z 25 gatunków krzewów o kwiatostanach typu baldachogrono. Grashoff (1972) pogrupował stewie południowoamerykańskie na dwa podrodzaje: *Breviaristatae* i *Multiaristatae*. Inny system podziału opracował amerykański botanik Benjamin Lincoln Robinson w latach trzydziestych ubiegłego wieku. Północnoamerykańskie gatunki zawarł w dwóch grupach podrodzajowych: *Corymbosae* i *Podocephalae*, natomiast południowoamerykańskie w trzech: *Eustevia*, *Breviaristatae* i *Multiaristatae*. Do *Multiaristatae* należy między innymi gatunek *Stevia rebaudiana* z charakterystycznymi dla tej grupy aparatami lotnymi na niełupkach (Soejarto, 2001).

*Stevia rebaudiana* jest byliną dorastającą w naturze do 50-60 cm wysokości. Pędy jej są kruche, wzniesione, z tendencją do drewnienia u nasady rośliny. Długość międzywęźli jest zróżnicowana w przedziale od 2 cm do 4 cm. Liście naprzeciwległe siedzące lub na krótkich (3-4 mm) ogonkach dorastają do 2-3 cm długości i 0,6-1 cm szerokości. Wąsko eliptyczna lub odwrotnie lancetowata blaszka liściowa od połowy długości do wierzchołka jest ząbkowana. Pędy oraz liście pokryte są krótkimi włoskami. W uprawie rozmiary liści mogą ulec zwielokrotnieniu do 5 cm długości i 2,5 cm szerokości oraz zmienić teksturę na matową. Cechą charakterystyczną stewii jest intensywny zapach wyczuwalny po rozgnieceniu liścia i słodki smak wszystkich części zielnych rośliny (Bugaj i in., 2013; Kinghorn, 2002). System korzeniowy jest wiązkowy i dobrze rozwinięty z licznymi korzeniami przybyszowymi (Reis i in., 2017; Andolfi i in., 2006).

Stewia jest owadopylną rośliną dnia krótkiego. Na szczycie pędów wytwarza ona kwiatostany przypominające baldachogrona, składające się z 2 do 6 niepozornych

kwiatów (Fatima i in., 2023; Oddone, 1997). W fazie pełnego kwitnienia stewia może wyprodukować ponad 50 kwiatostanów na jednej roślinie (Southward i in., 2004). Kwiaty złożone są barwy białej, pięciopłatkowe, otoczone okrywą działek kielicha. Owocem stewii jest wrzecionowata niełupka, o długości 2,5-3mm, wyposażona w aparat lotny składający się z około 20 puchowych szczecinek. Jest silnie unerwiona i pięciokątna (Kinghorn, 2002). Stewia produkuje nasiona o barwie jasnobrunatnej i ciemnobrązowej. Jedynie nasiona o barwie ciemnej i o jasnym, zbitym wnętrzu są zdolne do kiełkowania, a ich masa 1000 sztuk oscyluje w przedziale 0,15-0,30 g (Carneiro, 1990). Według Lemus-Mondaca i in. (2012) roślina ta wykazuje alogamię.

### **Wymagania klimatyczno-glebowe**

Środowiskiem naturalnym dla *Stevia rebaudiana* są subtropikalne regiony północno-wschodniego Paragwaju, szerokości geograficznej 25°S. Tereny te są położone zazwyczaj na wysokości 200-700 m n.p.m., gdzie roczna suma opadów oscyluje w zakresie 1300-1700 mm. Stewia rośnie blisko zbiorników wodnych na glebach piaszczystych, lecz bogatych w materię organiczną, o pH wynoszącym 6,5 - 7,5. (Ijaz i in., 2015; Jagła, 2011).

W uprawie stewia jest rośliną o niewielkich wymaganiach glebowych. Najlepiej rośnie na glebach przepuszczalnych, o odczynie zbliżonym do występującego na naturalnych stanowiskach. Można uprawiać ją na wysokości do 1500 m n.p.m. Stewia nie toleruje suszy, gleba powinna być stale wilgotna, lecz nie podmokła. Preferowana roczna suma opadów to 1500 - 1800 mm. Stewia wymaga stanowiska ciepłego i słonecznego, przy nasłonecznieniu powyżej 12 h można zaobserwować intensywną produkcję liści i wzmożoną syntezę glikozydów stewiolowych. Znosi częściowe zacielenie, jednak spowalnia to jej wzrost (Ijaz i in., 2015).

*Stevia rebaudiana* jest stosunkowo wytrzymała na wysokie temperatury, wzrost roślin zostaje zahamowany przy 9°C, a młode pędy zamierają w temperaturze około 0°C. Maksymalna temperatura niewywołująca zamierania rośliny to 43°C. Dla prawidłowego wzrostu i obfitego plonowania optymalny zakres temperatur to 21-30°C (Fatima i in., 2023; Ijaz i in., 2015).

## Pochodzenie i historia stewii

Przedstawiciele rodzaju *Stevia* występują w subtropikalnych i tropikalnych rejonach Ameryki Środkowej i Ameryki Południowej. Niektóre gatunki można spotkać także w Nowym Meksyku, Teksasie i Arizonie. Kolebką najbardziej znanej rośliny z tego rodzaju: *Stevia rebaudiana*, jest masyw górski Cordillera del Amambay na pograniczu Paragwaju i Brazylii (Soejarto, 2001).

Stewia zainteresowała botaników już w 1887 roku, a pierwszy opis botaniczny sporządził botanik szwedzko-włoskiego pochodzenia Moisés Santiago Bertoni. Początkowo nadał jej nazwę *Eupatorium rebaudianum* Bert. na pamiątkę pierwszego chemika badającego tę roślinę, Paragwajczyka Ovidio Rebaudi (Andolfi i in., 2006). Dopiero w 1905 roku zmieniono jej nazwę na *Stevia rebaudiana* Bert. Wcześniej roślina ta była znana i wykorzystywana przez plemiona rdzennych Indian Guarani i Mato Grosso jako *ka'a he'ê*: słodki liść do sporządzania leczniczych naparów oraz jako przekąska (Salvador-Reyes i in., 2014; Ramesh i in., 2006). W 1920 roku zaczęto uprawiać stewię na dużych plantacjach w Brazylii i Paragwaju (Barriocanal i in., 2008). Dopiero w roku 1942 wysłano jej nasiona do Londynu i rozpoczęto pierwsze w Europie próby uprawy, które okazały się nieudane. W 1968 roku japoński badacz z Tokio University rozpoczął prace nad wprowadzeniem do upraw stewii zintegrowanego systemu produkcji obejmującego agrotechnikę oraz ekstrakcję i oczyszczanie glikozydów stewiolowych, dzięki którym stewia zawdzięcza słodki smak (Ashok, 2011). Obecnie uprawy komercyjne stewii można spotkać w: Paragwaju, Meksyku, Brazylii, Urugwaju, Argentynie, Peru, Kolumbii, Stanach Zjednoczonych, Korei Południowej, Indiach, Indonezji, Tanzanii, Chinach, Wietnamie, Tajwanie, Tanzanii, Japonii, Tajlandii, Filipinach, Egipcie i Izraelu. (Miklar, 2009; Midmore i Rank, 2002). Największym producentem stewii na świecie są Chiny i eksportują około 80% swojej produkcji na światowy rynek. Japonia natomiast jest krajem z największą liczbą fabryk ekstrahujących i przetwarzających glikozydy stewiolowe (Schiatti-Sisó i in., 2023). Stewia jest także popularnym obiektem badawczym; uprawy eksperymentalne nad agrotechniką uprawy, rozmnażaniem, hodowlą odmian, izolacją stewiozydów z surowca prowadzone są zarówno w krajach gdzie uprawiana jest na dużą skalę, jak i w mniej przystosowanych pod względem warunków klimatyczno-glebowych np.: Kanadzie, Malezji, Ukrainie, Czechach, Hiszpanii, Niemczech, Wielkiej Brytanii, Włoszech, Turcji

(Büyüik i in., 2022; Singh i in., 2022; Amien i in, 2021; Clemente i in., 2021; Youssef i in., 2021; Midmore i Rank, 2002)

W latach 80. XX wieku Komitet Naukowy ds. Żywności, na podstawie dostępnych wyników badań wykonanych na Uniwersytecie Illinois w Chicago uznał, że jeden ze stewiozydów: rebaudiozyd A, jest substancją genotoksyczną i może mieć działanie rakotwórcze, co spowodowało zakaz spożycia tej substancji. Tymczasem w Japonii stewia była powszechnie stosowana w przemyśle spożywczym już od lat 70., kiedy to w 1971 po raz pierwszy glikozydy stewiolowe zostały wprowadzone do obrotu towarowego jako słodzik przez Japońską firmę Morita Kagaku Kogyo Co. (Wisniewska i in., 2011), zaspokajając aż 40% krajowego rynku cukierniczego. Dopiero w 2008 roku Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA) oraz w latach 2000-2009 Komitet Ekspertów FAO/WHO ds. Dodatków do Żywności, zweryfikował wcześniejsze badania, udowadniając brak negatywnego wpływu stewiozydów na organizm człowieka. Natomiast 10. marca 2010 r. Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności, zlecił ANS (Panel ds. dodatków do żywności i składników pokarmowych dodawanych do żywności) sporządzenie opinii naukowej nt. bezpieczeństwa spożycia glikozydów stewiolowych. Na jej podstawie określono dopuszczalne dzienne spożycie tych substancji na poziomie 4 mg na kg masy ciała (Orellana-Paucar, 2023). Komisja Europejska 11. listopada 2011 roku przyjęła rozporządzenie dopuszczające stosowanie glikozydów stewiolowych w 31 różnych kategoriach żywności, takich jak napoje, desery, słodycze i słodziki. Ekstrakt ze stewii jako dodatek do żywności trafił do sklepów pod numerem E960 (Dziennik Urzędowy UE L 295/205; Bugaj i in., 2013). W Chinach, Korei, Brazylii, Paragwaju czy Japonii, glikozydy stewiolowe są uważane za substancje pochodzenia naturalnego i jako takie są wykorzystywane (De i in., 2013). W roku 2013 firma The Coca-Cola Company zaczęła produkować napój słodzony stewią co zapoczątkowało szeroko rozpowszechnione dosładzenie produktów o obniżonej zawartości cukru za pomocą tej rośliny (Heyden, 2013). Szacuje się, że światowy rynek stewii jako naturalnego słodzika, który w 2018 r. wyniósł 637 mln dolarów, osiągnie 1,16 mld dolarów do 2026 r., przy założonej rocznej stopie wzrostu wynoszącej 8% (de Andrade i in., 2024).

## Właściwości zdrowotne i żywieniowe stewii

W medycynie ludowej Indian z Paragwaju stewia była stosowana jako roślina lecznicza m.in. wzmacniająca serce, przyspieszająca gojenie się ran, na zgaęgę. Badania na modelach zwierzęcych i ludziach wykazały możliwość zastosowania stewii w leczeniu otyłości oraz nadciśnienia. Spożycie stewii pozytywnie wpływa na układ krążenia, obniża ciśnienie krwi, a napar z liści tej rośliny ma działanie uspokajające. Stewiozyd i jego pochodne mają bezpośredni wpływ na metabolizm glukozy. Badania wykazały, że stewiol ogranicza wchłanianie się glukozy w mikrokosmkach jelita czczego, obniżając jej przyswajanie przez organizm. Ponadto, glikozydy stewiolowe mają wpływ na syntezę glukozy podczas glukoneogenezy. Stewia korzystnie wpływa na układ trawienny, zapobiega nadkwasowości i bólom żołądka. Wykazuje właściwości przeciwpróchnicze, zahamowując rozwój *Streptococcus mutans*. Ma działanie bakteriobójcze, przeciwzapalne, przeciwgrzybicze i hamuje rozwój drożdży (Orellana-Paucar, 2023; Peteliuk i in., 2021;). Dzięki wysokiej zawartości witaminy C, cynku i seleniu stewia wzmacnia układ odpornościowy i wspomaga leczenie przeziębień i grypy. Glikozydy stewiolowe (stewiozyd, stewiol i izostewiol) łagodzą stany zapalne skóry oraz wykazują właściwości antynowotworowe w komórkach skórnych modeli zwierzęcych, dodatkowo korzystnie wpływając na układ krwionośny. Badania nad hamowaniem rozwoju nowotworów u ludzi wykazały korzystny wpływ tych glikozydów w przypadku raka okrężnicy, piersi i przewodu pokarmowego (Calapardo i Bryl, 2024; Orellana-Paucar, 2023;). Ziele stewii ma ponadto walory kosmetyczne, okłady i maseczki ze sproszkowanych liści ujędrniają skórę, poprawiają koloryt twarzy, wygładzają zmarszczki (Fatima i in., 2023; Miklar, 2009).

Dzięki wytrzymałości na niskie i wysokie temperatury stewia nadaje się do pieczenia, smażenia i produkcji marynat. Słodzik ze stewii stosuje się między innymi w produkcji jogurtów, kefirów i innych przetworów mlecznych, produkcji słodczy i galaretek, słodzenia napojów (Muller, 2011).

Stewia poza glikozydami stewiolowymi zawiera także białko, tłuszcze, węglowodany, błonnik pokarmowy, witaminy (witaminę C, B2, kwas foliowy) oraz mikro- i makroelementy (Zn, Fe, K, Na, Mg, Ca), olejki eteryczne bogate w kwasy tłuszczowe: palmitynowy, stearynowy, oleinowy, linolowy i linolenowy oraz inne

związki bioaktywne, takie jak: terpenoidy, flawonoidy, polifenole, chlorofile, karotenoidy, garbniki i in. Suszone liście stewii zawierają 11,2-16,0 g białka, 61,9 g węglowodanów, 1,9-3,73 g tłuszczu i 6,8- 15,2 g błonnika (Schiatti-Sisó i in., 2023; Peteliuk i in., 2021).

### **Charakterystyka glikozydów stewiolowych**

W liściach stewii znajduje się ponad 30 różnych glikozydów stewiolowych. Do najbardziej znanych należą: stewiozyd, rebaudiozydy A-F, dulkozyd A, stewiolmonozyd, stewiolbiozyd, rebaudiozyd M, U, T, R, S (Peteliuk i in., 2021; Perera i in., 2017; Ibrahim i in., 2016).

Zawartość glikozydów stewiolowych w suchej masie liści waha się od 4 do 20%. Wartość ta jest zależna od miejsca pochodzenia, odmiany i warunków klimatycznych w jakich rośnie stevia oraz jest zmienna w zależności od części rośliny z jakiej pozyskuje się te związki. Szacuje się, że rośliny w naturalnych warunkach pierwotnego siedliska w Paragwaju zawierają 9-13% glikozydów stewiolowych, natomiast w uprawie w Chinach do 6% (Kolanowski, 2013). Największą zawartością glikozydów stewiolowych charakteryzują się jej liście, natomiast najmniej jest ich w łodygach i nasionach. Poziom glikozydów w trakcie wzrostu rośliny zwiększa się, aż do momentu kwitnienia (Ramesh i in., 2006).

Szacuje się że średnia zawartość poszczególnych glikozydów stewiolowych w stewii wynosi: stewiozydu 4-13% s.m., rebaudiozydu A 2-4% s.m., rebaudiozydu C 1-2% s.m oraz dulkozydu 0,4-0,7% s.m. Pozostałe znajdujące się w roślinie glikozydy to występujące w śladowych ilościach rebaudiozyd B, D i E oraz stewiolbiozyd (Goyal i in., 2010; Pól i in., 2007).

Charakterystyczną cechą glikozydów stewiolowych, poza słodkim smakiem, jest ich przynależność do związków nieulegających procesom fermentacji. Cechują się szerokim zakresem tolerancji na pH, wynoszącym od 2 do 9. W roztworach wodnych natomiast wykazują odporność na działanie wysokich temperatur, osiągających 120°C oraz na działanie światła słonecznego (Ahmad i in., 2020; Kolanowski, 2013; Abou- Arab i in., 2010). Ważną cechą tych glikozydów jest ich duża stabilność podczas przechowywania w temperaturze pokojowej. W przypadku podwyższenia temperatury,

w kwaśnym środowisku wodnym, takim jak, na przykład, w napojach gazowanych, może następować hydroliza glikozydów stewiowych do stewiolu (Catharino i Santos, 2012). Nie wpływa to negatywnie na słodki smak i inne cechy produktu (Lemus-Mondaca i in., 2012). Negatywny wpływ wykazano jednak podczas gotowania na parze kiedy to stewiozyd stał się gorzki i ostry, dlatego konieczne jest zachowanie odpowiedniej zawartości tego związku w produktach przygotowanych do takiej obróbki termicznej (Hernández i in., 2022).

**Stewiozyd** został wyizolowany po raz pierwszy w 1931 roku przez francuskich chemików Briedel i Lavieille (Barriocanal i in., 2008), natomiast jego strukturę chemiczną określono dopiero w 1952 roku. Stewiozyd należy pod względem chemicznym do diterpenoidowych alkoholi karboksylowych, składa się z trzech cząsteczek glukozy i stewiolu. Wyekstrahowany z liści stewii stewiozyd ma postać bezwonnego, krystalicznego, białego proszku. Szacuje się, że stewiozyd jest od 150 do 300 raz słodszy od sacharozy (Marcinek i Krejpcio, 2015; Sharma i in., 2012), jednakże ma bardziej wyczuwalny gorzki i lukrecjowy posmak niż rebaudiozyd (Kalicka i in., 2017).

**Rebaudiozyd A** także jest glikozydem diterpenowym. Jest on o 180-400 razy słodszy od cukru (Kaplan i Turgut, 2019). Charakteryzuje się najbardziej pożądanym profilem smakowym oraz większą stabilnością (Bugaj i in., 2013; Kolanowski, 2013). Co istotne, jest lepiej rozpuszczalny w wodzie w porównaniu do stewiozydu. Wpływ na jego trwałość ma przede wszystkim temperatura i wilgotność powietrza, których wartości optymalne wynoszą 23°C i 60% oraz pH w zakresie od 3 do 8 (Kroyer, 2010). W ocenie sensorycznej, wskazuje się, że rebaudiozyd A charakteryzuje się najintensywniejszym smakiem słodkim i najsłabszym posmakiem gorzkim oraz kwaśnym (Abelyan i in., 2012). Jednakże analizy sensoryczne porównujące sacharozę z rebaudiozydami: A, D i M, przeprowadzone w 2020 roku, wykazały najbardziej wyczuwalny gorzki posmak rebaudiozydu A w porównaniu z pozostałymi, zwłaszcza rebaudiozydem M (Tao i Cho, 2020). Ponadto, w porównaniu z aspartamem i sacharozą glikozydy stewiowe charakteryzują się najdłuższym czasem odczuwania słodkiego posmaku po spożyciu produktu je zawierającego (Lemus-Mondaca i in., 2012).

#### **4. HIPOTEZA BADAWCZA I CEL BADAŃ**

Hipoteza badawcza zakłada, że wybrane zabiegi agrotechniczne zastosowane w uprawie stewii (*Stevia rebaudiana* Bert.) w warunkach polowej uprawy na terenie Polski południowo-zachodniej wpłyną na wzrost, plonowanie i skład chemiczny roślin.

Celem badań była ocena możliwości uprawy stewii w strefie klimatu umiarkowanego z optymalnie dobranymi zabiegami agrotechnicznymi wpływającymi w znaczącym stopniu na wielkość plonu i jakość pozyskiwanego surowca. Praca miała na celu również przedstawienie przeglądu światowej literatury i aktualnej wiedzy na temat rośliny jaką jest *Stevia rebaudiana* Bert., jej morfologii, historii i właściwości.



## 5. MATERIAŁY I METODY

Doświadczenia przeprowadzono w latach 2014-2016 w Psarach (5119055913609418"N, 170336781036313"E), w Stacji Badawczo-Dydaktycznej Roślin Warzywnych i Ozdobnych Katedry Ogrodnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Badania obejmowały trzy doświadczenia, w których analizowano wpływ dawki i formy nawozu azotowego, częstotliwość podlewania i zastosowanie różnej rozstawy roślin w polowej uprawie stewii.

Eksperymenty obejmowały produkcję materiału roślinnego, założenie doświadczeń polowych, wykonanie pomiarów biometrycznych uprawianych roślin, analizę chemiczną wybranych składników zawartych w pozyskanym surowcu, określenie wielkości plonu i analizę statystyczną uzyskanych wyników.

### **Materiał badawczy**

- Materiał roślinny: rośliny *Stevia rebaudiana* Bert.

Rozsada do doświadczeń polowych pochodziła z własnej uprawy szklarniowej. Nasiona pozyskane z firmy W. Legutko (Jutrosin, Polska) wysiewano w pierwszej dekadzie kwietnia, rzutowo do skrzynek wysiewnych o wymiarach 30 x 40 cm wypełnionych substratem torfowym. Następnie przykrywano je cienką warstwą przesianego substratu i podlewano. Po upływie 3-4 tygodni od siewu nasion, siewki z wykształconą przynajmniej jedną parą liści właściwych, przepikowano do 54-komórkowych wielodoniczek wypełnionych substratem torfowym. Rośliny posiadające minimum 3 pary liści właściwych i około 10 cm wysokości przesadzano w III dekadzie maja do doniczek o średnicy 10 cm. Wszystkie skrzynki wysiewne, wielodoniczki, doniczki i narzędzia służące do pikowania oraz przesadzania, przed użyciem, dezynfekowano 1% roztworem HortiSeptu 402D.

Materiał roślinny do analiz chemicznych pozyskiwano z uprawy polowej dwukrotnie: w trakcie okresu wegetacyjnego w lipcu oraz bezpośrednio przed zbiorem we wrześniu. Zdrowe, w pełni wykształcone liście z ½ wysokości rośliny pobierano z kilku roślin z każdego poletka, przy czym masa próby z pojedynczej rośliny wynosiła około 10-15 g. W zależności od rodzaju analizy i metodyki wykorzystywano materiał świeży albo poddany procesowi suszenia.

## Modele doświadczeń polowych

Pierwsze doświadczenie (dwuczynnikowe) zostało założone metodą losowanych bloków, obejmowało 10 kombinacji nawozowych w 3 powtórzeniach. Pierwszym czynnikiem w doświadczeniu była forma nawozu azotowego stosowanego przedwegetacyjnie tj.: saletra amonowa, siarczan amonu i mocznik. Drugim czynnikiem była użyta dawka 50, 100, 150 kg N·ha<sup>-1</sup>. W kontroli nie stosowano nawożenia przedwegetacyjnego. We wszystkich obiektach pogłównie zastosowano saletrę amonową w dawce 50 kg N·ha<sup>-1</sup>.

	N50	N50	N50		S50	S50	S50		U50	U50	U50		C							
	N100	N100	N100		S100	S100	S100		U100	U100	U100		C							
	N150	N150	N150		S150	S150	S150		U150	U150	U150		C							

Rys. 1 Plan polowy doświadczenia pierwszego

\*Oznaczenia na planie: N50- saletra amonowa w dawce 50 kg N·ha<sup>-1</sup>, N100- saletra amonowa w dawce 100 kg N·ha<sup>-1</sup>, N150- saletra amonowa w dawce 150 kg N·ha<sup>-1</sup>, S50- siarczan amonu w dawce 50 kg N·ha<sup>-1</sup>, S100- siarczan amonu w dawce 100 kg N·ha<sup>-1</sup>, S150- siarczan amonu w dawce 150 kg N·ha<sup>-1</sup>, U50- mocznik w dawce 50 kg N·ha<sup>-1</sup>, U100- mocznik w dawce 100 kg N·ha<sup>-1</sup>, U150- mocznik w dawce 150 kg N·ha<sup>-1</sup>, C- brak nawożenia przedwegetacyjnego. Szare obszary mają powierzchnie 0,5m<sup>2</sup> i stanowią pasy ochronne oddzielające badane czynniki.

Drugie doświadczenie (jednoczynnikowe) zostało założone metodą losowanych bloków w 3 powtórzeniach. Obejmowało ono jeden czynnik jakim było zagęszczenie sadzenia roślin na jednostce powierzchni. Do doświadczenia wybrano rozstawy: 50 cm x 30 cm (6,67 roślin na 1m<sup>2</sup>), 45 cm x 25 cm (8,89 roślin na 1 m<sup>2</sup>), 30 cm x 30 cm (13,33 roślin na 1 m<sup>2</sup>).

	I	I	I		II	II	II		III	III	III									

Rys. 2 Plan polowy doświadczenia drugiego

\*Oznaczenia na planie: I- rozstawa 30 x 30 cm, II- rozstawa 45 x 25 cm, III- rozstawa 50 x 30 cm. Szare obszary mają powierzchnię 0,5m<sup>2</sup> i stanowią pasy ochronne oddzielające badane czynniki.

Trzecie doświadczenie (jednoczynnikowe) zostało założone metodą losowanych bloków w 4 powtórzeniach. Badanym czynnikiem agrotechnicznym było podlewanie w różnej częstotliwości: raz w tygodniu, dwa razy w tygodniu, tylko w okresach krytycznego niedoboru wody opadowej przewidziano również kontrolę bez podlewania.

	2W	2W	2W	2W		1W	1W	1W	1W											
	NR	NR	NR	NR		OW	OW	OW	OW											

Rys. 3 Plan polowy doświadczenia trzeciego

\*Oznaczenia na planie: 2W- podlewanie 2 razy w tygodniu, 1W- podlewanie raz w tygodniu, NR- podlewanie w okresach krytycznego niedoboru opadów, OW- brak podlewania. Szare obszary mają powierzchnię 0,5m<sup>2</sup> i stanowią pasy ochronne oddzielające badane czynniki.

## Metody badawcze

### Pomiary biometryczne

Pomiary biometryczne roślin stewii obejmowały pomiar wysokości roślin, ich zasięgu bocznego wykonywanego na 2/3 wysokości rośliny, liczby pędów I rzędu oraz liczby liści na pojedynczym, najniższym pędzie I rzędu. Podczas przeprowadzania doświadczenia drugiego pomiary wykonano w lipcu i we wrześniu, natomiast w doświadczeniu pierwszym i trzecim we wrześniu.

### Analizy chemiczne

Analizy chemiczne zostały wykonane na materiale roślinnym oraz w glebie przed założeniem doświadczeń. W próbie gleby oznaczono wartość pH, zasolenie, zawartość magnezu, potasu, fosforu, wapnia i azotanów.

Tabela 1. Metody badawcze, badane parametry oraz aparatura wykorzystywana w ramach eksperymentów 1-3

<b>Analiza laboratoryjna/ badany parametr</b>	<b>Metoda</b>	<b>Aparatura</b>
Procentowy udział suchej masy	Metoda wg normy PN-90/A-75101/03	- suszarka Binder ED400 (Merzet) - waga WTC2000 (Radwag)
Magnez, Fosfor	Metoda spektrofotometryczna wg Nowosielskiego (1988)	- wytrząsarka MaxQ2000 (Thermo Fisher Scientific) - spektrofotometr WPA S106 (Biochrom)
Potas, Wapń	Metoda analizy fotometrii płomieniowej wg Nowosielskiego (1988)	- wytrząsarka MaxQ2000 (Thermo Fisher Scientific) - fotometr płomieniowy Carlzeiss-Jena 188325 10/2603
N-NO <sub>3</sub>	Metoda jonometryczna wg Nowosielskiego (1988)	- wytrząsarka MaxQ2000 (Thermo Fisher Scientific) - jonometr Orion 5 Star (Thermo Fisher Scientific)
Cukry redukujące	Metoda Lane-Eynon, wg normy PN-90/A-75101/07	- łaźnia wodna VEB MLW (Prüfgerate- werk)
Chlorofil A, Chlorofil B, Karotenoidy	Metoda spektrofotometryczna (Godlewska i in. 2021)	- spektrofotometr WPA S106 (Biochrom)
Witamina C	Metoda miareczkowania Tillmans'a wg normy PN-90/A-75101/11	nie dotyczy
Polifenole ogółem	Metoda spektrofotometryczna z wykorzystaniem odczynnika Folina-Ciocalteu (Godlewska i in. 2021)	- wirówka 350R (MPW) - spektrofotometr Spectroquant Pharo100 (Merck)

Glikozydy stewiolowe	Chromatografia cieczowa (HPLC) (Vaněk i in. 2001)	- Dionex system+ TCC-3000SD (Thermo Fisher Scientific)
Wartość pH	Potencjometryczna metoda pomiaru pH	- pHmetr CPI501 (ELMETRON)
Zasolenie	Metoda jonometryczna	- jonometr model 142 (ORION)

### **Analiza plonu**

Podczas zbioru roślin, przeprowadzanego w pierwszej dekadzie września, przed wejściem roślin w fazę kwitnienia, określono masę całych roślin, masę liści z jednej rośliny, masę pędów oraz masę odpadu (uszkodzone, zaschnięte lub chore części roślin). Wyliczono procentowy udział poszczególnych części oraz określono plon z jednostki powierzchni.

## **6. WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

1. Śniegowska, Joanna, Biesiada, Anita i Gasiński, Alan, 2024. Influence of the Nitrogen Fertilization on the Yield, Biometric Characteristics and Chemical Composition of *Stevia rebaudiana* Bertoni Grown in Poland. *Molecules*. 2024. Vol. 29, p. 1–22. DOI 10.3390/molecules29081865. IF=4,6 , Punktacja MNiSW = 140.
2. Śniegowska, J., Biesiada, A., Effect of spacing on growth, yield and chemical composition of stevia plants (*Stevia rebaudiana* Bert.)
3. Śniegowska, J., Biesiada, A. i Gasiński, A., Irrigation practice in the cultivation of *Stevia rebaudiana* Bert. in cooler climates - case study in Poland.

## **7. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ I DYSKUSJA**

Tematyka prac badawczych, które przygotowano w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej dotyczy oceny wpływu wybranych zabiegów agrotechnicznych na uprawę stewii (*Stevia rebaudiana* Bert.) w warunkach klimatycznych Polski.

Wszystkie prace stanowią jednotematyczny cykl do publikacji, które dotyczą nieopisanego wcześniej w literaturze krajowej i w małym zakresie w literaturze światowej wpływu zabiegów agrotechnicznych na wzrost roślin oraz poprawę ilości i jakości plonu stewii uprawianej w Polsce. Badania dotyczyły doboru odpowiedniego nawożenia przedwegetacyjnego, rozstawy roślin oraz częstotliwości nawadniania upraw.

Omawiane publikacje przedstawiono zgodnie z chronologią ich tworzenia. Poniżej przedstawiono najważniejsze założenia i osiągnięcia przeprowadzonych badań.

**Doświadczenie nr 1, opisane w publikacji pt. „Influence of the Nitrogen Fertilization on the Yield, Biometric Characteristics and Chemical Composition of *Stevia rebaudiana* Bertoni Grown in Poland.”**

W doświadczeniu opisanym w pierwszej publikacji zastosowanymi czynnikami były forma i dawka nawozu azotowego stosowanego w uprawie polowej stewii (*Stevia rebaudiana* Bert.). W celu oceny możliwości uzyskania z uprawy dużych plonów dobrej jakości oraz zbadania parametrów wzrostu roślin zastosowano przedwegetacyjnie trzy formy nawozów azotowych: saletrę amonową (N), siarczan amonu (S) i mocznik (U), użytych w trzech dawkach  $50 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ ,  $100 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$  i  $150 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ , wraz z ujednoliconym nawożeniem pogłównym w postaci  $50 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$  saletry amonowej. Kontrolę w doświadczeniu stanowił obiekt bez nawożenia przedwegetacyjnego, z zachowaniem nawożenia pogłównego. Doświadczenie polowe zakładano w I dekadzie czerwca, na czarnej ziemi zdegradowanej o zawartości próchnicy 1,8%, lekko alkalicznej (pH 7,1-7,3) i zasoleniu  $57 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-3}$ , o średniej zawartości fosforu-  $61 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ , potasu-  $320 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ , wapnia-  $3000 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  i magnezu-  $80 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Poletka eksperymentalne o powierzchni  $1\text{m}^2$  nawieziono przygotowanymi nawozami, następnie wymieszano nawozy z glebą i okryto powierzchnię pola czarną agrowłókniną. Rostadę stewii sadzono w rozstawie  $45 \times 20 \text{ cm}$ , po 10 roślin na poletko i pielęgnowano zgodnie z dobrą praktyką ogrodniczą. W trakcie okresu wegetacyjnego i bezpośrednio przed zbiorem pobrano próbki materiału roślinnego do analiz chemicznych. Bezpośrednio przed zbiorem wykonano także pomiary biometryczne roślin. Zbiór wykonano w I dekadzie września. Przeprowadzone analizy i pomiary wykazały różnicujący wpływ nawożenia azotem na wzrost i plonowanie stewii. Zastosowanie przedwegetacyjnie saletry amonowej w dawce  $150 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$  oraz mocznika w dawce  $100 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$  korzystnie wpłynęło na masę pojedynczej rośliny ( $0,243\text{-}0,244 \text{ g}$ ), podczas gdy w obiekcie kontrolnym średnia masa jednej rośliny była istotnie mniejsza i wynosiła jedynie  $0,137 \text{ g}$ . Takie same zależności odnotowano przy pomiarze masy liści oraz pędów. Największą masę i udział procentowy odpadu stwierdzono u roślin z poletek nawożonych siarczanem amonu w dawce  $150 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ . Plon ogółem stewii wynosił od  $13370 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  (kontrola) do  $24370 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  (mocznik w dawce  $100 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) (Tabela 2). Uzyskany w doświadczeniu plon nie był zbliżony do plonów stewii uprawianej w Etiopii w różnych rozstawach ( $16951\text{-}26388 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) (Tadesse i in., 2016). Jednakże badania prowadzone w Etiopii nie obejmowały



zróżnicowanego nawożenia azotem. Bardziej właściwe byłoby zatem porównanie tych danych z plonem uzyskanym w doświadczeniu bez nawożenia przedwegetacyjnego, który był najmniejszy i wynosił 13770 kg·ha<sup>-1</sup>. Natomiast dane z eksperymentu przeprowadzonego przez Shivani i in. (2019) w Indiach wykazały, że plon liści stewii kształtował się na poziomie 5150–7040 kg·ha<sup>-1</sup> (w zależności od rozstawy roślin) oraz od 6280 kg·ha<sup>-1</sup> przy nawożeniu w dawce 50 kg N·ha<sup>-1</sup> do 10540 kg·ha<sup>-1</sup> przy nawożeniu w dawce 100 kg N·ha<sup>-1</sup> (Shivani i in., 2019). Z danych uzyskanych w badaniach własnych wynika, że przy zastosowaniu 50 kg N·ha<sup>-1</sup> można uzyskać większy plon liści stewii niż w Indiach przy użyciu dawki 100 kg N·ha<sup>-1</sup>. Dodatkowo stosunek liści do masy roślin w Indiach mieścił się w przedziale 39,3-43,7%, czyli był znacznie mniej korzystny od udziału procentowego liści uzyskanego podczas uprawy w Polsce. Liść jest podstawowym surowcem dla którego uprawia się tą roślinę.

Tabela 2. Wpływ sposobu nawożenia przedwegetacyjnego azotem na plon stewii (*Stevia rebaudiana* Bert.)

Próba*	Cale rośliny	Liście	Pędy	Odpad
	[kg·ha <sup>-1</sup> ]			
<b>C</b>	13770±2010b**	7630±400c	5570±1210c	530±230c
<b>N50</b>	18570±2490ab	10630±1200b	6530±1140b	1400±410a
<b>N100</b>	21100±980a	13230±310a	7000±960a	870±400ab
<b>N150</b>	24330±2510a	14830±1630a	8600±1310a	900±460ab
<b>S50</b>	18300±1770ab	11030±1010b	6500±610b	800±200b
<b>S100</b>	19630±3660ab	12030±1780ab	6970±1360ab	630±120bc
<b>S150</b>	20630±3550a	11700±2690ab	7200±1410ab	1730±620a
<b>U50</b>	22130±4950a	13200±2270a	7700±1270ab	1230±400a
<b>U100</b>	24370±4900a	14900±2860a	8770±1060a	700±170b
<b>U150</b>	23870±3610a	14530±1530a	8400±1220a	870±340ab
<b>Średnia</b>	20670±4390	12370±2940	7320±1700	970±690

\*Oznaczenia w tabeli: N50- saletra amonowa w dawce 50 kg N·ha<sup>-1</sup>, N100- saletra amonowa w dawce 100 kg N·ha<sup>-1</sup>, N150- saletra amonowa w dawce 150 kg N·ha<sup>-1</sup>, S50- siarczan amonu w dawce 50 kg N·ha<sup>-1</sup>, S100- siarczan amonu w dawce 100 kg N·ha<sup>-1</sup>, S150- siarczan amonu w dawce 150 kg N·ha<sup>-1</sup>, U50- mocznik w dawce 50 kg N·ha<sup>-1</sup>, U100- mocznik w dawce 100 kg N·ha<sup>-1</sup>, U150- mocznik w dawce 150 kg N·ha<sup>-1</sup>, C- brak nawożenia przedwegetacyjnego. \*\*Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie; test Duncana (p<0,05)

Największy plon ziela oraz liści stewii odnotowano przy nawożeniu przedwegetacyjnym saletrą amonową w dawce 100 i 150 kg N·ha<sup>-1</sup>, siarczanem amonu w dawce 150 kg N·ha<sup>-1</sup>, oraz mocznikiem stosowanym we wszystkich dawkach. Wskazuje to na korzystne oddziaływanie mocznika jako nawozu przedwegetacyjnego dla stewii oraz sporymi wymaganiami żywieniowymi tej rośliny odnośnie azotu. Saletra amonowa w dawce 150 kg N·ha<sup>-1</sup> oraz mocznik w dawce 50 kg N·ha<sup>-1</sup> miały nieco negatywne oddziaływanie w postaci dużej masy tzw. odpadu czyli liści przedwcześnie zeschniętych. Najkorzystniejszy udział procentowy liści w ziele odnotowano w stewii nawożonej przedwegetacyjnie saletrą amonową w dawce 100 kg N·ha<sup>-1</sup> (62,62%) (wyniki są przedstawione w artykule nr 1). Stewia w trakcie wegetacji dobrze zareagowała na nawożenie azotem i niezależnie od formy nawozu dostarczonego przedwegetacyjnie oraz dawki N rośliny w kombinacjach nawożonych tym składnikiem były wyższe o ok. 10-13 cm niż w obiekcie kontrolnym nawożonym jedynie pogłównie (dane przedstawiono w publikacji nr 1). Podobną reakcję roślin na nawożenie N zaobserwowano w Indiach w warunkach klimatycznie optymalnych dla wzrostu tego gatunku, gdzie rośliny nawożone azotem były o 13-38% wyższe od nienawożonych (Baghat i in., 2022). Największy zasięg boczny odnotowano u roślin uprawianych na poletkach nawożonych mocznikiem w dawce 100 kg N·ha<sup>-1</sup> (32,39 cm), natomiast największą liczbę pędów I rzędu (13,61) u roślin z poletek nawożonych siarczanem amonu w dawce 50 kg N·ha<sup>-1</sup>. Najwięcej liści na pojedynczym pędzie wytworzyły rośliny nawożone przedwegetacyjnie saletrą amonową w dawce 150 kg N·ha<sup>-1</sup> (34,89).

Analizy chemiczne wykazały zawartość suchej masy w zakresie 22,97%-26,10% w lipcu oraz 27,44-30,04% we wrześniu, a analiza statystyczna nie wykazała istotnego wpływu badanego czynnika agrotechnicznego na jej poziom. Zawartość makroelementów P, K, Mg i Ca (Tabela 3) zwiększała się wraz ze wzrostem roślin i niezależnie od poziomu zastosowanego nawożenia, ich koncentracja była większa we wrześniu niż w lipcu. Największą zawartość wapnia w liściach roślin uzyskano nawożąc poletka całkowitą dawką N w ilości 150+50 kg N·ha<sup>-1</sup> we wszystkich formach i wynosiła ona ponad 1100 mg·100g<sup>-1</sup>, jednak była ona mniejsza o około 280-400 mg od stężenia wapnia w roślinach uprawianych w Chile oraz Indiach (Lemus-Mondaca i in., 2016, Tadhani i Subhash, 2006), co przypuszczalnie wynika z innej zawartości tego składnika w glebie. Kompleksowy przegląd literatury przeprowadzony przez Lemus-

Mondaca i in. (2016) wykazał, że stężenie wapnia w liściach stewii waha się przeciętnie od 500 do 1500 mg·100g<sup>-1</sup> s.m. liści, co wskazuje, że stężenie wapnia w liściach stewii uprawianej w Polsce zawiera średnie stężenie wapnia we wrześniu i dość małe stężenie tego pierwiastka w lipcu (Lemus-Mondaca i in., 2012). Zawartość magnezu w próbkach pobranych w lipcu była w przedziale od 152,78 mg·100g<sup>-1</sup> (mocznik 150 kg N·ha<sup>-1</sup>) do 183,33 mg·100g<sup>-1</sup> (mocznik 50 kg N·ha<sup>-1</sup>), natomiast we wrześniu od 214,44 mg·100g<sup>-1</sup> (mocznik 50 kg N·ha<sup>-1</sup>) do 259,44 mg·100g<sup>-1</sup> (siarczan amonu 50 kg N·ha<sup>-1</sup>), wartości te były mniejsze od uzyskanych przez Tadhani i Subhash (ok. 500 mg) oraz Lemus-Mondaca i in. (867,79–1013,30 mg·100g<sup>-1</sup> s.m.) (Lemus-Mondaca i in., 2016, Tadhani i Subhash, 2006). Mała zawartość magnezu w liściach stewii uprawianej w Polsce może ją dyskwalifikować jako produkt do przetwórstwa, gdyż wykazano, że zawartość i biodostępność magnezu może mieć związek z produkcją glikozydów stewiolowych (wysokie stężenie magnezu koreluje dodatnio ze stężeniem stewiozydów) (Ahmad i in., 2022, Desai Heta i in., 2017, Lemus-Mondaca, 2012). Może to wskazywać na konieczność śledzenia zawartości magnezu w glebie i intensywniejszego nawożenia tym składnikiem. Największą koncentrację fosforu odnotowano podczas analiz wrześniowych w próbkach stewii z poletek nawożonych mocznikiem w dawce 50 kg N·ha<sup>-1</sup> (218,77 mg·100g<sup>-1</sup>). Wartość ta była mniejsza od uzyskanej przez Tadhani i Subhash (2006) (ok. 350 mg·100g<sup>-1</sup>). Jednakże inni autorzy (Ucar i in. 2018) ustalili, że stężenie fosforu w liściach stewii uprawianej z dodatkiem 80 kg N·ha<sup>-1</sup> w Antalyi w Turcji wynosiło 120 mg·100 g<sup>-1</sup> s.m. w lipcu i 190 mg·100 g<sup>-1</sup> s.m. we wrześniu (Ucar i in., 2018). Stężenie potasu w stewii było największe na polatkach nawożonych siarczanem amonu w dawce 50 kg N·ha<sup>-1</sup> (3216,78 mg·100g<sup>-1</sup>) oraz mocznikiem w dawce 100 kg N·ha<sup>-1</sup> (3183,33 mg·100g<sup>-1</sup>). Wyniki te są ponad dwukrotnie większe od uzyskanych przez Ucar i in. (2018) oraz od wartości uzyskanych przez Tadhani i Subhash (2006) (2510 mg·100g<sup>-1</sup>) przy czym te ostatnie były zbliżone do średniej uzyskanej z uprawy w Polsce. Potas, podobnie jak magnez, jest jednym z pierwiastków niezbędnych do syntezy glikozydów, a niskie stężenie potasu może zmniejszyć liczbę glikozydów stewiolowych o 15–25%. Zawartość potasu w liściach stewii na poziomie 1500 mg·100g<sup>-1</sup> określa się jako niedobór tego makroelementu, natomiast stewia bez niedoborów powinna zawierać ponad 2000 mg K·100g<sup>-1</sup> (Sun i in., 2021).

Tabela 3. Wpływ sposobu nawożenia przedwegetacyjnego azotem na zawartość wybranych makroelementów w stewii (*Stevia rebaudiana* Bert.)

Próba*	Wapń		Magnez		Fosfor		Potas	
	[mg·100 g <sup>-1</sup> s.m.]							
	Lipiec	Wrzesień	Lipiec	Wrzesień	Lipiec	Wrzesień	Lipiec	Wrzesień
<b>C</b>	770.89 ± 49.90d**	993.67 ± 96.77c	168.89 ± 13.42ab	229.44 ± 14.26b	119.60 ± 14.30b	177.10 ± 18.18bc	2490.33 ± 205.89b	2938.89 ± 248.01
<b>N50</b>	794.44 ± 96.65d	969.44 ± 89.39bc	159.44 ± 17.66b	218.89 ± 26.49b	143.50 ± 11.54a	173.49 ± 21.45c	2802.78 ± 112.11a	3018.11 ± 258.45ab
<b>N100</b>	816.67 ± 108.97d	1069.44 ± 108.89ab	153.33 ± 10.52b	248.33 ± 26.93a	146.28 ± 11.25a	153.08 ± 17.45d	2468.11 ± 224.53b	3034.78 ± 257.80ab
<b>N150</b>	890.33 ± 43.12bcd	1188.44 ± 125.18a	156.11 ± 15.60b	218.89 ± 27.81b	108.21 ± 6.45bc	140.58 ± 14.25de	2616.67 ± 307.97ab	2797.22 ± 138.66ab
<b>S50</b>	836.11 ± 45.26d	994.44 ± 116.91b	173.33 ± 20.87a	259.44 ± 27.91a	140.44 ± 13.60a	180.86 ± 10.56b	2521.00 ± 225.03b	3216.78 ± 173.46a
<b>S100</b>	861.11 ± 33.33cd	1098.11 ± 141.23ab	168.89 ± 27.36ab	246.67 ± 18.24ab	131.53 ± 11.92ab	201.01 ± 9.92b	2457.00 ± 270.82b	3050.00 ± 260.49ab
<b>S150</b>	991.67 ± 46.77b	1162.00 ± 149.53a	175.56 ± 14.46a	240.00 ± 16.34ab	100.72 ± 9.49c	148.79 ± 12.05d	2275.00 ± 222.42c	2841.78 ± 100.66ab
<b>U50</b>	887.56 ± 79.45bcd	863.89 ± 58.03c	183.33 ± 27.36a	214.44 ± 25.65a	128.09 ± 9.05ab	218.77 ± 8.28a	2497.33 ± 262.11b	3048.67 ± 182.52ab
<b>U100</b>	976.44 ± 111.97bc	1076.44 ± 132.36ab	160.56 ± 18.45ab	222.22 ± 18.15b	116.69 ± 7.05b	158.63 ± 9.66d	2534.78 ± 288.41ab	3183.33 ± 178.66a
<b>U150</b>	1144.44 ± 298.64a	1119.44 ± 110.64a	152.78 ± 24.18b	227.22 ± 20.73b	104.62 ± 8.48bc	131.13 ± 9.42e	2298.67 ± 320.36bc	2534.78 ± 180.53b
<b>Średnia</b>	896.97 ± 105.14	1053.53 ± 146.57	165.22 ± 20.94	232.56 ± 28.10	123.97 ± 11.24	168.34 ± 14.04	2496.17 ± 273.53	2966.43 ± 206.73

\*Oznaczenia w tabeli: N50- saletra amonowa w dawce 50 kg N·ha<sup>-1</sup>, N100- saletra amonowa w dawce 100 kg N·ha<sup>-1</sup>, N150- saletra amonowa w dawce 150 kg N·ha<sup>-1</sup>, S50- siarczan amonu w dawce 50 kg N·ha<sup>-1</sup>, S100- siarczan amonu w dawce 100 kg N·ha<sup>-1</sup>, S150- siarczan amonu w dawce 150 kg N·ha<sup>-1</sup>, U50- mocznik w dawce 50 kg N·ha<sup>-1</sup>, U100- mocznik w dawce 100 kg N·ha<sup>-1</sup>, U150- mocznik w dawce 150 kg N·ha<sup>-1</sup>, C- brak nawożenia przedwegetacyjnego. \*\* Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie; test Duncana (p<0,05)

Stewia jest rośliną syntetyzującą duże ilości witaminy C w liściach. Zawartość witaminy C (Tabela 4) oraz cukrów redukujących w ziele stewii zwiększała się wraz ze wzrostem roślin. Największą zawartość witaminy C odnotowano w próbach nawożonych siarczanem amonu w dawce 150 kg N·ha<sup>-1</sup> (149,28 mg·100g<sup>-1</sup>), natomiast średnia zawartość tej witaminy była około 10-krotnie większa od uzyskanej w badaniach Kim i in. (2011), jednakże różnica ta mogła wynikać z innej metody ekstrakcji. Zawartość cukrów we wrześniu wahała się od 1,86 % ś.m. (mocznik 50 kg N·ha<sup>-1</sup>) do 2,41 % ś.m. (saletra amonowa 50 kg N·ha<sup>-1</sup>) i była większa niż w lipcu. Zależność wzrostu zawartości cukrów (Tabela 4) wraz z wiekiem rośliny obserwowano

także w badaniach prowadzonych na innych gatunkach (Emendack i in., 2018, Pereira i in., 2017). Zawartość związków fenolowych (Tabela 4) w liściach roślin zebranych w lipcu wynosiła od 203,07 mg·100g<sup>-1</sup> (siarczan amonu 50 kg N·ha<sup>-1</sup>) do 346,07 mg·100g<sup>-1</sup> (mocznik 100 kg N·ha<sup>-1</sup>) natomiast we wrześniu wahała się od 170,52 mg·100g<sup>-1</sup> (kontrola) do 348,58 mg·100g<sup>-1</sup> (saletra amonowa 150 kg N·ha<sup>-1</sup>). W badaniach Lemus-Mondaca i in. (2016) zawartość związków fenolowych była znacznie mniejsza (nawet trzykrotnie) niż w liściach stewii analizowanych w badaniach własnych, co sugeruje, że rośliny stewii uprawiane w Polsce mogą charakteryzować się znacznie większymi właściwościami przeciwutleniającymi i przeciwzapalnymi niż stewii uprawianej w cieplejszym klimacie (Lemus-Mondaca i in., 2016, Kim i in., 2011). Stężenie N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Tabela 4) malało wraz ze wzrostem roślin, a zastosowane czynniki agrotechniczne nie miały istotnego statystycznie wpływu na zawartość N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> w liściach stewii nawożonych różnymi dawkami i formami nawozów azotowych przedwegetacyjnie zebranych we wrześniu. Poziom tych związków wahał się od 881,44 mg·kg<sup>-1</sup> ś.m. w obiekcie kontrolnym do 952,44-1372,44 mg·kg<sup>-1</sup> ś.m. w pozostałych kombinacjach.

Tabela 4. Wpływ sposobu nawożenia przedwegetacyjnego azotem na zawartość wybranych związków w stewii (*Stevia rebaudiana* Bert.)

Próba*	Witamina C		Polifenole		Cukry redukujące		Azotany	
	[mg·100 g <sup>-1</sup> ś.m.]				% ś.m.		[mg·kg <sup>-1</sup> ś.m.]	
	Lipiec	Wrzesień	Lipiec	Wrzesień	Lipiec	Wrzesień	Lipiec	Wrzesień
<b>C</b>	110.12 ± 5.24c**	135.42 ± 16.22b	262.21 ± 23.35b	170.52 ± 18.04d	1.07 ± 0.14a	2.30 ± 0.29a	1501.1 ± 393.81b	890.33 ± 263.28a
<b>N50</b>	128.24 ± 26.77ab	148.13 ± 10.65ab	249.66 ± 28.44b	251.72 ± 25.54c	0.89 ± 0.11ab	2.41 ± 0.28a	1657.44 ± 331.26b	952.44 ± 381.94a
<b>N100</b>	114.14 ± 6.05bc	142.81 ± 11.30ab	286.57 ± 28.94ab	295.56 ± 26.15b	0.94 ± 0.25ab	2.31 ± 0.24a	2116.78 ± 431.57ab	1246.56 ± 374.77a
<b>N150</b>	109.27 ± 6.90c	135.89 ± 10.53b	326.30 ± 30.70a	348.58 ± 28.02a	0.91 ± 0.11ab	1.99 ± 0.27a	2004.67 ± 423.43ab	1225.67 ± 357.26a
<b>S50</b>	124.5 ± 8.50abc	137.94 ± 10.11ab	203.07 ± 37.02c	251.57 ± 22.63c	1.04 ± 0.15a	2.09 ± 0.21a	1552.11 ± 341.55b	962.11 ± 463.64a
<b>S100</b>	118.48 ± 13.28bc	142.67 ± 8.36ab	231.93 ± 31.97bc	272.43 ± 23.44bc	0.94 ± 0.09ab	2.08 ± 0.25a	1911.44 ± 207.36ab	1027.33 ± 389.75a
<b>S150</b>	111.12 ± 6.45c	149.28 ± 7.95a	309.37 ± 35.52a	293.96 ± 18.92b	0.84 ± 0.21b	2.03 ± 0.37a	1764.67 ± 511.72ab	1372.44 ± 406.16a

<b>U50</b>	135.54 ± 27.56a	138.57 ± 23.64ab	236.21 ± 43.63bc	304.51 ± 37.92ab	0.98 ± 0.24ab	1.86 ± 0.49a	1621.67 ± 449.14b	881.44 ± 348.14a
<b>U100</b>	120.50 ± 12.44bc	140.54 ± 6.45ab	346.07 ± 37.43a	328.77 ± 38.36a	0.92 ± 0.19ab	2.02 ± 0.37a	2329.44 ± 300.93a	1045.22 ± 436.89a
<b>U150</b>	112.94 ± 5.46bc	137.04 ± 6.82ab	302.31 ± 40.81a	172.43 ± 21.44d	0.99 ± 0.06ab	2.07 ± 0.39a	1765.67 ± 433.04ab	1295.78 ± 427.80a
<b>Średnia</b>	118.49 ± 16.20	140.83 ± 12.36	275.37 ± 38.16	269.00 ± 46.08	0.95 ± 0.17	2.12 ± 0.69	1822.50 ± 343.74	1089.93 ± 348.06

\*Oznaczenia w tabeli: N50- saletra amonowa w dawce 50 kg N·ha<sup>-1</sup>, N100- saletra amonowa w dawce 100 kg N·ha<sup>-1</sup>, N150- saletra amonowa w dawce 150 kg N·ha<sup>-1</sup>, S50- siarczan amonu w dawce 50 kg N·ha<sup>-1</sup>, S100- siarczan amonu w dawce 100 kg N·ha<sup>-1</sup>, S150- siarczan amonu w dawce 150 kg N·ha<sup>-1</sup>, U50- mocznik w dawce 50 kg N·ha<sup>-1</sup>, U100- mocznik w dawce 100 kg N·ha<sup>-1</sup>, U150- mocznik w dawce 150 kg N·ha<sup>-1</sup>, C- brak nawożenia przedwegetacyjnego. \*\* Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie; test Duncana (p<0,05)

W próbkach stewii zbieranych w lipcu nie wykazano znaczących różnic w zawartości barwników roślinnych karotenoidów i chlorofilu b, natomiast największą zawartość chlorofilu a i chlorofilu a+b odnotowano w roślinach z poletek nawożonych mocznikiem w dawce 50 kg N·ha<sup>-1</sup>. We wrześniu także nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości karotenoidów między poszczególnymi obiektami, jednakże zawartość chlorofilu b oraz chlorofilu a+b była największa w roślinach nawożonych saletrą amonową w dawce 100 kg N·ha<sup>-1</sup>. Największe stężenie chlorofilu a w przedziale 0,78-0,86 mg·kg<sup>-1</sup> zostało oznaczone w próbach z poletek nawożonych saletrą amonową w dawce 100 i 150 kg N·ha<sup>-1</sup>, siarczanem amonu w dawce 50 kg N·ha<sup>-1</sup> oraz mocznikiem w dawce 100 i 150 kg N·ha<sup>-1</sup>. Warto zaznaczyć, że analizowane w tym badaniu rośliny stewii charakteryzowały się raczej małym (3–4 razy mniejszym) stężeniem chlorofilu w porównaniu z roślinami uprawianymi w Iranie (Shahverdiego i in., 2019) oraz około 6-krotnie mniejszym od uzyskanego w Turcji (Ucar i in., 2018). Stężenie karotenoidów w liściach roślin związane jest z natężeniem światła w okresie wzrostu rośliny, co wykazali w badaniach nad stewią Simlat i in. (2016). Fakt ten może wyjaśniać mniejszą zawartość karotenoidów w roślinach stewii uprawianych w Polsce w porównaniu do roślin stewii rosnących w Iranie, które charakteryzowały się 3–4-krotnie większą koncentracją karotenoidów w liściach (Gerami i in., 2020, Simlat i in., 2016).

W doświadczeniu pierwszym wykonano pomiar zawartości dwóch najważniejszych glikozydów stewiolowych: stewiozydu i rebaudiozydu A. Zawartość stewiozydu wahała się od 108,91 mg·100g<sup>-1</sup> do 262,36 mg·100g<sup>-1</sup>, natomiast rebaudiozydu A od 352,85 mg·100g<sup>-1</sup> do 2186,62 mg·100g<sup>-1</sup> (Tabela 5). Największe zawartości obu glikozydów stewiolowych odnotowano w próbkach stewii uprawianej na poletkach nawożonych przedwegetacyjnie siarczanem amonu w dawce 150 kg N·ha<sup>-1</sup>. Było to 2 razy więcej stewiozydu i 7 razy więcej rebaudiozydu A niż w próbie kontrolnej

(bez nawożenia przedwegetacyjnego). Mniejsze zawartości stewiozydu niż w próbie z obiektu kontrolnego uzyskano z obiektów nawożonych przedwegetacyjnie siarczanem amonu i mocznikiem w dawce 50 kg N·ha<sup>-1</sup>. W przypadku rebaudiozydu A, każda dawka i forma nawozu wpływała korzystnie na zwiększenie jego zawartości. Jednakże zawartość stewiozydów w stewii uzyskanej w tym doświadczeniu była mniejsza w porównaniu do zawartość tych związków w stewii uprawianej w cieplejszych krajach, gdzie ich stężenie wahało się od 4% do 20% s.m (Yadav i in., 2011). W Polsce panują znacznie niższe temperatury niż w regionach typowych dla uprawy stewii. Ostatnie badania Miladinova-Georgieva i in. (2023) oraz Yang i in. (2015) wykazały, że wyższe temperatury uprawy stewii, z optymalną wartością bliską 25°C, skutkują większym tempem transkrypcji piętnastu genów szlaków biosyntezy glikozydów stewiolowych, natomiast temperatury bliskie 15°C (podobnie jak średnia temperatura maja, czerwca i września w Polsce w latach badań) znacząco hamują transkrypcję tych genów.

Tabela 5. Wpływ sposobu nawożenia przedwegetacyjnego azotem na zawartość glikozydów stewiolowych w stewii (*Stevia rebaudiana* Bert.)

Próba*	Stewiozyd	Rebaudiozyd A
	[mg·100g <sup>-1</sup> s.m.]	
<b>C</b>	135,14±6,33fg	352,85±6,33g
<b>N50</b>	140,50±5,32e	785,20±8,96ef
<b>N100</b>	156,6±1,12d	1093,08±106,85cd
<b>N150</b>	134,11±1,65fg	1229,89±18,42c
<b>S50</b>	111,69±1,53h	602,18±82,60fg
<b>S100</b>	214,26±11,45b	1493,53±133,78b
<b>S150</b>	262,36±17,13a	2186,62±390,54a
<b>U50</b>	108,91±0,70h	817,05±54,46ef
<b>U100</b>	122,53±6,54gh	935,04±79,86de
<b>U150</b>	182,46±8,59c	490,24±27,96g
<b>Średnia</b>	156,86±17,99	998,57±234,99

\*Oznaczenia w tabeli: N50- saletra amonowa w dawce 50 kg N·ha<sup>-1</sup>, N100- saletra amonowa w dawce 100 kg N·ha<sup>-1</sup>, N150- saletra amonowa w dawce 150 kg N·ha<sup>-1</sup>, S50- siarczan amonu w dawce 50 kg N·ha<sup>-1</sup>, S100- siarczan amonu w dawce 100 kg N·ha<sup>-1</sup>, S150- siarczan amonu w dawce 150 kg N·ha<sup>-1</sup>, U50- mocznik w dawce 50 kg N·ha<sup>-1</sup>, U100- mocznik w dawce 100 kg N·ha<sup>-1</sup>, U150- mocznik

w dawce  $150 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$ , C- brak nawożenia przedwegetacyjnego. \*\* Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie; test Duncana ( $p < 0,05$ )

Wyniki uzyskane w doświadczeniu pierwszym wykazały istotne znaczenie właściwego nawożenia azotem w uprawie stewii. Dostosowanie odpowiedniej dawki i formy N może mieć wpływ na wzrost, plonowanie i jakość uzyskanego surowca stewii.



**Doświadczenie nr 2, opisane w manuskrypcie pt. „Effect of spacing on growth, yield and chemical composition of stevia plants (*Stevia rebaudiana* Bert.)”**

W doświadczenie drugim zbadano wpływ różnej rozstawy w uprawie stewii na jej wzrost, plonowanie i skład chemiczny. W eksperymencie polowym przeanalizowano trzy rozstawy: 50 cm x 30 cm, 45 cm x 25 cm i 30 cm x 30 cm. Pole pod doświadczenie charakteryzowało się glebą o zawartości próchnicy 1,8%, odczynie lekko alkalicznym i zasoleniu  $55 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-3}$ , o średniej zawartości fosforu-  $65 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ , potasu-  $310 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ , wapnia-  $2800 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  i magnezu-  $84 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Rośliny posadzono na wyznaczonych poletkach o powierzchni  $1,5 \text{ m}^2$ , nawożonych saletrą amonową przedwegetacyjnie w dawce  $100 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ , okrytych czarną agrowłókniną w II dekadzie czerwca. W nawożeniu pogłównym zastosowano saletrę amonową w dawce  $50 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ . W lipcu i we wrześniu przeprowadzono pomiary biometryczne oraz pobrano próbki materiału roślinnego do analiz chemicznych. Zbiór ziela wykonano w II dekadzie września. Największą masą jednostkową rośliny, liści oraz pędów charakteryzowały się rośliny posadzone w rozstawie 50 cm x 30 cm, natomiast masa roślin pozyskiwanych z rozstawy 45 cm x 25 cm i 30 cm x 30 cm była mniejsza i nie różniła się znacząco od siebie. Plon ziela stewii uzyskany w drugim doświadczeniu wahał się od 1,62 do  $2,04 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$  (Tabela 6), jednak znacząco większy plon uzyskano wraz ze wzrostem zagęszczenia roślin na jednostce powierzchni rosnących w rozstawie 45 cm x 25 cm i 30 cm x 30 cm. Tę samą zależność zaobserwowano w plonie liści.

Tabela 6. Wpływ rozstawy na plonowanie stewii (*Stevia rebaudiana* Bert.)

Rozstawa	Cale rośliny	Liście	Pędy
	[kg·m <sup>2</sup> ]		
50 cm x 30 cm	$1,62 \pm 0,10$ b*	$0,87 \pm 0,11$ b	$0,75 \pm 0,09$ a
45 cm x 25 cm	$2,04 \pm 0,15$ a	$1,26 \pm 0,22$ a	$0,77 \pm 0,07$ a
30 cm x 30 cm	$1,89 \pm 0,12$ a	$1,08 \pm 0,10$ a	$0,81 \pm 0,11$ a

\* Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie; test Tukeya ( $p < 0,05$ )

Rozstawa nie wpłynęła istotnie na masę pędów stewii. Najkorzystniejszy udział liści w plonie ziela, sięgający 62,0%, odnotowano u roślin uprawianych w rozstawie 45 cm x 25 cm. Rozstawa nie wpłynęła znacząco na wysokość roślin mierzonych zarówno

w lipcu, jak i we wrześniu; rośliny bezpośrednio przed zbiorem dorastały do 57,6-59,2 cm. Brak wpływu rozstawy na wysokość roślin wykazali również w swoich badaniach Kumar i in. (2014), jednakże rośliny te były znacznie wyższe (90-120cm) od uprawianych w Polsce. Rozstawa nie miała wpływu na zasięg boczny oraz liczbę pędów I rzędu mierzonych w lipcu. We wrześniu największy zasięg boczny oraz liczbę pędów I rzędu odnotowano przy rozstawie roślin 50 cm x 30 cm. Zmianę w liczbie pędów wynikającą ze zmiany rozstawy wykazał także Kumar i in. (2014), jednakże zależność była odwrotna od uzyskanej w Polsce, gdyż ich liczba była większa przy zmniejszonej rozstawie. Badania przeprowadzone przez Ramesha i in. (2006) wykazały, że w przypadku wieloletniej uprawy stewii, jej korzenie mają zasięg ponad 30 cm z każdej strony rośliny, co sugeruje, że rozstawa powinna być większa niż 30 cm x 30 cm. Jednak w Polsce stewia nie jest w stanie przetrwać w gruncie, tym samym wykluczając uprawę wieloletnią, a liczne badania, w których odstęp między roślinami wynosił 20 cm nie wykazały niekorzystnego wpływu zmniejszenia odległości w rzędzie na rośliny (Kumari i in., 2021, Liu i in., 2011, Tan i in., 2008). Dodatkowo, zmniejszenie rozstawy między roślinami, a tym samym zwiększenie liczby roślin na jednostce powierzchni, może pozytywnie wpływać na ilość uzyskanego plonu, co potwierdziły badania Tadesse i in. (2016). Rozstawa nie wpływała na liczbę wykształconych liści na pojedynczym pędzie (Tabela 7).

Tabela 7. Wpływ rozstawy na wzrost i rozwój roślin stewii (*Stevia rebaudiana* Bert.)

Rozstawa	Lipiec				Wrzesień			
	Wysokość rośliny	Zasięg boczny	Liczba pędów I rzędu na pojedynczej roślinie	Liczba liści na pojedynczym pędzie	Wysokość rośliny	Zasięg boczny	Liczba pędów I rzędu na pojedynczej roślinie	Liczba liści na pojedynczym pędzie
	[cm]				[cm]			
<b>50 cm x 30 cm</b>	28,65 ± 2,94 a*	20,50 ± 2,18 a	7,89 ± 1,52 a	12,33 ± 2,94 a	57,61 ± 4,52 a	29,05 ± 1,04 a	16,8 ± 1,96 a	26,44 ± 3,66 a
<b>45 cm x 25 cm</b>	28,69 ± 3,15 a	21,00 ± 3,27 a	7,56 ± 2,16 a	12,74 ± 3,08 a	59,35 ± 4,88 a	27,00 ± 0,95 b	12,23 ± 1,52 b	28,56 ± 3,42 a
<b>30 cm x 30 cm</b>	27,65 ± 2,56 a	20,00 ± 2,41 a	6,74 ± 1,58 a	11,30 ± 1,98 a	59,15 ± 5,12 a	26,05 ± 1,64 b	10,23 ± 1,07 b	25,41 ± 2,98 a

\* Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie; test Tukeya ( $p < 0,05$ )

Zawartość azotanów i makroelementów (Tabela 8) zwiększała się wraz z rozwojem roślin. Największą akumulację azotanów, fosforu, potasu i magnezu w stewii wykazano w próbkach roślin rosnących w rozstawie 50 cm x 30 cm, zebranych we wrześniu. Dotychczas nie prowadzono badań nad wpływem rozstawy na stan odżywienia roślin stewii, jednakże doniesienia na temat wpływu zwiększonej rozstawy na rozwój systemu korzeniowego innych roślin mogą posłużyć do wyjaśnienia tego zjawiska u stewii. Za przyczynę zwiększonej zawartości azotanów uznano zwiększoną masę korzeniową, ich większy zasięg oraz mniejszą konkurencyjność roślin (Dunbabin i in., 2003). Rozstawa w początkowej fazie uprawy stewii wpływała na zawartość wapnia, która była mniejsza przy rozstawie 30 cm x 30 cm, jednak wraz ze wzrostem roślin zawartość wapnia wyrównała się w roślinach uprawianych we wszystkich rozstawach.

Tabela 8. Wpływ rozstawy na zawartość azotanów i makroskładników w liściach stewii (*Stevia rebaudiana* Bert.)

Termin pobierania prób	Rozstawa	N-NO <sub>3</sub>	P	K	Ca	Mg
		[mg·kg <sup>-1</sup> ś.m.]	[mg·100 g <sup>-1</sup> s.m.]			
Lipiec	50 cm x 30 cm	1360,99 ± 143,11 a*	134,58 ± 14,48 a	2648,61 ± 84,12 a	836,11 ± 21,49 a	166,11 ± 5,92 a
	45 cm x 25 cm	1343,82 ± 125,52 a	126,39 ± 17,45 a	2554,17 ± 59,04 a	841,67 ± 19,83 a	168,89 ± 10,14 a
	30 cm x 30 cm	1003,1 ± 97,43 b	117,5 ± 19,83 a	2465,28 ± 49,51 b	791,67 ± 12,90 b	143,89 ± 6,43 b
Wrzesień	50 cm x 30 cm	1856,18 ± 194,44 a	234,17 ± 11,80 a	2828,93 ± 68,39 a	861,94 ± 95,23 a	176,39 ± 2,19 a
	45 cm x 25 cm	1219,28 ± 283,67 b	185,14 ± 9,15 b	2748,43 ± 52,85 b	888,18 ± 61,09 a	172,22 ± 1,46 b
	30 cm x 30 cm	1073,57 ± 150,81 b	155,69 ± 6,41 c	2701,39 ± 47,92 b	835,31 ± 54,97 a	156,94 ± 1,01 c

\* Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie; test Tukeya ( $p < 0,05$ )

Początkowo zawartość suchej masy stewii (materiał pobierany w lipcu) nie różniła się znacząco pomiędzy obiektami (24,48-25,16%), jednakże wraz ze wzrostem zaobserwowano zwiększenie zawartości suchej masy w liściach stewii, w roślinach posadzonych w najmniejszej rozstawie (30 cm x 30 cm). Zmiany zawartości suchej masy wynikające ze wzrostu roślin są typowe w uprawie i zostały opisane na przykładzie wielu gatunków przez Postma i in. (2017). Największą zawartość suchej masy odnotowano w stewii uprawianej w rozstawie 30 cm x 30 cm i wynosiła ona 28,67%.

Zawartość cukrów redukujących, związków fenolowych ogółem, chlorofilu a+b i karotenoidów zwiększała się wraz ze wzrostem roślin, jednak wpływ rozstawy na zawartość tych składników w stewii nie został dotychczas zbadany przez innych autorów. Największą zawartość cukrów redukujących (Tabela 9) wykazano w stewii uprawianej w rozstawie 50 cm x 30 cm (2,48 % ś.m.), a polifenoli w stewii uprawianej w rozstawie 30 cm x 30 cm (314,66 mg·100 g<sup>-1</sup> ś.m.). Zawartość witaminy C w liściach stewii była największa w próbkach liści pobranych z roślin rosnących w rozstawie 45 cm x 25 cm w lipcu (144,39 mg·100 g<sup>-1</sup> ś.m), natomiast we wrześniu w liściach roślin uprawianych w rozstawie 50 cm x 30 cm (134,19 mg·100 g<sup>-1</sup> ś.m.). W ogólnym przeglądzie literatury światowej na temat składu chemicznego stewii, ze względu na analizę zawartości w suchym materiale roślinnym, wykazano nieznacznie mniejszą zawartość tej witaminy (Lemus-Mondaca, 2012).

Tabela 9. Wpływ rozstawy na zawartość suchej masy i wybranych związków organicznych w stewii (*Stevia rebaudiana* Bert.)

Termin pobierania prób	Rozstawa	Sucha masa	Cukry redukujące	Witamina C	Związki fenolowe
		[% ś.m.]		[mg·100g <sup>-1</sup> ś.m.]	
Lipiec	50 x 30	24,48 ± 3,15 a*	1,42 ± 0,13 a	124,17 ± 2,84 c	187,61 ± 10,52 b
	45 x 25	24,70 ± 2,95 a	1,08 ± 0,09 b	144,39 ± 2,12 a	176,86 ± 11,61 b
	30 x 30	25,16 ± 2,18 a	0,72 ± 0,10 c	133,30 ± 1,98 b	202,11 ± 9,81 a
Wrzesień	50 x 30	26,55 ± 1,44 b	2,48 ± 0,36 a	134,19 ± 2,81 a	255,33 ± 18,94 b
	45 x 25	26,66 ± 0,99 b	1,88 ± 0,15 b	125,92 ± 1,28 b	249,53 ± 26,51 b
	30 x 30	28,67 ± 0,45 a	1,64 ± 0,29 b	126,90 ± 1,04 b	314,66 ± 29,49 a

\* Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie; test Tukeya (p<0,05)

Rozstawa nie miała wpływu na zawartość barwników roślinnych w liściach stewii zarówno w lipcu oraz we wrześniu. Brak wpływu rozstawy na zawartość chlorofilu a+b oraz karotenoidów opisano także w przypadku uprawy innych roślin, np. czosnku (Ren i in., 2017).

Doświadczenie drugie badające wpływ rozstawy na wzrost, plonowanie i jakość plonu wykazało możliwość optymalizacji plonu i jego jakości poprzez odpowiednio dobraną rozstawę.

### **Doświadczenie nr 3, opisane w manuskrypcie pt. „Irrigation practice in the cultivation of *Stevia rebaudiana* in cooler climates - case study in Poland.”**

W trzecim doświadczeniu analizowano wpływ różnej częstotliwości nawadniania upraw stewii na jej wzrost, plonowanie i jakość pozyskanego surowca. Doświadczenie założono w I dekadzie czerwca, na czarnej ziemi zdegradowanej o zawartości próchnicy 1,8%, lekko alkalicznej i zasoleniu  $57 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-3}$ , o średniej zawartości fosforu-  $45 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ , potasu-  $310 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ , wapnia-  $2800 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  i magnezu-  $34 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Rośliny posadzono na polu nawożonych saletrę amonową przedwegetacyjnie w dawce  $100 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ , okrytym czarną włókniną na poletkach o powierzchni  $1 \text{ m}^2$  w rozstawie  $45 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$ . W nawożeniu pogłównym zastosowano saletrę amonową w dawce  $50 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ . Jednorazowa dawka nawodnieniowa wynosiła  $20 \text{ mm}$  wody na roślinę. Rośliny nawadniano dwa razy w tygodniu (2W), raz w tygodniu (1W), w okresach krytycznego niedoboru wody opadowej (NR) oraz wcale: obiekt kontrolny (0W). W analizie plonu wzięto pod uwagę dane pogodowe z lat, w których prowadzone były doświadczenia; najmniejszy plon uzyskano w roku 2014 niezależnie od częstotliwości nawadniania upraw (Tabela 10). Największy średni plon uzyskano w kombinacji podlewanej tylko w okresach krytycznego niedoboru wody opadowej (NR) ( $2,58 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$ ) i w podlewanej raz w tygodniu (1W) ( $2,42 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$ ). Najmniejszy plon odnotowano z obiektu kontrolnego bez podlewania ( $2,08 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$ ), przy czym rośliny niepodlewane charakteryzowały się największym udziałem procentowym liści w plonie, wynoszącym aż 64,47%. Częste podlewanie zwiększało ilość odpadu, z 4,67% w 0W do 9,70% w 2W. Badania Lavini i in. (2008) na temat uprawy stewii we Włoszech skupiające się na dostępności wody dla roślin z gleby wykazały, że deficyt nawadnianie (33% i 66% zużycia wody w glebie) może zmniejszyć masę roślin nawet o 20-25%. Badania przeprowadzone przez Lavini i in. (2008) wykazały również, że podobnie jak w badaniu przeprowadzonym w Polsce największy wskaźnik zbiorów (tj. stosunek masy liści do masy całej rośliny) miały rośliny uprawiane przy najmniejszym zużyciu wody. Badania na temat stewii uprawianej w Maroko, prowadzone przez Benhmimou i in. (2017) wykazały, że rośliny stewii poddane największemu poziomowi badanego czynnika (100% ewapotranspiracja) uzyskiwały znacznie większą ilość biomasy niż rośliny stewii uprawiane przy 80% lub 50% ewapotranspiracji. Analiza Parris i in. (2017) na temat nawadniania stewii, przeprowadzona w Ontario, w przeciwieństwie do wyników uzyskanych w Polsce,

wykazała, że mniejsza częstotliwość nawadniania w okresie wzrostu stewii może zmniejszyć plon liści stewii nawet o ok. 25%.

Tabela 10. Wpływ częstotliwości nawadniania upraw na plon stewii (*Stevia rebaudiana* Bert.)

Częstotliwość nawadniania*	Rok	Cale rośliny	Liście	Pędy	Odpad
		[kg·m <sup>-2</sup> ]			
0W	2014	1,21±0,15 e**	0,83±0,06 e	0,33±0,04 f	0,06±0,01 e
	2015	2,56±0,22 ab	1,64±0,09 ab	0,78±0,07 d	0,15±0,04 c
	2016	2,46±0,23 ab	1,50±0,08 ab	0,87±0,06 cd	0,09±0,03 cde
Średnia		2,08	1,32	0,66	0,10
NR	2014	2,08±0,18 c	1,14±0,03 d	0,79±0,06 d	0,12±0,03 cde
	2015	2,82±0,27 a	1,57±0,10 ab	1,02±0,05 bc	0,23±0,06 b
	2016	2,83±0,28 a	1,63±0,18 ab	1,10±0,05 ab	0,10±0,02 cde
Średnia		2,58	1,45	0,97	0,15
1W	2014	1,89±0,18 d	1,04±0,05 d	0,75±0,05 d	0,10±0,02 cde
	2015	2,33±0,21 bc	1,15±0,04 d	0,76±0,04 d	0,42±0,07 a
	2016	3,05±0,19 a	1,75±0,15 a	1,21±0,09 a	0,09±0,02 cde
Średnia		2,42	1,31	0,91	0,20
2W	2014	1,70±0,16 d	1,07±0,05 d	0,55±0,06 e	0,08±0,01 de
	2015	2,24±0,20 bc	1,12±0,13 d	0,70±0,03 de	0,42±0,06 a
	2016	2,67±0,22ab	1,42±0,12 bc	1,12±0,08ab	0,14±0,02 cd
Średnia		2,20	1,30	0,79	0,21

\*Oznaczenia w tabeli: 2W - nawadnianie dwa razy w tygodniu, 1W - nawadnianie raz w tygodniu, NR - nawadnianie w okresach krytycznego niedoboru wody opadowej, 0W - obiekt kontrolny. \*\*Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie; test Duncana ( $p < 0,05$ )

Wysokość roślin stewii wahała się od 47,61 cm do 62,31 cm i była najmniejsza dla próby 0W. Rośliny podlewane dwa razy w tygodniu, raz w tygodniu i w okresie niedoboru wody opadowej charakteryzowały się większą wysokością (Tabela 11) w porównaniu do próby kontrolnej, nawet o 12-15 cm. Wpływ niedoboru wody na wysokość roślin w swoich badaniach opisali także Levini i in. (2008) w uprawie stewii we Włoszech, gdzie rośliny niepodlewane były o 5-10 cm niższe od podlewanych; Bunhmimou i in. (2017), którzy wykazali różnice wynoszące 10-15 cm oraz Grad i in. (2021) którzy udowodnili, że rośliny przy niewystarczającym poziomie nawadniania mogą być niższe o nawet 16-20 cm. Podlewanie w okresach krytycznego niedoboru wody i podlewanie raz w tygodniu wpływało na zwiększenie zasięgu bocznych roślin (29,04

cm-33,92 cm), podczas gdy najmniejszy był on u roślin podlewanych 2 razy w tygodniu (26,68 cm) i niepodlewanych wcale (25,35 cm). Częstotliwość nawadniania w uprawie stewii w Polsce nie wpływała na liczbę liści na pojedynczym pędzie, która oscylowała w zakresie 38,61-43,44 oraz pędów I rzędu, która wahała się od 7,72 do 8,52, podczas gdy doświadczenia wazonowe przeprowadzone w szklarni w Egipcie wykazały zmniejszoną liczbę rozgałęzień przy niedoborach wody (Grad i in., 2021).

Tabela 11. Wpływ częstotliwości nawadniania upraw na parametry biometryczne stewii (*Stevia rebaudiana* Bert.)

Częstotliwość nawadniania*	Wysokość roślin	Zasięg boczny	Liczba pędów I rzędu na pojedynczej roślinie	Liczba liści na pojedynczym pędzie
	[cm]			
<b>0W</b>	47,61±8,11b**	25,35±1,57b	7,75±5,04a	38,61±12,24a
<b>NR</b>	59,46±11,20a	33,92±1,38a	7,72±4,88a	42,64±14,85a
<b>1W</b>	61,32±11,15a	29,04±2,59a	8,53±5,78a	43,25±12,68a
<b>2W</b>	62,31±8,15a	26,68±1,90b	8,39±4,37a	43,44±13,21a

\*Oznaczenia w tabeli: 2W - nawadnianie dwa razy w tygodniu, 1W - nawadnianie raz w tygodniu, NR - nawadnianie w okresach krytycznego niedoboru wody opadowej, 0W - obiekt kontrolny. \*\*Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie; test Duncana ( $p < 0,05$ )

Częstotliwość nawadniania nie wpłynęła istotnie na zawartość suchej masy (Tabela 12) w próbkach stewii zebranych w lipcu. Brak nawodnienia roślin wpłynął na zmniejszenie ilości wody w tkankach roślin starszych, co bezpośrednio wpłynęło na większą zawartość suchej masy. Największą zawartością suchej masy we wrześniu charakteryzowały się rośliny niepodlewane (30,47%). Badanie Badran i in. (2015) na temat wpływu suszy na właściwości stewii *Stevia rebaudiana* wykazały odmienne wyniki: rośliny utrzymywane w warunkach niedoboru wody charakteryzowały się mniejszą zawartością suchej masy. Badania te były jednak prowadzone w kontrolowanych warunkach *in vitro*, gdzie rośliny nie miały dostępu do wody opadowej. W badaniach polowych rośliny stewii, które były nawadniane częściej lub dostawały większe ilości wody charakteryzowały się mniejszą zawartością suchej masy (Benhmimou i in., 2017, Aladakatti i in., 2012).

Częstotliwość nawadniania nie wpłynęła na zawartość cukrów redukujących, która w próbkach liści pobranych w lipcu wynosiła 0,76-0,93 % ś.m., a we wrześniu 1,74-

2,27 % ś.m. W badaniach Karimi i in. (2015), rośliny stewii uprawiane w szklarni przy niedoborze wody charakteryzowały się większą zawartością glukozy i sacharozy w liściach. Natomiast doświadczenia przeprowadzone w Iranie wykazały, że nawadnianie stewii uprawianej zarówno na polu, jak i w szklarni może powodować prawie 20% wzrost stężenia cukrów w roślinach (Ghamarnia i in., 2022). Wyniki te sugerują, że nawadnianie może mieć bardziej znaczącą rolę w tworzeniu cukrów w stewii w cieplejszym klimacie. Stres wywołany brakiem wody (0W) wpłynął na zwiększoną akumulację witaminy C oraz związków fenolowych w roślinach (Tabela 12). Stężenie związków fenolowych było różnicowane w próbkach pobranych w lipcu oraz we wrześniu i zwiększało się wraz z rozwojem roślin. W lipcu najmniejsze stężenie związków fenolowych wykazano w próbkach roślin podlewanych raz w tygodniu ( $185,62 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) i największe w próbkach niepodlewanych ( $270 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ). We wrześniu próbki stewii niepodlewanej charakteryzowały się największym stężeniem związków fenolowych ( $337,88 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ), natomiast próbki stewii podlewanej tylko w okresach krytycznego niedoboru wody opadowej, dwa razy w tygodniu i raz w tygodniu charakteryzowały się mniejszą, zbliżoną do siebie zawartością związków fenolowych wahającą się w zakresie od  $241,03 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$  (dla NR) do  $260,57 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$  (dla 1W). Podobne obserwacje na temat stresu wodnego wywołanego niedoborami wody w swoich badaniach nad uprawą stewii uzyskali Mahajan i in. (2021). Wytwarzanie związków fenolowych jest typową reakcją wielu gatunków roślin, zwłaszcza z rodziny *Asteraceae*, na stres związany z suszą, dlatego taka tendencja stewii uprawianej w przeprowadzonym doświadczeniu nie jest zaskakująca (Bellache i in., 2022, Albergaria i in., 2020; Cicevan i in., 2016). Zawartość witaminy C w liściach stewii nie zmieniła się od lipca do września w tak dużym stopniu jak zawartość związków fenolowych, ale odnotowano niewielkie zmiany w zakresie do 5-6%. Jedynie w próbach stewii podlewanej tylko w okresach krytycznego niedoboru wody zawartość witaminy C zmniejszała się od lipca do września. W lipcu największą zawartość witaminy C oznaczono w próbce 0W ( $139,99 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) natomiast najmniejszą w próbce 1W ( $121,02 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ). We wrześniu próbka 0W nadal charakteryzowała się największym stężeniem witaminy C ( $143,30 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ) natomiast próbka NR miała najmniejszą zawartość kwasu askorbinowego ( $124,66 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ).

Tabela 12. Wpływ częstotliwości nawadniania upraw na zawartość suchej masy i wybranych związków w stewii (*Stevia rebaudiana* Bert.)



Częstotliwość nawadniania*	Sucha masa		Cukry redukujące		Polifenole		Witamina C	
	[% ś.m.]				[mg·100g <sup>-1</sup> ś.m.]			
	Lipiec	Wrzesień	Lipiec	Wrzesień	Lipiec	Wrzesień	Lipiec	Wrzesień
0W	23,14 ± 2,59a**	30,47 ± 2,99a	0,76 ± 0,62a	1,74 ± 0,60a	270,26 ± 15,83a	337,88 ± 31,88a	139,99 ± 7,79a	143,30 ± 7,21a
NR	24,75 ± 2,28a	27,87 ± 0,99bc	0,77 ± 0,46a	1,99 ± 0,80a	229,73 ± 33,01ab	241,03 ± 21,29b	133,14 ± 24,24b	124,66 ± 14,27c
1W	24,13 ± 2,51a	28,82 ± 1,99ab	0,82 ± 0,48a	2,27 ± 0,25a	185,62 ± 15,35b	260,57 ± 24,18b	121,02 ± 5,12b	132,38 ± 10,07bc
2W	23,73 ± 2,54a	26,52 ± 0,96c	0,93 ± 0,71a	1,95 ± 0,23a	216,80 ± 21,94b	246,46 ± 19,90b	128,62 ± 7,22ab	135,42 ± 6,15ab

\*Oznaczenia w tabeli: 2W - nawadnianie dwa razy w tygodniu, 1W - nawadnianie raz w tygodniu, NR - nawadnianie w okresach krytycznego niedoboru wody opadowej, 0W - obiekt kontroli. \*\*Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie; test Duncana ( $p < 0,05$ )

Różna częstotliwość nawadniania uprawy stewii nie wpłynęła istotnie na zawartość wapnia, potasu i fosforu w liściach (Tabela 13). Stężenie wapnia w analizowanych próbach było zbliżone i wynosiło od 886,11 do 936,11 mg·100g<sup>-1</sup> w lipcu i zmalało do 769,17-894,44 mg·100g<sup>-1</sup> we wrześniu. Zawartość wapnia w liściach stewii uprawianej w Polsce była mniejsza od całkowitej zawartości wapnia w liściach stewii uprawianej w cieplejszym klimacie, gdzie może wynosić do 1500 mg·100g<sup>-1</sup> (Ucar i in., 2018, Tadhani i Subhash, 2006). Zawartość potasu w roślinach stewii uległa redukcji we wszystkich próbach od lipca do września o ok. 10-30%. Pomimo różnic wynikających z rozwoju rośliny nie odnotowano istotnego wpływu nawodnienia na poziom tego składnika zarówno w próbach pobranych w lipcu jak i we wrześniu. Zawartość potasu wynosiła od 2813,89 mg·100g<sup>-1</sup> dla NR do 3316,67 mg·100g<sup>-1</sup> dla 0W w lipcu oraz w przedziale 2519,44-2737,50 mg·100g<sup>-1</sup> we wrześniu. Największą redukcję zawartości potasu pomiędzy analizami wykonanymi na materiale z lipca oraz września określono dla próby kontrolnej. Zawartość magnezu w liściach stewii ulegała redukcji wraz z wiekiem roślin. Zawartość magnezu wahała się od 159,44 do 173,33 mg·100g<sup>-1</sup> w lipcu, natomiast we wrześniu była najmniejsza w próbie niepodlewanej, kontrolnej (133,33 mg·100g<sup>-1</sup>), a największa w próbie podlewanej dwa razy w tygodniu (170 mg·100g<sup>-1</sup>). W badaniach Khiraoui i in. (2010), rośliny stewii uprawiane w Maroku także wykazywały większą akumulację magnezu warunkach większej wilgotności. Stężenie fosforu we wszystkich próbkach pobranych w lipcu było statystycznie jednorodne i wynosiło od 128,72 mg·100g<sup>-1</sup> (0W) do 147,39 mg·100g<sup>-1</sup> (1W). Podobnie, we wszystkich próbach z września, zawartość fosforu wynosiła od 116,54 mg·100g<sup>-1</sup> (NR) do 143,78 mg·100g<sup>-1</sup> (0W). Zbliżoną koncentrację fosforu

w liściach stewii wykazali też Ucar i in. (2018) w próbkach stewii, jednakże jedynie z tendencją wzrostową względem rozwoju roślin jak w obiekcie kontrolnym (0W) opisywanego doświadczenia nawodnieniowego. Zawartość azotanów malała we wrześniu względem prób lipcowych. W lipcu stężenie jonów azotanowych mieściło się w przedziale 1496,34-2742,93 mg•100g<sup>-1</sup>, natomiast we wrześniu najwyższe stężenie azotanów oznaczono w próbce 0W (1662.17 mg•100g<sup>-1</sup>), a najmniejsze, niemal dwukrotnie, w próbce 2W z intensywnie nawadnianych roślin (829,46 mg•100g<sup>-1</sup>). Podobne wyniki uzyskano w badaniu przeprowadzonym przez Mahajan i Pal (2022), w którym rośliny stewii uprawiano na glebie o obniżonej zawartości wody, i to właśnie w obiektach nawadnianych charakteryzowały się one najmniejszym poborem azotu i azotanów.

Tabela 13. Wpływ częstotliwości nawadniania na zawartość azotanów i makroskładników w stewii (*Stevia rebaudiana* Bert.)

Częstotliwość nawadniania*	Wapń		Potas		Magnez		Fosfor		Azotany	
	[mg•100g <sup>-1</sup> of s.m.]									
	Lipiec	Wrzesień	Lipiec	Wrzesień	Lipiec	Wrzesień	Lipiec	Wrzesień	Lipiec	Wrzesień
0W	900.00± 180.28a**	769.17± 207.22a	3316.67 ± 549.15a	2584.72 ± 358.70a	163.33 ± 50.31a	133.33± 29.79b	128.72 ± 14.09a	143.78± 53.08a	2742.93 ± 906.75a	1662.17 ± 553.03a
NR	886.11± 138.13a	805.56± 199.42a	2813.89 ± 463.19a	2519.44 ± 163.35a	167.22 ± 42.51a	157.78± 37.84ab	135.30 ± 38.06a	116.54± 29.30a	1496.34 ± 612.32a	977.44± 387.74ab
1W	897.22± 205.56a	825.00± 203.49a	2926.39 ± 475.91a	2700.00 ± 241.17a	159.44 ± 39.64a	150.56± 36.52ab	147.39 ± 32.13a	127.66± 35.02a	1548.66 ± 706.41a	922.94± 238.69ab
2W	936.11± 162.07a	894.44± 173.56a	2945.83 ± 516.65a	2737.50 ± 309.55a	173.33 ± 66.47a	170.00± 35.44a	130.03 ± 15.63a	129.19± 30.54a	1753.97 ± 565.51a	829.46± 285.17b

\*Oznaczenia w tabeli: 2W- nawadnianie dwa razy w tygodniu, 1W- nawadnianie raz w tygodniu, NR- nawadnianie w okresach krytycznego niedoboru wody opadowej, 0W- obiekt kontrolny. \*\*Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie; test Duncana (p<0,05)

Stężenie barwników roślinnych (chlorofilu a, chlorofilu b i karotenoidów) w liściach stewii różniło się znacznie w zależności od częstotliwości nawadniania, a także okresu pobierania prób (lipiec i wrzesień) (Tabela 14). Wszystkie analizowane próbki zebrane w lipcu charakteryzowały się podobnym stężeniem chlorofilu a (0,86-0,97 mg•g<sup>-1</sup>), natomiast we wrześniu próba NR charakteryzowała się największym stężeniem chlorofilu a (1,06 mg•g<sup>-1</sup>). Podobną zawartość odnotowano także w próbce 0W (0,97 mg•g<sup>-1</sup>). W stewii nawadnianej częściej odnotowano we wrześniu zmniejszenie zawartości chlorofilu a względem prób pobieranych w lipcu. Stężenie chlorofilu b różniło

się w analizowanych próbach w lipcu i wrześniu. Największe stężenie chlorofilu b w lipcu oznaczono dla próbki NR ( $0,48 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ), natomiast najmniejsze w próbie 2W ( $0,36 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ). We wrześniu próbki NR i 0W charakteryzowały się większym stężeniem chlorofilu b (kolejno  $0,52$  i  $0,51 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) niż próbki 1W i 2W ( $0,39$  i  $0,40 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Badanie Mahajan i in. (2022) wykazały, że to rok prowadzenia uprawy, a nie tylko ilość dostarczanej wody miał kluczowy wpływ na stężenie chlorofilu (chlorofilu a, chlorofilu b i chlorofilu ogółem). Jednakże inne badania wykazały, że niedobór wody w uprawie stewii niemalże dwukrotnie zmniejszył zawartość chlorofilu ogółem (Hajhishemi i Sofo, 2018), podczas gdy badania przeprowadzone przez Vasilakoglou i in. (2016) wskazują, że zawartość chlorofilu utrzymuje się w roślinach stewii na niemal stałym poziomie niezależnie od warunków nawodnieniowych. W próbkach stewii pobranych w lipcu, największą zawartością karotenoidów (Tabela 14) charakteryzowały się liście z obiektu NR  $2,77 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , natomiast najmniejszą stwierdzono w próbkach liści z roślin podlewanych 2 razy w tygodniu ( $2,43 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Próby pobrane we wrześniu z obiektu 2W charakteryzowała się podobnym, najmniejszym stężeniem karotenoidów ( $2,58 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) zbliżonym do uzyskanego przy nawadnianiu raz w tygodniu, natomiast zawartość karotenoidów w NR zwiększyła się do  $3,17 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ . We wspomnianych wcześniej badaniach Hajhishemi i Sofo (2018), wykazano odwrotną zależność, ponieważ liście stewii wystawionej na działanie suszy charakteryzowały się mniejszą zawartością karotenoidów od utrzymywanych w prawidłowej wilgotności. Podobne wyniki w badaniach uzyskali Muhealdin i in. (2022), jednak należy zauważyć, że w tych dwóch przytoczonych badaniach analizowano rośliny stewii uprawiane w cieplejszym klimacie, dlatego wyniki mogą nie pokrywać się z uzyskanymi podczas uprawy stewii w chłodniejszym klimacie Polski.

Tabela 14. Wpływ częstotliwości nawadniania upraw na zawartość wybranych barwników roślinnych w stewii (*Stevia rebaudiana* Bert.)

Częstotliwość nawadniania*	Chlorofil a		Chlorofil b		Chlorofil a+b		Karotenoidy	
	[mg·g <sup>-1</sup> ś.m.]							
	Lipiec	Wrzesień	Lipiec	Wrzesień	Lipiec	Wrzesień	Lipiec	Wrzesień
<b>0W</b>	0,87±0,22a**	0,97±0,10a b	0,44±0,12ab	0,51±0,16a	1,31±0,18ab	1,48±0,13a	2,55±0,41ab	3,05±0,28a
<b>NR</b>	0,97±0,19a	1,06±0,06a	0,48±0,11a	0,52±0,10a	1,45±0,15a	1,58±0,08a	2,77±0,32a	3,17±0,14a
<b>1W</b>	0,88±0,10a	0,81±0,17c	0,42±0,07ab	0,39±0,08b	1,30±0,09ab	1,20±0,11b	2,56±0,10ab	2,54±0,40b
<b>2W</b>	0,86±0,05a	0,84±0,25b c	0,36±0,12b	0,40±0,09b	1,22±0,07b	1,24±0,17ab	2,43±0,30b	2,58±0,76b

\*Oznaczenia w tabeli: 2W - nawadnianie dwa razy w tygodniu, 1W - nawadnianie raz w tygodniu, NR - nawadnianie w okresach krytycznego niedoboru wody opadowej, 0W - obiekt kontrolny. \*\*Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie statystycznie; test Duncana ( $p < 0,05$ )

Wyniki uzyskane w doświadczeniu wykazały wpływ nawodnienia oraz stresu związanego z niedoborem wody na wzrost roślin stewii oraz ich skład chemiczny, dzięki czemu można wstępnie oszacować prawidłową, optymalną dla roślin stewii częstotliwość nawadniania w warunkach klimatu Polski.

## 8. PODSUMOWANIE

W ramach badań zaprezentowanych w jednotematycznym cyklu prac pod tytułem „Wpływ wybranych czynników agrotechnicznych na wzrost, plonowanie i skład chemiczny *Stevia rebaudiana* Bert.” przeprowadzono trzy doświadczenia polowe, które miały na celu ocenę wpływu trzech czynników agrotechnicznych: nawożenia, rozstawy i nawodnienia na wzrost roślin oraz wielkość i jakość plonu stewii.

Osiągnięciem naukowym publikacji 1 było wykazanie istotnego wpływu nawożenia azotem nie tylko na wielkość plonu, ale również na jego jakość. Stewia reagowała korzystnie na nawożenie przedwegetacyjne azotem. Doświadczenie udowodniło, że jest możliwe zwiększenie plonu stewii stosując mocznik we wszystkich badanych dawkach, saetrę amonową w dawkach 100 i 150 kg N·ha<sup>-1</sup> albo siarczan amonu w dawce 150 kg N·ha<sup>-1</sup>. Wskazuje to na szczególnie korzystne oddziaływanie mocznika, który aby zacząć działać musi ulec przekształceniu w formę amonową wskutek hydrolizy, co zwykle trwa od kilku dni do kilku tygodni. Umożliwia to sukcesywne dostarczanie roślinom azotu w miarę ich rozwoju bez niebezpieczeństwa wypłukania N. Dodatkowo badania wykazały istotny wpływ zastosowanej formy azotu w nawożeniu przedwegetacyjnym na biosyntezę stewiozydu i rebaudiozydu A w liściach stewii. Zawartość stewiozydu wzrastała wraz ze zwiększeniem dawki azotu wnoszonego przedwegetacyjnie w postaci mocznika i siarczanu amonu podczas gdy zawartość rebaudiozydu A była większa w kombinacjach nawożonych saetrą amonową i siarczanem amonu, zaś w przypadku mocznika była największa przy zastosowaniu dawki 100 kg N·ha<sup>-1</sup>.

W badaniach zaprezentowanych w manuskrypcie 2 osiągnięciem naukowym było wykazanie istotnego wpływu zastosowanej w uprawie stewii rozstawy na wzrost i rozwój tej rośliny. Eksperyment udowodnił korzystny wpływ optymalizacji wykorzystania przestrzeni przypadającej na roślinę. Doświadczenie wykazało, że w warunkach uprawy w Polsce za najbardziej korzystną rozstawę należy uznać 45 cm x 25 cm, przy której plon surowca oraz udział procentowy liści w plonie ogólnym jest największy.

W manuskrypcie 3 zaprezentowano wyniki badań, w których osiągnięciem naukowym było wykazanie reakcji stewii na intensywność podlewania, a także na stres

wynikający z niedoborów wody. W doświadczeniu wykazano zależności pomiędzy wielkością uzyskanego plonu a częstotliwością podlewania roślin, a także przeanalizowano wpływ warunków pogodowych w poszczególnych latach trwania badań. Eksperyment udowodnił wpływ zbyt częstego podlewania na większy udział odpadu w plonie oraz wpływ stresu wodnego, związanego z niedoborem wody w glebie, na zwiększoną zawartość istotnych składników takich jak polifenole, witamina C i azotany.

Osiągnięte w cyklu badań wyniki potwierdziły pozytywny wpływ odpowiedniego doboru zabiegów agrotechnicznych na jakość i wielkość plonu stewii (*Stevia rebaudiana* Bert.) uprawianej w klimacie umiarkowanym.

Zalecenia uprawowe dla stewii w warunkach klimatu umiarkowanego wciąż są niewystarczające ze względu na brak usystematyzowanych wytycznych odnośnie zasad jej uprawy. Jednakże ciągłe ocieplanie się klimatu, coraz łagodniejsze zimy, a także koncepcja upraw pod osłonami w postaci niskich i wysokich tuneli foliowych i liczne badania nad preferencjami stewii odnośnie agrotechniki uprawy mogą skutkować zwiększeniem zainteresowania tą rośliną przez producentów. Doświadczenia nad uprawą polową i optymalizacją jej technologii produkcji wydają się być koniecznością w aspekcie wzrostu zainteresowania stewią i coraz większego, wielokierunkowego wykorzystania jej ziela. Na świecie stewia uprawiana jest głównie w kierunku pozyskiwania glikozydów stewiolowych i wykorzystywania ich w przemyśle spożywczym, jednak w dobie ciągłego wzrostu wiedzy na temat prozdrowotnych właściwości tej rośliny w kolejnych latach charakter jej wykorzystania może bardziej ukierunkowywać się ku przemysłowi farmaceutycznemu, kosmetycznemu oraz paszowemu.

## 9. WNIOSKI

Na podstawie badań przeprowadzonych w latach 2014-2016 można wyciągnąć następujące wnioski i spostrzeżenia:

1. Stewia może być uprawiana w warunkach polowych jako roślina jednoroczna na terenie Polski południowo-zachodniej, a optymalizacja wybranych zabiegów agrotechnicznych wpływała korzystnie na wzrost, plonowanie oraz skład chemiczny tej rośliny.
2. Stewia jest rośliną dobrze reagującą na intensywne nawożenie azotem. Najlepiej plonowała przy intensywnym nawożeniu N w ilości 100+50 oraz 150+50 kg N·ha<sup>-1</sup>. Stewia reagowała na formę azotu w nawożeniu przedwegetacyjnym. Największy plon ziela stewii otrzymano przy nawożeniu przedwegetacyjnym saletrą amonową w dawce 100 i 150 kg N·ha<sup>-1</sup>, siarczanem amonu w dawce 150 kg N·ha<sup>-1</sup> oraz mocznikiem we wszystkich badanych dawkach. Największym udziałem liści w ziele stewii charakteryzowały się rośliny nawożone przedwegetacyjnie saletrą amonową w dawce 100 kg N·ha<sup>-1</sup>.
3. Zastosowanie nawożenia przedwegetacyjnego wpłynęło korzystnie na wysokość roślin, która była większa względem kontroli, niezależnie od ilości i formy zastosowanego nawozu.
4. Za optymalną rozstawę w uprawie stewii należy uznać 45x25 cm, przy której plon ziela, liści oraz udział liści w plonie ziela były największe.
5. Zastosowane rozstawy nie rzutowały istotnie na wzrost i rozwój roślin mierzone ich wysokością i liczbą liści na pędzie. Jedynie zasięg boczny i liczba pędów I rzędu wzrastała u roślin sadzonych w największej rozstawie 50x30 cm.
6. Podlewanie roślin w okresach krytycznego niedoboru wody w glebie w dobie oszczędności wody okazało się wystarczającym rozwiązaniem zapewniając we wszystkich latach trwania badań istotnie największy plon ziela stewii oraz średnio w trzech latach uprawy największy plon liści.

7. Podlewanie roślin, niezależnie od częstotliwości zabiegów, wpłynęło korzystnie na zwiększenie wysokości roślin. Największy zasięg boczny osiągały rośliny podlewane raz w tygodniu oraz w okresach niedoboru wody opadowej. Nawadnianie nie wpłynęło istotnie na liczbę wytworzonych przez roślinę pędów I rzędu oraz liści na pojedynczym pędzie.

8. Największą koncentrację związków fenolowych w liściach stewii wykazano pod koniec uprawy tej rośliny, we wrześniu, po zastosowaniu przedwegetacyjnie saletry amonowej w dawce  $150 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$ , zaś najmniejszą w roślinach nawożonych mocznikiem w dawce  $150 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$  i nienawożonych przedwegetacyjnie (kontrola). Zmniejszo na rozstawa roślin oraz brak podlewania wpłynął na zwiększoną zawartość związków fenolowych. Podlewanie w każdej badanej częstotliwości oraz zwiększenie rozstawy wpłynęło na zmniejszenie zawartości tych związków.

9. Zawartość cukrów redukujących była największa w liściach roślin uprawianych w rozstawie  $50 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$ , natomiast dawka i forma azotu wnoszonego przedwegetacyjnie oraz częstotliwość nawadniania nie wpłynęły istotnie na ich końcową zawartość.

10. Stewia charakteryzowała się dużą zawartością witaminy C. Jej poziom zwiększał się wraz z wiekiem roślin zarówno w doświadczeniu nawozowym jak i nawodnieniowym. Największą koncentrację witaminy C odnotowano w liściach roślin nawożonych przedwegetacyjnie siarczanem amonu w dawce  $150 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$  i nienawadnianych, zaś najmniejszą w obiekcie kontrolnym nienawożonym przedwegetacyjnie oraz nawożonym przedwegetacyjnie saletrą amonową w dawce  $150 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$ . Zagęszczanie roślin na jednostce powierzchni przyczyniło się do istotnego zmniejszenia zawartości tej witaminy w liściach.

11. Zawartość suchej masy w liściach stewii zwiększała się wraz z wiekiem roślin i była większa we wrześniu. Nawożenie przedwegetacyjne azotem nie wpłynęło istotnie na zawartość suchej masy w liściach stewii. Wzrost udziału procentowego suchej masy wykazano u roślin uprawianych w rozstawie  $30 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$  oraz nienawadnianych.

12. Dawki i formy azotu w nawożeniu przedwegetacyjnym nie wpłynęły istotnie na zawartość azotanów w liściach stewii, natomiast zwiększenie częstotliwości



nawadniania przyczyniło się do istotnego zmniejszenia akumulacji azotanów w liściach. Największą zawartość azotanów odnotowano u roślin uprawianych w rozstawie 50 cm x 30 cm.

13. Zastosowanie w uprawie stewii różnej rozstawy nie wpłynęło istotnie na zawartość barwników roślinnych w liściach stewii. Liście roślin zbieranych bezpośrednio przed zbiorem, uprawianych na poletkach nawożonych przedwegetacyjnie saletrą amonową w dawce  $100 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$  jako jedyne charakteryzowały się jednocześnie największą zawartością chlorofilu a, chlorofilu b oraz chlorofilu a+b. Sposób nawożenia przedwegetacyjnego nie wpłynął istotnie na zawartość karotenoidów w liściach. Intensywne nawadnianie upraw stewii zmniejszało koncentrację badanych barwników roślinnych.

14. Nawożenie przedwegetacyjne azotem w uprawie stewii w dawce  $150 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ , niezależnie od formy azotu, miało wpływ na zwiększenie zawartości wapnia w liściach stewii. Zastosowanie dawki  $100 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$  saletry amonowej i dawki  $50 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$  siarczanu amonu i mocznika miało wpływ na zwiększenie zawartości magnezu w analizowanych próbach. Nawożenie mocznikiem w dawce  $50 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$  skutkowało największą zawartością fosforu w roślinach stewii, natomiast zastosowanie siarczanu amonu w dawce  $50 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$  i mocznika w dawce  $100 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$  miało wpływ na największą zawartość potasu w liściach. Częstotliwość nawadniania wpłynęła jedynie na zawartość magnezu w liściach pobranych we wrześniu. Największą zawartością magnezu charakteryzowały się liście z roślin podlewanych dwa razy w tygodniu. Rozstawa 50 cm x 30 cm przyczyniła się do zwiększonej akumulacji wszystkich analizowanych makroelementów w roślinie, zaś rozstawa 45 cm x 25 cm jedynie magnezu i wapnia.

15. Zastosowanie w uprawie stewii siarczanu amonu w dawce  $150 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$  w nawożeniu przedwegetacyjnym najkorzystniej wpłynęło na zawartość glikozydów stewiolowych w liściach stewii, zapewniając istotnie największą ilość stewiozydu i rebaudiozyda A. Poziom stewiozydu był dwukrotnie natomiast rebaudiozydu A, aż siedmiokrotnie większy niż w próbie kontrolnej (bez nawożenia przedwegetacyjnego). Zawartość stewiozydu zwiększała się w liściach stewii wraz ze zwiększeniem dawki azotu wnoszonej przedwegetacyjnie w postaci mocznika i siarczanu amonu podczas gdy

zawartość rebaudiozydu zwiększała się pod wpływem zwiększających dawek saletry amonowej i siarczanu amonu, zaś w przypadku mocznika była największa przy dawce  $100 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$ .

## 10. BIBLIOGRAFIA

1. Abelyan, V., Markosyan, A., Abelyan, L. (2012) Process for manufacturing a sweetener and use thereof. USA Patent 8293307, B2.
2. Abou-Arab, A. E., Abou-Arab, A. A., & Abu-Salem, M. F. (2010). Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. *African Journal of Food Science*, 4(5), 269-281.
3. Ahmad, J., Khan, I., Blundell, R., Azzopardi, J., & Mahomoodally, M. F. (2020). *Stevia rebaudiana* Bertoni.: an updated review of its health benefits, industrial applications and safety. *Trends in Food Science & Technology*, 100, 177-189
4. Ahmad, M.A., Deng, X., Adeel, M., Rizwan, M., Shakoore, N., Yang, Y., Javed, R. (2022). Influence of calcium and magnesium elimination on plant biomass and secondary metabolites of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 69, 2008–2016.
5. Aladakatti, Y. R., Palled, Y. B., Chetti, M. B., Halikatti, S. I., Alagundagi, S. C., Patil, P. L., Patil V. C., Janawade, A. D (2012). Effect of irrigation schedule and planting geometry on growth and yield of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni.). *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 25(1)
6. Albergaria, E.T., Oliveira, A.F.M., Albuquerque, U.P. (2020). The effect of water deficit stress on the composition of phenolic compounds in medicinal plants. *S. Afr. J. Bot.*, 131, 12–17.
7. Amien, S., Maulana, H., Ruswandi, D., Nurjanah, S. (2021). Genetic gain and relationship of yield and yield attributes of mutant and cross-bred stevia (*Stevia rebaudiana*) genotypes. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(8).
8. Andolfi, L., Macchia, M., Ceccarini, L. (2006). Agronomic-productive characteristics of two genotype of *Stevia rebaudiana* in central Italy. *Italian Journal of Agronomy*, 1(2), 257-262.
9. de Andrade, M. V. S., Lucho, S. R., de Castro, R. D., Ribeiro, P. R. (2024). Alternative for natural sweeteners: Improving the use of stevia as a source of steviol glycosides. *Industrial Crops and Products*, 208, 117801.

10. Ashok, K.Y., Singh, S., Dhyani, D., Ahuja, P.S. (2011). A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Can. J. Plant Sci.* 91: 1-27. – 3.
11. Badran, A.E., Alhady, M.R.A.A., Hassan, W.A. (2015). In Vitro Evaluation of Some Traits in *Stevia rebaudiana* (Bertoni) under Drought Stress and Their Relationship on Stevioside Content. *American Journal of Plant Sciences*, 6, 746–752.
12. Baghat, A.K., Gupta, L.M., Gupta, M., Gupta, S.K., Raina, N.S. (2022). Effect of Integrated Nutrient Management on Growth and Yield of Stevia (Bertoni) *Stevia rebaudiana*. *Indian J. Ecol.* 49, 1965–1967.
13. Barriocanal, L. A., Palacios, M., Benitez, G., Benitez, S., Jimenez, J. T., Jimenez, N., Rojas, V. (2008). Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans. A pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in Type 1 and Type 2 diabetics. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 51(1), 37-41.
14. Bellache, M., Torres-Pagan, N., Verdeguer, M., Llinares, J.V., Benfekih, L.A., Sestras, R.E., Vicente, O., Sestras, A.F., Boscaiu, M. (2022). Comparative Analysis of Tolerance to Salt Stress and Water Deficit in Two Invasive Weeds of the Genus *Erigeron* (Asteraceae). *Plants*, 11, 2059
15. Benhmimou, A., Ibriz, M., Al Faïz, C., Douaik, A., Khiraoui, A., Amchra, F. Z., Lage, M. (2017). Productivity of new sweet plant in Morocco (*Stevia rebaudiana* Bertoni) under water stress. *J. Med. Plants Stud.*, 5(5), 126-131
16. Bugaj, B., Leszczyńska, T., Pysz, M., Kopec, A., Pacholarz, J., Pysz – Izdebska, K. (2013). Charakterystyka i Prozdrowotne Właściwości *Stevia Rebaudiana* Bretoni, [w]: *Żywność, Nauka. Technologia, Jakość*, 3 (88), s.27
17. Büyük, G., Bayram, C. A., Kırpık, M., İnan, M. (2022). Agronomic performance and nutrient content of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) in different semi-arid locations. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 53(7), 848-861.

18. Calapardo, M. J. M. i Bryl, I. M. (2024). Enhancing herbage growth, yield and quality of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) using bio-organic nutrients in varied soil media. *Sains Malaysiana*, 53(3), 533-547.
19. Carneiro, J. W. P. (1990). *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, production of seed. M.Sc. Thesis, State University of Maringa, Brazil.
20. Catharino, R. R., i Santos, L. S. (2012). On-line monitoring of stevioside sweetener hydrolysis to steviol in acidic aqueous solutions. *Food chemistry*, 133(4), 1632-1635.
21. Cicevan, R., Al Hassan, M., Sestras, A.F., Prohens, J., Vicente, O., Sestras, R.E., Boscaiu, M. (2016). Screening for drought tolerance in cultivars of the ornamental genus *Tagetes* (*Asteraceae*). *PeerJ*, 4, e2133.
22. Clemente, C., Angelini, L. G., Ascrizzi, R. i Tavarini, S. (2021). *Stevia rebaudiana* (Bertoni) as a multifunctional and sustainable crop for the mediterranean climate. *Agriculture*, 11(2), 123.
23. De, S., Mondal, S., Banerjee, S. (2013). *Stevioside: technology, applications and health*. John Wiley & Sons.
24. Desai Heta, B., Desai Charmi, V., Desai Charmi, P., Singh, D., Suthar, H. (2017) Effect of magnesium nanoparticles on physiology and stevioside in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Eur. J. Biomed. Pharm. Sci.* 4, 642–646.
25. Dunbabin V., Diggle A., Rengel, Z. (2003). Is there an optimal root architecture for nitrate capture in leaching environments? *Plant, Cell & Environment*, 26(6), 835-844.
26. Dychtoń M. (2015) Cukier – „biała śmierć”, „słodka trucizna” <https://dietetycy.org.pl/cukier-biala-smierc-slodka-truczna/>[dostęp: 31.05.2024]
27. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej L 295/205, T. 54, 12 listopada 2011 Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1131/2011 z dnia 11 listopada 2011 r. zmieniające załącznik II do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1333/2008 w odniesieniu do glikozydów stewiolowych (Dz.U.U.E.L.295/205).

28. Emendack, Y., Burke, J., Laza, H., Sanchez, J., Hayes, C. (2018). Abiotic stress effects on sorghum leaf dhurrin and soluble sugar contents throughout plant development. *Crop Sci.* 58, 1706–1716.
29. Fatima, I., Munir, M., Sadia, S., Tariq, A., Qureshi, R. (2023). Nutritional Profile and Health Benefits of *Stevia Rebaudiana* Bertoni: An Updated Review. *Journal of Bioresource Management*, 10(3), 3.
30. Gerami, M., Majidian, P., Ghorbanpour, A., Alipour, Z. (2020). *Stevia rebaudiana* Bertoni responses to salt stress and chitosan elicitor. *Physiol. Mol. Biol. Plants.*, 26, 965–974.
31. Ghamarnia, H., Jalili, Z., Sargordi, F. (2022) The effect of supplementary irrigation on yield and water use efficiency of *Stevia (Stevia rebaudiana* Bertoni) in greenhouse and farm investigation. *Advanced Technologies in Water Efficiency*, 2(1), 1-15.
32. Godlewska, K., Pacyga, P., Michalak, I., Biesiada, A., Szumny, A., Pachura, N., Piszcz, U. (2021). Effect of Botanical Extracts on the Growth and Nutritional Quality of Field-Grown White Head Cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata). *Molecules*, 26, 1992.
33. Goyal, S.K., Samsher, R.K. Goyal. (2010). *Stevia (Stevia rebaudiana)* a bio-sweetener: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 61 (1): 1–10.
34. Grad, W.E., Kandil, S.H., Kenawy, E., Massoud, M.I. (2021). The potential of sugarcane bagasse polymer composite for sustainable of *Stevia rebaudiana* productivity under deficit irrigation. *SVU-Int. J. Agric. Sci.*, 3, 22–36.
35. Grashoff, J.L. (1972). A Systematic Study of the North and Central American Species of *Stevia*. Ph. D. dissertation, University of Texas at Austin.
36. GUS- Główny Urząd Statystyczny (2023) Dostawy na rynek krajowy oraz spożycie niektórych artykułów konsumpcyjnych na 1 mieszkańca w 2022 r. <https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/ceny-handel/handel/dostawy-na-rynek-krajowy-oraz-spozycie-niektorych-artykulow-konsumpcyjnych-na-1-mieszkanca-w-2022-roku,9,13.html> [dostęp: 31.05.2024]

37. Hernández, K. V., Moreno-Romero, J., de la Torre, M. H., Manríquez, C. P., Leal, D. R., Martínez-García, J. F. (2022). Effect of light intensity on steviol glycosides production in leaves of *Stevia rebaudiana* plants. *Phytochemistry*, 194, 113027.
38. Heyden, T. (2013). How did Stevia get mainstream? BBC News Magazine, 4 June 2013.
39. Ibrahim, M. A., Rodenburg, D. L., Alves, K., Perera, W. H., Fronczek, F. R., Bowling, J., McChesney, J. D. (2016). Rebaudiosides R and S, minor diterpene glycosides from the leaves of *Stevia rebaudiana*. *Journal of natural products*, 79(5), 1468-1472.
40. Ijaz, M., Pirzada, A. M., Saqib, M., Latif, M. (2015). *Stevia rebaudiana*: An alternative sugar crop in Pakistan—a review. *Erling Verl. GmbH Co. KG*, 20(2), 88-96.
41. Jagła, J. (2011). Stewia. *Działkowiec* 2: 58.
42. Kalicka, D., Znamirowska, A., Buniowska, M., Esteve Más, M. J., Frigola Canoves, A. (2017). Effect of stevia addition on selected properties of yoghurt during refrigerated storage. *Polish Journal of Natural Sciences*, 32(2), 323-334
43. Kaplan, B. E. G. Ü. M., Turgut, K. (2019). Improvement of rebaudioside A diterpene glycoside content in *Stevia rebaudiana* Bertoni using clone selection. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 43(2), 232-240.
44. Karimi, M., Ahmadi, A., Hashemi, J., Abbasi, A., Tavarini, S., Guglielminetti, L., Angelini, L.G. (2015). The effect of soil moisture depletion on Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) grown in greenhouse conditions: Growth, steviol glycosides content, soluble sugars and total antioxidant capacity. *Sci. Hortic.*, 183, 93–99.
45. Khiraoui, A., Bakha, M., Amchra, F., Ourouadi, S., Boulli, A., Faiz, C.A., Hasib, A. (2010). Nutritional and biochemical properties of natural sweeteners of six cultivars of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves grown in Morocco. *J. Materials Environment. Sci.*, 8, 1015–1022
46. Kim, J.S., Yang, M., Lee, O.H., Kang, S.N. (2011) The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *LWT-Food Sci. Technol.* 44, 1328–1332.

47. Kinghorn, A.D. (2002), *Stevia: The Genus Stevia Medicinal and Aromatic Plants—Industrial Profiles, Volume 19- Stevia*. Tylor&Francis, Londyn.
48. Kolanowski, W. (2013). Glikozydy stewiolowe—właściwości i zastosowanie w żywności. *Bromatologia i chemia toksykologiczna*, 46(2), 140-150.
49. Koliaki, C., Dalamaga, M. i Liatis, S. (2023). Update on the obesity epidemic: after the sudden rise, is the upward trajectory beginning to flatten?. *Current Obesity Reports*, 12(4), 514-527.
50. Kroyer, G. (2010). Stevioside and Stevia-sweetener in food: application, stability and interaction with food ingredients. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 5, 225-229.
51. Kumar R., Sood S., Sharma S., Kasana R.C., Pathania V.L., Singh B., Singh R.D. (2014) Effect of plant sparing and organic mulch on growth, yield and quality of natural sweetener plant Stevia and soil fertility in western Himalayas. *Int. J. Plant Prod.*, 8 (3), 311-334.
52. Kumari S., Ghosh G., Meshram M. R. (2021) TSS, yield and energetics of stevia as influenced by nitrogen levels and spacing under eastern UP conditions. *AGRICULTURAL SCIENCE DIGEST-A RESEARCH JOURNAL*, 41(2), 319-323.
53. Lemus- Mondaca, R., Vega-Galvez, A., Zura-Bravo, L., Ah-Hen, K. (2012). *Stevia rebaudiana* Bertroni, source of a high-potency natural sweetener. A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chem.*, 132, 1121-1132.
54. Lemus-Mondaca, R., Ah-Hen, K., Vega-Gálvez, A., Honores, K., Moraga, N. (2016). *Stevia rebaudiana* leaves: Effect of drying process temperature on bioactive components, antioxidant capacity and natural sweeteners. *Plant Foods Hum. Nutr.* 71, 49–56.
55. Levini, A., Riccardi, M., Pulvento, C., De Luca, S., Scamosci, M., D’Andria, R. (2008). Yield, Quality and Water Consumption of *Stevia rebaudiana* Bertoni Grown under Different Irrigation Regimes in Southern Italy. *Ital. J. Agron. Riv. Agron.*, 2, 135–143



56. Liu X., Ren G., Shi Y. (2011) The effect of organic manure and chemical fertilizer on growth and development of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Energy Procedia*, 5, 1200-1204.
57. Mahajan, M., Thakur, B. K., Pal, P. K. (2021). Moisture stress and nitrogen availability modulate the secondary metabolite profiles, enzymatic activity, and physiological and agronomic traits of *Stevia rebaudiana*. *Plant Physiol Biochem*, 162, 56-68.
58. Mahajan, M., Pal, P.K. (2022). Yield response, accumulation of bioactive ingredient and ion uptake of *Stevia rebaudiana* to different soil-moisture and nitrogen levels. *Agric. Water Manag.* 264, 107511.
59. Malik, V. S., Hu, F. B. (2022). The role of sugar-sweetened beverages in the global epidemics of obesity and chronic diseases. *Nature Reviews Endocrinology*, 18(4), 205-218.
60. Marcinek, K., Krejpcio, Z. (2015). *Stevia rebaudiana* bertoni- chemical composition and functional properties. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 14(2), 145-152.
61. Midmore, D. J., Rank, A. H. (2002). *A new rural industry-Stevia-to replace imported chemical sweeteners* (pp. 1-23). Wagga Wagga, Australia: Rural Industries Research and Development Corporation.
62. Miklar, J. (2009). Stewia – tajemniczy miodowy liść. *Zdrowa Żywność. Zdrowy Styl Życia*. 1: 34-35.
63. Miladinova-Georgieva, K., Geneva, M., Stancheva, I., Petrova, M., Sichanova, M., Kirova, E. (2023) Effects of Different Elicitors on Micropropagation, Biomass and Secondary Metabolite Production of *Stevia rebaudiana* Bertoni- A Review. *Plants*, 12, 153.
64. Muller, D. (2011). Wojny cukrowe. *Tygodnik Forum* nr 29/2011. Warszawa.
65. NFZ- Narodowy Fundusz Zdrowia (2024). Europejski Dzień Walki z Otyłością. Nowy raport NFZ – Otyłość i jej konsekwencje. <https://www.nfz.gov.pl/aktualnosci/aktualnosci-centrali/europejski-dzien-walki->

z-otyloscia- nowy-raport-nfz-otylosc-i-jej-konsekwencje,8611.html [dostęp: 31.05.2024]

66. Nowosielski O. (1988). Metody oznaczania potrzeb nawozowych. PWRiL, Warszawa, 1-91.
67. Oddone, B. (1997). How to grow stevia. Technical manual. Guarani Botanicals, Pawtucket, CT.
68. Okręglińska, K., Pardecki, M., Jagielska, A., Tyszko, P. Z. (2017). Metaboliczne efekty nadmiernego spożycia fruktozy z diety. *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu*, 23(3).
69. Okunogbe A., Nugent R., Spencer G., Powis J., Ralston J., John Wilding J. (2022) Economic impacts of overweight and obesity: current and future estimates for 161 countries. *BMJ Global Health*; 7(9), e009773.
70. Orellana-Paucar, A. M. (2023). Steviol glycosides from *Stevia rebaudiana*: An updated overview of their sweetening activity, pharmacological properties, and safety aspects. *Molecules*, 28(3), 1258.
71. Parris, C.A., Shock, C.C., Qian, M. (2017) Soil water tension irrigation criteria affects *Stevia rebaudiana* leaf yield and leaf steviol glycoside composition. *Hortscience*, 52, 154–161.
72. Pereira, L.F., Ferreira, V.M., Oliveira, N.G., Sarmiento, P.L., Endres, L., Teodoro, I. (2017). Sugars levels of four sugarcane genotypes in different stem portions during the maturation phase. *An. Acad. Bras. Ciências*, 89, 1231–1242.
73. Perera, W. H., Ghiviriga, I., Rodenburg, D. L., Alves, K., Bowling, J. J., Avula, B., McChesney, J. D. (2017). Rebaudiosides T and U, minor C-19 xylopyranosyl and arabinopyranosyl steviol glycoside derivatives from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni. *Phytochemistry*, 135, 106-114.
74. Peteliuk, V., L. Rybchuk, M. Bayliak, K.B. Storey, O. Lushchak. (2021). Natural sweetener *Stevia rebaudiana*: functionalities, health benefits and potential risks. *EXCLI Journal*. 20:1412–1430.
75. PN-90/A-75101/03. Przetwory Owocowe i Warzywne Przygotowanie Próbek i Metody Badań Fizykochemicznych Oznaczanie Zawartości Suchej Masy Metodą Wagową; Polish Committee for Standardisation: Warszawa, Poland, 1990.

76. PN-90/A-75101/07. Przetwory Owocowe i Warzywne. Przygotowanie Próbek i Metody Badań. Oznaczanie Zawartości Cukrów i Ekstraktu Bezczukrowego; Polish Committee for Standardisation: Warszawa, Poland, 1990.
77. PN-90/A-75101/11. Przetwory Owocowe i Warzywne. Przygotowanie Próbek i Metody Badań. Oznaczanie kwasu askorbinowego; Polish Committee for Standardization: Warszawa, Poland, 1990.
78. Postma J. A., Hecht V. L., Hikosaka K., Nord E. A., Pons T. L., Poorter H. (2021). Dividing the pie: A quantitative review on plant density responses. *Plant, Cell & Environment*, 44(4), 1072-1094.
79. Pól, J., Hohnová, B. i Hyötyläinen, T. (2007). Characterisation of *Stevia rebaudiana* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1150(1-2), 85-92.
80. Ramesh, K., Singh, V., Megeji, N. W. (2006). Cultivation of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni]: A comprehensive review. *Advances in Agronomy*, 89, 137-177.
81. Ren B., Liu W., Zhang J., Dong S., Liu P., Zhao B. (2017). Effects of plant density on the photosynthetic and chloroplast characteristics of maize under high-yielding conditions. *The Science of Nature*, 104, 1-11.
82. Reis, R. V., Chierrito, T. P., Silva, T. F., Albiero, A. L., Souza, L. A., Gonçalves, J. E., ... Gonçalves, R. A. (2017). Morpho-anatomical study of *Stevia rebaudiana* roots grown in vitro and in vivo. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27, 34-39.
83. Salvador-Reyes, R., Sotelo-Herrera, M., Paucar-Menacho, L. (2014). Estudio de la Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) como edulcorante natural y su uso en beneficio de la salud. *Scientia Agropecuaria*, 5(3), 157–163.
84. Schiatti-Sisó, I. P., Quintana, S. E., García-Zapateiro, L. A. (2023). Stevia (*Stevia rebaudiana*) as a common sugar substitute and its application in food matrices: an updated review. *Journal of Food Science and Technology*, 60(5), 1483-1492.
85. Shahverdi, M.A., Omid, H., Tabatabaei, S.J. (2019). Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) responses to NaCl stress: Growth, photosynthetic pigments, diterpene glycosides and ion content in root and shoot. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 18, 355–360.

86. Sharma, R., Yadav, R., & Manivannan, E. (2012). Study of effect of *Stevia rebaudiana* bertoni on oxidative stress in type-2 diabetic rat models. *Biomedicine & Aging Pathology*, 2(3), 126-131.
87. Shivani, K., Gautam, G., Sukany, G., Mesharm, M.R. (2019) Impact of spacing and levels of nitrogen on growth and yield of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *J. Pharmacogn. Phytochem.* 8, 1878–1881.
88. Simlat, M., Ślęzak, P., Moś, M., Warchoń, M., Skrzypek, E., Ptak, A. (2016). The effect of light quality on seed germination, seedling growth and selected biochemical properties of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Sci. Hortic.*, 211, 295–304.
89. Singh, D. P., Rajiv, Kumari, M., Prakash, H. G., Kumar, P. (2022). Augmenting Commercial Yield of Stevia (*Stevia rebaudiana*) through Agronomic Interventions in Indian Sub-Tropics. *Sugar Tech*, 24(5), 1583-1589.
90. Soejarto, D. D. (2001). Botany of Stevia and *Stevia rebaudiana*. In *Stevia* (pp. 18-39). CRC Press. Southward, R.C., Kitchen, K.L., Fountain, D.W. (2004). Flowering and seed production in a model pot-grown specimen of the sweet herb *Stevia rebaudiana* Bertoni (*Asteraceae*). *Agronomy New Zealand*, vol. 34, pp. 183-190
91. Southward, R. C., Kitchen, K. L., i Fountain, D. W. (2004). Flowering and seed production in a model pot-grown specimen of the sweet herb *Stevia rebaudiana* Bertoni (*Asteraceae*).
92. Sun, Y.M., Huang, X.L., Zhang, T., Yang, Y.H., Cheng, X.F., Xu, X.Y., Yuan, H.Y. (2021). Potassium deficiency inhibits steviol glycosides synthesis by limiting leaf sugar metabolism in stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) plants. *J. Integr. Agric* 20, 2932–2943.
93. Tadesse, N., Gebere, A., Lulie, B., Hordofa, M. (2016). Influence of plant population density on growth and yield of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni L.) at Wondo Genet South Ethiopia. *Acad. Res. J. Agri. Sci. Res.* 4, 321–329.
94. Tadhani, M., Subhash, R. (2006). Preliminary studies on *Stevia rebaudiana* leaves: Proximal composition, mineral analysis and phytochemical screening. *J. Med. Sci.* 6, 321–326.

95. Tan S. L., Muhammad Ghawas M., Mohamad Najib M. Y., Zawayi M. (2008) Preliminary evaluation and selection of stevia under Malaysian conditions. *J Trop Agric. Food Sci.*, 36(2), 000-000.
96. Tao, R., i Cho, S. (2020). Consumer-based sensory characterization of steviol glycosides (rebaudioside A, D, and M). *Foods*, 9(8), 1026.
97. Ucar, E., Ozyigit, Y., Eruygur, N., Güven, D., Yur, S., Turgut, K., Özek, T., Kütük, N. (2018). The effect of the plant age and growth period on the nutritional substance, chlorophyll and steviol glycoside rates in *Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni)* leaves. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 49, 291–302.
98. Vaněk, T., Nepovím, A., Valček, P. (2001). Determination of stevioside in plant material and fruit teas. *J. Food Compos. Anal.*, 14, 383–388
99. Vasilakoglou, I., Kalfountzos, D., Gougoulas, N., Reppas, C. (2016) Productivity of two stevia varieties under reduced irrigation and fertilization inputs. *Arch. Agron. Soil Sci.*, 62(4), 457-472
100. Wisniewska, J., Jaworska-Luczak, B., & Wierzba, W. (2011). Stewia w świetle regulacji unijnych oraz najnowszych opinii EFSA. *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny*, 55(04)
101. Yadav, A.K., Singh, S., Dhyani, D., Ahuja, P.S. (2011). A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Can. J. Plant Sci.*, 91, 1–6.
102. Yang, Y., Huang, S., Han, Y., Yuan, H., Gu, C., Wang, Z. (2015) Environmental cues induce changes of steviol glycosides contents and transcription of corresponding biosynthetic genes in *Stevia rebaudiana*. *Plant Physiol. Biochem.*, 86, 174–180.
103. Youssef, M. A., Yousef, A. F., Ali, M. M., Ahmed, A. I., Lamtom, S. F., Strobel, W. R., Kalaji, H. M. (2021). Exogenously applied nitrogenous fertilizers and effective microorganisms improve plant growth of stevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) and soil fertility. *AMB Express*, 11, 1-10.

## 11. DOKUMENTACJA FOTOGRAFICZNA



Rys. 1. Nasiona stewii



Rys.2. Siewki stewii



Rys. 3. Siewka stewii



Rys.4. Stewia w wielodoniczce



Rys. 5. Stewia w doniczkach



Rys. 6. Rozsada stewii w donicze



Rys. 7. Młode rośliny stewii na polu



Rys.8. Młoda roślina stewii na polu



Rys. 9. Zakładanie doświadczeń polowych stewii



Rys. 10. Rośliny stewii przed zbiorem





Rys. 11. Stevia w uprawie polowej



Rys. 12. Stevia w uprawie polowej



Rys. 13. Kwiaty stewii



Rys.14. Kwiaty stewii



Rys. 15. Liście stewii



Rys.16. Liście stewii



Rys.17.System korzeniowy stewii



Rys.18. System korzeniowy stewii

## 12. PUBLIKACJE I MANUSKRYPTY BĘDĄCE W RECENZJI

### 1. “Influence of the Nitrogen Fertilization on the Yield, Biometric Characteristics and Chemical Composition of *Stevia rebaudiana* Bertoni Grown in Poland. “



Article

## Influence of the Nitrogen Fertilization on the Yield, Biometric Characteristics and Chemical Composition of *Stevia rebaudiana* Bertoni Grown in Poland

Joanna Śniegowska <sup>1,2,\*</sup>, Anita Biesiada <sup>1</sup> and Alan Gasiński <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Horticulture, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, 50-375 Wrocław, Poland; anita.biesiada@upwr.edu.pl

<sup>2</sup> Department of Fermentation and Cereals Technology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, 50-375 Wrocław, Poland; alan.gasinski@upwr.edu.pl

\* Correspondence: joanna.sniegowska@upwr.edu.pl

**Abstract:** *Stevia rebaudiana* Bertoni is a plant native to South America that has gathered much interest in recent decades thanks to diterpene glycosides, called steviosides, which it produces. These compounds are characterised by their sweetness, which is 250–300 times higher than saccharose, and they contain almost no caloric value. Stevia is currently also grown outside the South American continent, in various countries characterised by warm weather. This research aimed to determine whether it is viable to grow *Stevia rebaudiana* plants in Poland, a country characterised by a cooler climate than the native regions for stevia plants. Additionally, the impact of adding various dosages and forms of nitrogen fertiliser was analysed. It was determined that *Stevia rebaudiana* grown in Poland is characterised by a rather low concentration of steviosides, although proper nitrogen fertilisation can improve various characteristics of the grown plants. The addition of 100 kg or 150 kg of nitrogen per hectare of the field in the form of urea or ammonium nitrate increased the yield of the stevia plants. The stevioside content can be increased by applying fertilisation using 100 kg or 150 kg of nitrogen per hectare in the form of ammonium sulfate. The total yield of the stevia plants grown in Poland was lower than the yield typically recorded in warmer countries, and the low concentration of steviosides in the plant suggests that more research about growing *Stevia rebaudiana* in Poland would be needed to develop profitable methods of stevia cultivation.

**Keywords:** stevia; stevioside; rebaudioside A; urea; ammonium nitrate; ammonium sulfate



**Citation:** Śniegowska, J.; Biesiada, A.; Gasiński, A. Influence of the Nitrogen Fertilization on the Yield, Biometric Characteristics and Chemical Composition of *Stevia rebaudiana* Bertoni Grown in Poland. *Molecules* **2024**, *29*, 1865. <https://doi.org/10.3390/molecules29081865>

Academic Editor: José Sousa Cámara

Received: 12 February 2024

Revised: 15 April 2024

Accepted: 16 April 2024

Published: 19 April 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 1. Introduction

*Stevia rebaudiana* Bertoni, commonly known as ‘stevia’, is a perennial shrub native to the highlands of northeastern Paraguay in South America. This plant has garnered significant attention in recent years due to its natural sweetness [1,2]. The rise in popularity of stevia is attributed to its remarkable sweetness, several times greater than that of sucrose, with the added advantage of low-calorie content. Stevia has emerged as a promising natural substitute for synthetic sweeteners, which can explain the interest in using this plant in the production of various sugar-free products [2,3].

The sweet taste of the stevia leaves derives from so-called steviol glycosides, primarily stevioside and rebaudioside B, which are characterised by 250–300 greater sweetness than sucrose [1,4].

Due to the fact that steviol glycosides can be successfully used as a low-calorie sweetener, there is a growing interest in the cultivation of stevia worldwide outside of South America. This has been attempted in China, Malaysia, Singapore, South Korea and Thailand [3].

Furthermore, stevia plants are not only useful in food production but can also be used by the pharmaceutical and cosmetic industries. Steviosides have a positive influence on

the human circulatory system as they decrease blood pressure [1,4]. Steviol, a diterpene found in *Stevia rebaudiana* plants, decreases glucose absorption through the small intestines, reducing caloric intake, which can be beneficial for overweight people [5]. Consumption of stevia can prevent the pH level of gastric acid from dropping too low, decrease stomach pains, and reduce the possibility of contracting peptic ulcer disease as well as acid indigestion [6]. Recent studies on the biosynthesis of silver nanoparticles using extracts from *Stevia rebaudiana* have shown that it is possible to acquire novel antibacterial preparations, which could be used as an alternative for antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria [7]. Additionally, due to the large amount of phytoconstituents, vitamins and phenolics, *Stevia rebaudiana* can be an active ingredient in various cosmetic products [8,9].

Cultivating stevia in the country where the stevia plants are used could reduce costs and carbon emissions connected with shipping dried stevia plants to different continents [10]. Additionally, the cultivation of stevia nearby the companies using stevia glycosides could help regulate the quality of stevia products and improve sales, as consumers prefer locally sourced food products [11–15].

Stevia is typically grown in warmer regions than most European countries, which is why exploring its growth in cooler climates presents a novel avenue for agricultural research. This study analyses the feasibility of cultivating *Stevia rebaudiana* in Poland, a region characterised by a cooler climate than the plant's conventional habitats and aims to determine which nitrogen fertilisation treatment could be optimal for the growth of *Stevia rebaudiana* in the Polish climate. Typically grown in tropical and subtropical regions, the adaptation of stevia to a cooler climate present in Poland could yield unique data about the properties of the stevia plant, its biometric characteristics and the yield of the plantation. Nitrogen fertilisation of stevia is a crucial aspect of its cultivation, as adequate nitrogen uptake can influence the final concentration of secondary metabolites in the plant tissue. Nitrogen is also essential in the synthesis of amino acids, proteins, various enzymes and nucleic acid, which are necessary for proper growth of the plant [16,17]. Studies have also shown that increased nitrogen fertilisation during the growth *Stevia rebaudiana* can affect the total yield of the plant [16,17]. In this study, not only was the dosage of nitrogen fertilisation analysed, but different forms of nitrogen fertiliser were also used. The experiment was conducted over three consecutive years in the field. Urea, ammonium nitrate and ammonium sulphate were used as a fertiliser in doses equal to 50, 100 and 150 kg of nitrogen per hectare. The study aimed to analyse yield and various characteristics of *Stevia rebaudiana*, such as plant height, width, number of shoots and concentration of variety of substances in the stevia leaves: elements such as calcium, potassium, magnesium and phosphorus; content of chlorophyll and carotenoids; concentration of ascorbic acid, phenolic compounds, reducing sugars and nitrate ions, as well as concentration of most important glycosides, such as stevioside and rebaudioside A.

## 2. Results

### 2.1. Weights of the *Stevia rebaudiana* Plants and Their Constituents Grown Using Different Nitrogen Fertilisation Treatments

After harvesting the *Stevia rebaudiana* plants, all the plants were weighed, and then their constituents (leaves, shoots, and plant waste) were weighed. The results of this analysis are presented in Table 1.

The average weight of the stevia plant was 0.206 kg. U50, U100, U150, N100 and N150 were characterised by greater weight than the average. The highest weight of the stevia plant was measured in the U100. C was characterised by the lowest weight, which was 33% lower than the average weight assessed for all the samples. U50, U100, U150, N100 and N150 were characterised by a leaf weight higher (0.132–0.149 kg) than the average (0.123 kg). The control sample also had the lowest leaf weight: just 62% of the average leaf weight of all the stevia samples analysed in the study. The average shoot weight of stevia plants was equal to 0.073 kg, and the lowest weight was, once again, determined in C (0.056 kg). N150 (0.086 kg), U50 (0.077 kg), U100 (0.088 kg), and U150 (0.084 kg) had shoot

weights higher than average. The weight of the plant waste (dried and sick leaves) was greatest in S150, N50 and U50, while it was lowest in C. Data about the weight of all the plants and various parts of the plant material were then used to calculate the percentage that a particular part of the plant constituted in the whole plant material gathered from the experimental field. These data are presented in Table 2.

**Table 1.** Weight of the stevia plants grown with different nitrogen fertilisation treatments.

Sample <sup>1</sup>	Single Plant Weight [kg]	Plant Leaf Weight [kg]	Plant Shoot Weight [kg]	Plant Waste Weight [kg]
C	0.137 ± 0.059 d	0.077 ± 0.029 e	0.056 ± 0.031 c	0.005 ± 0.008 d
N50	0.180 ± 0.083 c	0.102 ± 0.045 d	0.064 ± 0.032 bc	0.014 ± 0.015 ab
N100	0.211 ± 0.065 abc	0.132 ± 0.045 abc	0.070 ± 0.024 abc	0.009 ± 0.010 bcd
N150	0.243 ± 0.073 a	0.148 ± 0.046 a	0.086 ± 0.031 a	0.009 ± 0.012 bcd
S50	0.183 ± 0.068 c	0.110 ± 0.040 cd	0.065 ± 0.030 bc	0.008 ± 0.010 bcd
S100	0.196 ± 0.080 bc	0.120 ± 0.050 bcd	0.070 ± 0.031 abc	0.006 ± 0.007 cd
S150	0.206 ± 0.081 abc	0.117 ± 0.048 cd	0.072 ± 0.037 abc	0.018 ± 0.016 a
U50	0.221 ± 0.088 abc	0.132 ± 0.059 abc	0.077 ± 0.033 ab	0.012 ± 0.015 abc
U100	0.244 ± 0.075 a	0.149 ± 0.046 a	0.088 ± 0.031 a	0.007 ± 0.007 cd
U150	0.238 ± 0.085 ab	0.146 ± 0.049 ab	0.084 ± 0.037 a	0.009 ± 0.009 bcd
Total average	0.206 ± 0.082	0.123 ± 0.051	0.073 ± 0.033	0.010 ± 0.012

<sup>1</sup> Values are expressed as the mean (n = 30) ± standard deviation. Mean values with different letters (a, b, c, d, e) within the same column are significantly different ( $\alpha = 0.05$ ) according to Duncan's test. Abbreviations are as follows: C—stevia plants grown without the addition of nitrogen fertiliser; N50, N100, N150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of ammonium nitrate) per ha of the field; S50, S100, S150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of ammonium sulfate) per ha of the field; U50, U100, U150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of urea) per ha of the field.

**Table 2.** Percentage of various parts of the yield of stevia plants grown with different nitrogen fertilisation treatments.

Sample <sup>1</sup>	Leaf Mass Fraction [%]	Shoot Mass Fraction [%]	Plant Waste Fraction [%]
C	55.68 ± 9.85 abc	40.50 ± 9.73 a	3.81 ± 1.75 c
N50	56.94 ± 6.23 bc	35.46 ± 6.31 ab	7.59 ± 4.87 ab
N100	62.62 ± 7.76 a	33.27 ± 6.99 b	4.11 ± 2.35 bc
N150	60.98 ± 5.59 ab	35.39 ± 5.05 ab	3.63 ± 2.53 c
S50	60.11 ± 6.09 ab	35.50 ± 5.61 ab	4.39 ± 2.21 bc
S100	61.12 ± 4.95 ab	35.56 ± 5.00 ab	3.23 ± 1.60 c
S150	56.55 ± 9.92 c	34.90 ± 5.70 b	8.55 ± 4.10 a
U50	59.68 ± 6.57 abc	34.77 ± 6.36 ab	5.55 ± 3.18 bc
U100	61.13 ± 5.90 ab	36.02 ± 5.19 ab	2.84 ± 1.80 c
U150	60.99 ± 6.58 ab	35.26 ± 5.75 ab	3.74 ± 1.46 c
Total average	59.58 ± 7.28	35.66 ± 6.36	4.74 ± 3.20

<sup>1</sup> Values are expressed as the mean (n = 30) ± standard deviation. Mean values with different letters (a, b, c) within the same column are significantly different ( $\alpha = 0.05$ ) according to Duncan's test. Abbreviations are as follows: C—stevia plants grown without the addition of nitrogen fertiliser; N50, N100, N150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of ammonium nitrate) per ha of the field; S50, S100, S150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of ammonium sulfate) per ha of the field; U50, U100, U150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of urea) per ha of the field.

Leaves constituted 55.68% of the total weight of C, while in N100, N150, S50, S100, U100, and U150, the ratio of leaf weight to plant weight was above 60%, ranging from 60.11 to 62.62%, with the highest ratio observed for N100. The percentage of shoot weight was greatest for C (40.50%) and lowest for N100 (33.27%). The ratio of plant waste in total weight of the plant ranged from 2.84% to 8.55%. The lowest percentage of plant waste was found in U100, while the highest was observed in S150 and N50. Data from Table 1 and the total area of the experimental field were used to calculate the yield of stevia plants and

the yield of particular parts of stevia plants (leaves, shoots and plant waste), as shown in Table 3.

**Table 3.** Yield of the stevia plants grown with different nitrogen fertilisation treatments.

Sample <sup>1</sup>	Yield of Stevia Plant [kg·ha <sup>-1</sup> ]	Yield of Stevia Leaves [kg·ha <sup>-1</sup> ]	Yield of Stevia Shoots [kg·ha <sup>-1</sup> ]	Yield of Stevia Plant Waste [kg·ha <sup>-1</sup> ]
C	13,770 ± 2010 b	7630 ± 400 c	5570 ± 1210 c	530 ± 230 c
N50	18,570 ± 2490 ab	10,630 ± 1200 b	6530 ± 1140 b	1400 ± 410 a
N100	21,100 ± 980 a	13,230 ± 310 a	7000 ± 960 a	870 ± 400 ab
N150	24,330 ± 2510 a	14,830 ± 1630 a	8600 ± 1310 a	900 ± 460 ab
S50	18,300 ± 1770 ab	11,030 ± 1010 b	6500 ± 610 b	800 ± 200 b
S100	19,630 ± 3660 ab	12,030 ± 1780 ab	6970 ± 1360 ab	630 ± 120 bc
S150	20,630 ± 3550 a	11,700 ± 2690 ab	7200 ± 1410 ab	1730 ± 620 a
U50	22,130 ± 4950 a	13,200 ± 2270 a	7700 ± 1270 ab	1230 ± 400 a
U100	24,370 ± 4900 a	14,900 ± 2860 a	8770 ± 1060 a	700 ± 170 b
U150	23,870 ± 3610 a	14,530 ± 1530 a	8400 ± 1220 a	870 ± 340 ab
<b>Total average</b>	<b>20,670 ± 4390</b>	<b>12,370 ± 2940</b>	<b>7320 ± 1700</b>	<b>970 ± 690</b>

<sup>1</sup> Values are expressed as the mean (n = 30) ± standard deviation. Mean values with different letters (a, b, c) within the same column are significantly different ( $\alpha = 0.05$ ) according to Duncan's test. Abbreviations are as follows: C—stevia plants grown without the addition of nitrogen fertiliser; N50, N100, N150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of ammonium nitrate) per ha of the field; S50, S100, S150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of ammonium sulfate) per ha of the field; U50, U100, U150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of urea) per ha of the field.

Yield of stevia plants ranged from 13,370 kg·ha<sup>-1</sup> to 24,370 kg·ha<sup>-1</sup>. The lowest yield was calculated for C, while the highest was for U100. Similarly, the lowest yield of stevia leaves was found for C, and the highest yield of stevia leaves was determined for U50, U100, U150, N150 and N100. Unsurprisingly, the same pattern was observed for the yield of stevia shoots. Regarding the yield of stevia plant waste, C was once again characterised by the lowest yield, but samples with the greatest yield changed by a small margin, as the S150, N50, and U50 were characterised by the greatest yield of plant waste.

## 2.2. Biometrics of the *Stevia rebaudiana* Grown Using Different Fertilisation Treatments

The basic biometrics of *Stevia rebaudiana* plants, such as the total height of the plant, lateral width of the plant at the level of two-thirds of plant height, number of shoots and number of leaves on the lowest lateral shoot, were measured during the day of the harvest. The results of these analyses are presented in Table 4.

**Table 4.** Biometrics of stevia plants grown with different nitrogen fertilisation treatments.

Sample <sup>1</sup>	Plant Height [cm]	Lateral Width [cm]	Number of Shoots	Number of Leaves on the Lowest Lateral Shoot
C	46.42 ± 6.03 b	26.61 ± 4.12 d	8.44 ± 2.09 c	22.67 ± 4.95 c
N50	56.06 ± 7.81 a	29.44 ± 4.71 bc	10.17 ± 3.30 abc	31.00 ± 8.13 ab
N100	58.44 ± 10.88 a	29.39 ± 3.97 bc	8.72 ± 2.82 c	30.89 ± 7.58 ab
N150	59.42 ± 10.31 a	28.83 ± 3.90 cd	10.50 ± 4.01 abc	34.89 ± 17.66 a
S50	57.58 ± 9.57 a	30.22 ± 3.84 abc	13.61 ± 3.82 a	28.33 ± 6.11 bc
S100	58.00 ± 6.78 a	29.50 ± 3.73 bc	9.11 ± 2.90 bc	28.44 ± 6.16 abc
S150	58.61 ± 8.73 a	31.11 ± 3.27 abc	11.28 ± 4.01 abc	29.67 ± 8.93 ab
U50	59.50 ± 8.16 a	31.06 ± 3.32 abc	13.11 ± 3.51 ab	28.22 ± 4.05 bc
U100	56.50 ± 6.72 a	32.39 ± 3.33 a	13.06 ± 4.53 ab	28.78 ± 6.44 abc

Table 4. Cont.

Sample <sup>1</sup>	Plant Height [cm]	Lateral Width [cm]	Number of Shoots	Number of Leaves on the Lowest Lateral Shoot
U150	56.63 ± 9.20 a	32.00 ± 3.80 ab	11.67 ± 3.92 abc	29.17 ± 7.39 ab
<b>Total average</b>	<b>56.63 ± 9.20</b>	<b>30.06 ± 4.06</b>	<b>10.97 ± 3.76</b>	<b>29.21 ± 8.80</b>

<sup>1</sup> Values are expressed as the mean (n = 18) ± standard deviation. Mean values with different letters (a, b, c, d) within the same column are significantly different ( $\alpha = 0.05$ ) according to Duncan's test. Abbreviations are as follows: C—stevia plants grown without the addition of nitrogen fertiliser; N50, N100, N150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of ammonium nitrate) per ha of the field; S50, S100, S150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of ammonium sulfate) per ha of the field; U50, U100, U150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of urea) per ha of the field.

The average height of the *Stevia rebaudiana* plants analysed in this study was equal to 56.63 cm, but almost all fertilised plants were higher than that. The height of fertilised plants ranged from 56.06 cm to 59.50 cm, with the lowest for N50 and the highest for U50, while the height of C was 46.42 cm. C was characterised by the narrowest lateral width of 26.61 cm. Samples fertilised with urea (U50, U100 and U150) were characterised by the widest lateral width (31.06–32.39 cm). C and N100 had the smallest number of shoots (8.44 and 8.72, respectively), which was much smaller than the higher number of shoots in the samples, determined for S50 (13.61), U50 (13.11) and U100 (13.06). The average number of leaves on the lowest lateral shoot was equal to 29.2. C was characterised by the smallest number of leaves on the lowest lateral shoot (22.67). The greatest number of leaves was in plants fertilised with ammonium nitrate (N150), with over 34 leaves on a shoot.

### 2.3. Dry Mass and Concentration of Elements in *Stevia rebaudiana* Grown Using Different Fertilisation Treatments

The concentration of dry mass in *Stevia rebaudiana* leaves was assessed twice, once during July and once at the harvest, during September. Data are shown in Table 5.

Table 5. Dry mass in the stevia leaves of stevia plants grown with different nitrogen fertilisation treatments.

Sample <sup>1</sup>	Dry Mass Content in Stevia Leaves [%]	
	July	September
C	24.47 ± 4.06 a	28.36 ± 3.47 a
N50	23.59 ± 2.42 a	29.74 ± 3.90 a
N100	26.10 ± 5.21 a	28.98 ± 1.84 a
N150	23.52 ± 1.42 a	27.44 ± 3.26 a
S50	23.80 ± 3.78 a	29.76 ± 2.21 a
S100	23.37 ± 2.93 a	28.64 ± 2.35 a
S150	23.62 ± 3.00 a	28.24 ± 2.18 a
U50	24.41 ± 2.25 a	30.04 ± 5.06 a
U100	22.97 ± 3.50 a	28.59 ± 5.46 a
U150	23.99 ± 1.99 a	28.05 ± 2.79 a
<b>Total average</b>	<b>23.98 ± 3.18</b>	<b>28.78 ± 3.72</b>

<sup>1</sup> Values are expressed as the mean (n = 9) ± standard deviation. Mean values with letters (a) within the same column are significantly different ( $\alpha = 0.05$ ) according to Duncan's test. Abbreviations are as follows: C—stevia plants grown without the addition of nitrogen fertiliser; N50, N100, N150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of ammonium nitrate) per ha of the field; S50, S100, S150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of ammonium sulfate) per ha of the field; U50, U100, U150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of urea) per ha of the field.

The average dry mass content in the stevia leaves in July was 23.98%, while in September, it increased by 4.80% to 28.78%. The concentration in July ranged from 22.97% for U100 to 26.10% for N100, while the average dry mass content in September was 28.78%. The increase in dry mass content between July and September ranged from 2.88% to 6.15%, with the smallest increase noted for N100 and the largest for N50.

In stevia leaves during the same periods (July and harvest in September), the concentration of various elements such as calcium, magnesium, phosphorus and potassium was determined. Data about the concentration of particular elements is shown in Table 6.

**Table 6.** Element concentration in stevia leaves of stevia plants grown with different nitrogen fertilisation treatments.

Sample <sup>1</sup>	Calcium		Magnesium		Phosphorus		Potassium	
	[mg·100 g <sup>-1</sup> of d.m.]							
	July	September	July	September	July	September	July	September
C	770.89 ± 49.90 d	993.67 ± 96.77 c	168.89 ± 13.42 ab	229.44 ± 14.26 b	119.60 ± 14.30 b	177.10 ± 18.18 bc	2490.33 ± 205.89 b	2938.89 ± 248.01
N50	794.44 ± 96.65 d	969.44 ± 89.39 bc	159.44 ± 17.66 b	218.89 ± 26.49 b	143.50 ± 11.54 a	173.49 ± 21.45 c	2802.78 ± 112.11 a	3018.11 ± 258.45 ab
N100	816.67 ± 108.97 d	1069.44 ± 108.89 ab	153.33 ± 10.52 b	248.33 ± 26.93 a	146.28 ± 11.25 a	153.08 ± 17.45 d	2468.11 ± 224.53 b	3034.78 ± 257.80 ab
N150	890.33 ± 43.12 bcd	1188.44 ± 125.18 a	156.11 ± 15.60 b	218.89 ± 27.81 b	108.21 ± 6.45 bc	140.58 ± 14.25 de	2616.67 ± 307.97 ab	2797.22 ± 138.66 ab
S50	836.11 ± 45.26 d	994.44 ± 116.91 b	173.33 ± 20.87 a	259.44 ± 27.91 a	140.44 ± 13.60 a	180.86 ± 10.56 b	2521.00 ± 225.03 b	3216.78 ± 173.46 a
S100	861.11 ± 33.33 cd	1098.11 ± 141.23 ab	168.89 ± 27.36 ab	246.67 ± 18.24 ab	131.53 ± 11.92 ab	201.01 ± 9.92 b	2457.00 ± 270.82 b	3050.00 ± 260.49 ab
S150	991.67 ± 46.77 b	1162.00 ± 149.53 a	175.56 ± 14.46 a	240.00 ± 16.34 ab	100.72 ± 9.49 c	148.79 ± 12.05 d	2275.00 ± 222.42 c	2841.78 ± 100.66 ab
U50	887.56 ± 79.45 bcd	863.89 ± 58.03 c	183.33 ± 27.36 a	214.44 ± 25.65 a	128.09 ± 9.05 ab	218.77 ± 8.28 a	2497.33 ± 262.11 b	3048.67 ± 182.52 ab
U100	976.44 ± 111.97 bc	1076.44 ± 132.36 ab	160.56 ± 18.45 ab	222.22 ± 18.15 b	116.69 ± 7.05 b	158.63 ± 9.66 d	2534.78 ± 288.41 ab	3183.33 ± 178.66 a
U150	1144.44 ± 298.64 a	1119.44 ± 110.64 a	152.78 ± 24.18 b	227.22 ± 20.73 b	104.62 ± 8.48 bc	131.13 ± 9.42 e	2298.67 ± 320.36 bc	2534.78 ± 180.53 b
<b>Total average</b>	<b>896.97 ± 105.14</b>	<b>1053.53 ± 146.57</b>	<b>165.22 ± 20.94</b>	<b>232.56 ± 28.10</b>	<b>123.97 ± 11.24</b>	<b>168.34 ± 14.04</b>	<b>2496.17 ± 273.53</b>	<b>2966.43 ± 206.73</b>

<sup>1</sup> Values are expressed as the mean (n = 9) ± standard deviation. Mean values with different letters (a, b, c, d, e) within the same column are significantly different ( $\alpha = 0.05$ ) according to Duncan's test. Abbreviations are as follows: C—stevia plants grown without the addition of nitrogen fertiliser; N50, N100, N150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of ammonium nitrate) per ha of the field; S50, S100, S150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of ammonium sulfate) per ha of the field; U50, U100, U150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of urea) per ha of the field.

In most of the analysed samples, the concentration of calcium increased from July to September, with the exception of U50, where it decreased from 887.56 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m. to 863.89 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m. and U150, where it decreased from 1144.44 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m. to 1119.44 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m. The highest concentration of calcium in stevia leaves in July was detected in U150 and the lowest in C (770.89 mg per 100 g of dry mass), while the highest concentration of calcium in September was found in N150, S150 and U150 (1119.44–1188.44 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m.). The concentration of magnesium in the analysed samples also increased from July to September. In July, the concentration of magnesium in the samples ranged from 152.78 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m. (U150) to 183.33 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m. (U50). In September, magnesium content ranged from 214.44 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m. in U50 to 259.44 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m. in S50. The phosphorus content in the samples gathered in September was greater than the phosphorus content in July. The lowest concentration of phosphorus in July was determined for S150 (100.72 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m.), while the highest was determined for N100 (146.28 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m.). In September, U50 was characterised by the greatest concentration of phosphorus (218.77 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m.), while the lowest content of phosphorus in September was detected in U150 (131.13 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m.). The concentration of potassium increased in the samples from July to September. In July, the lowest concentration of potassium was detected in S150 (2275 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m.), while the



highest was determined in N50 (2802.78 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m.). In September, S150 was still characterised with the lowest concentration of potassium (2534.78 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m.), while the highest concentration of potassium was detected in S50 (3216.78 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m.). Additional analyses were performed, and during the same periods (July and September), the concentration of ascorbic acid, phenolic compounds, reducing sugars and nitrate ions in stevia leaves was determined. Data about the concentration of these particular components is shown in Table 7.

**Table 7.** Concentration of ascorbic acids, phenolic compounds, reducing sugars and nitrate ions in stevia leaves of stevia plants grown with different nitrogen fertilisation treatments.

Sample <sup>1</sup>	Ascorbic Acid		Phenolic Compounds		Reducing Sugars		Nitrate Ions (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	
	[mg·100 g <sup>-1</sup> of f.m.]							
	July	September	July	September	July	September	July	September
C	110.12 ± 5.24 c	135.42 ± 16.22 b	262.21 ± 23.35 b	170.52 ± 18.04 d	1.07 ± 0.14 a	2.30 ± 0.29 a	1501.11 ± 393.81 b	890.33 ± 263.28 a
N50	128.24 ± 26.77 ab	148.13 ± 10.65 ab	249.66 ± 28.44 b	251.72 ± 25.54 c	0.89 ± 0.11 ab	2.41 ± 0.28 a	1657.44 ± 331.26 b	952.44 ± 381.94 a
N100	114.14 ± 6.05 bc	142.81 ± 11.30 ab	286.57 ± 28.94 ab	295.56 ± 26.15 b	0.94 ± 0.25 ab	2.31 ± 0.24 a	2116.78 ± 431.57 ab	1246.56 ± 374.77 a
N150	109.27 ± 6.90 c	135.89 ± 10.53 b	326.30 ± 30.70 a	348.58 ± 28.02 a	0.91 ± 0.11 ab	1.99 ± 0.27 a	2004.67 ± 423.43 ab	1225.67 ± 357.26 a
S50	124.5 ± 8.50 abc	137.94 ± 10.11 ab	203.07 ± 37.02 c	251.57 ± 22.63 c	1.04 ± 0.15 a	2.09 ± 0.21 a	1552.11 ± 341.55 b	962.11 ± 463.64 a
S100	118.48 ± 13.28 bc	142.67 ± 8.36 ab	231.93 ± 31.97 bc	272.43 ± 23.44 bc	0.94 ± 0.09 ab	2.08 ± 0.25 a	1911.44 ± 207.36 ab	1027.33 ± 389.75 a
S150	111.12 ± 6.45 c	149.28 ± 7.95 a	309.37 ± 35.52 a	293.96 ± 18.92 b	0.84 ± 0.21 b	2.03 ± 0.37 a	1764.67 ± 511.72 ab	1372.44 ± 406.16 a
U50	135.54 ± 27.56 a	138.57 ± 23.64 ab	236.21 ± 43.63 bc	304.51 ± 37.92 ab	0.98 ± 0.24 ab	1.86 ± 0.49 a	1621.67 ± 449.14 b	881.44 ± 348.14 a
U100	120.50 ± 12.44 bc	140.54 ± 6.45 ab	346.07 ± 37.43 a	328.77 ± 38.36 a	0.92 ± 0.19 ab	2.02 ± 0.37 a	2329.44 ± 300.93 a	1045.22 ± 436.89 a
U150	112.94 ± 5.46 bc	137.04 ± 6.82 ab	302.31 ± 40.81 a	172.43 ± 21.44 d	0.99 ± 0.06 ab	2.07 ± 0.39 a	1765.67 ± 433.04 ab	1295.78 ± 427.80 a
<b>Total average</b>	<b>118.49 ± 16.20</b>	<b>140.83 ± 12.36</b>	<b>275.37 ± 38.16</b>	<b>269.00 ± 46.08</b>	<b>0.95 ± 0.17</b>	<b>2.12 ± 0.69</b>	<b>1822.50 ± 343.74</b>	<b>1089.93 ± 348.06</b>

<sup>1</sup> Values are expressed as the mean (n = 9) ± standard deviation. Mean values with different letters (a, b, c, d) within the same column are significantly different (α = 0.05) according to Duncan's test. Abbreviations are as follows: C—stevia plants grown without the addition of nitrogen fertiliser; N50, N100, N150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of ammonium nitrate) per ha of the field; S50, S100, S150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of ammonium sulfate) per ha of the field; U50, U100, U150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of urea) per ha of the field.

#### 2.4. Concentration of Ascorbic Acid, Phenolic Compounds, Reducing Sugars and Nitrate Ions in *Stevia rebaudiana* Grown Using Different Fertilisation Treatments

The lowest concentration of ascorbic acid in July was determined for S150, N150 and C (109.27–111.12 mg·100 g<sup>-1</sup> f.m.), while the highest was for U50. The concentration of ascorbic acid in September was higher than in July for all the samples. The greatest concentration of ascorbic acid in September was detected in S150 (149.28 mg·100 g<sup>-1</sup> f.m.), and the lowest was in C and N150 (135.42 mg·100 g<sup>-1</sup> f.m. and 135.89 mg·100 g<sup>-1</sup> f.m., respectively). U100 was characterised by the greatest concentration of phenolic compounds in July (346.07 mg·100 g<sup>-1</sup> f.m.), while the content of these compounds was lowest in S50 (203.07 mg·100 g<sup>-1</sup> f.m.). In September, the lowest concentration of phenolic compounds was determined in C (170.52 mg·100 g<sup>-1</sup> f.m.) and U150 (172.43 mg·100 g<sup>-1</sup> f.m.) and the highest for N150 (348.58 mg·100 g<sup>-1</sup> f.m.). Most of the samples in July were characterised by very similar reducing sugar content, with the exception of C, which had the highest concentration of 1.07 g·100 g<sup>-1</sup> f.m. and the lowest (of 0.84 g·100 g<sup>-1</sup> f.m.) for S150. In

September, all the samples were characterised by statistically similar concentrations of reducing sugars, ranging from 1.86 g·100 g<sup>-1</sup> f.m. in U50 to 2.41 g·100 g<sup>-1</sup> f.m. in N50. In July, the highest concentration of nitrate ions was determined for U100 (2329.44 mg·kg<sup>-1</sup> d.m.), while the lowest was noted for C (1501.11 mg·kg<sup>-1</sup> d.m.). The concentration of nitrate ions in September was statistically similar for all the analysed samples and ranged from 890.33 mg·kg<sup>-1</sup> d.m. for C to 1372.44 mg·kg<sup>-1</sup> d.m. for S150. Results of the next analysis of the stevia leaves, concerning the concentration of carotenoids and chlorophylls (A and B), are presented in Table 8.

**Table 8.** Concentration of chlorophylls and carotenoids in stevia leaves of stevia plants grown with different nitrogen fertilisation treatments.

Sample <sup>1</sup>	Chlorophyll A		Chlorophyll B		Chlorophyll A + B		Carotenoid	
	[mg g <sup>-1</sup> of f.m.]							
	July	September	July	September	July	September	July	September
C	0.87 ± 0.25 ab	0.77 ± 0.14 ab	0.37 ± 0.13 a	0.36 ± 0.02 bc	1.23 ± 0.35 ab	1.13 ± 0.12 ab	2.52 ± 0.59 a	2.26 ± 0.33 a
N50	0.66 ± 0.13 b	0.66 ± 0.11 b	0.31 ± 0.15 a	0.37 ± 0.11 bc	0.98 ± 0.27 b	1.03 ± 0.21 ab	2.16 ± 0.39 a	2.07 ± 0.54 a
N100	0.82 ± 0.18 ab	0.80 ± 0.25 a	0.35 ± 0.18 a	0.51 ± 0.19 a	1.17 ± 0.34 ab	1.31 ± 0.39 a	2.55 ± 0.32 a	2.58 ± 0.70 a
N150	0.76 ± 0.15 ab	0.84 ± 0.22 a	0.35 ± 0.13 a	0.43 ± 0.14 ab	1.11 ± 0.27 ab	1.27 ± 0.34 ab	2.34 ± 0.50 a	2.64 ± 0.74 a
S50	0.75 ± 0.17 ab	0.78 ± 0.13 a	0.33 ± 0.15 a	0.45 ± 0.12 ab	1.08 ± 0.32 ab	1.22 ± 0.20 ab	2.36 ± 0.56 a	2.50 ± 0.44 a
S100	0.84 ± 0.21 ab	0.71 ± 0.27 ab	0.39 ± 0.15 a	0.28 ± 0.15 c	1.23 ± 0.34 ab	0.99 ± 0.40 b	2.44 ± 0.58 a	2.25 ± 0.77 a
S150	0.91 ± 0.31 ab	0.74 ± 0.20 ab	0.41 ± 0.10 a	0.45 ± 0.16 ab	1.32 ± 0.38 ab	1.19 ± 0.31 ab	2.68 ± 0.74 a	2.46 ± 0.58 a
U50	0.98 ± 0.19 a	0.75 ± 0.15 ab	0.43 ± 0.15 a	0.40 ± 0.11 abc	1.41 ± 0.31 a	1.15 ± 0.25 ab	2.60 ± 0.45 a	2.24 ± 0.49 a
U100	0.90 ± 0.26 ab	0.86 ± 0.11 a	0.38 ± 0.17 a	0.46 ± 0.07 ab	1.28 ± 0.40 ab	1.32 ± 0.10 a	2.53 ± 0.69 a	2.65 ± 0.30 a
U150	0.89 ± 0.30 ab	0.83 ± 0.21 a	0.42 ± 0.14 a	0.44 ± 0.12 ab	1.31 ± 0.38 ab	1.27 ± 0.30 ab	2.51 ± 0.75 a	2.53 ± 0.48 a
<b>Total average</b>	<b>0.84 ± 0.23</b>	<b>0.77 ± 0.19</b>	<b>0.38 ± 0.14</b>	<b>0.41 ± 0.14</b>	<b>1.21 ± 0.34</b>	<b>1.19 ± 0.29</b>	<b>2.47 ± 0.56</b>	<b>2.42 ± 0.56</b>

<sup>1</sup> Values are expressed as the mean (n = 9) ± standard deviation. Mean values with different letters (a, b, c) within the same column are significantly different ( $\alpha = 0.05$ ) according to Duncan's test. Abbreviations are as follows: C—stevia plants grown without the addition of nitrogen fertiliser; N50, N100, N150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of ammonium nitrate) per ha of the field; S50, S100, S150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of ammonium sulfate) per ha of the field; U50, U100, U150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of urea) per ha of the field.

#### 2.5. Concentration of Chlorophyll and Carotenoids in *Stevia rebaudiana* Grown Using Different Fertilization Treatments

The lowest concentration of chlorophyll A in July was detected in N50 (0.66 mg·g<sup>-1</sup> f.m.), while the highest was detected in U50 (0.98 mg·g<sup>-1</sup> f.m.). Most samples gathered in September were characterised by a lower content of chlorophyll A, with the lowest detected in N50 (0.66 mg·g<sup>-1</sup> f.m.) and highest in U100 (0.86 mg·g<sup>-1</sup> f.m.). Samples gathered in July were characterised by statistically similar concentrations of chlorophyll B, while in the samples gathered in September, N100 was characterised with the greatest concentration of chlorophyll B (0.51 mg·g<sup>-1</sup> f.m.), while S100 contains almost two times lower concentration of this compound (0.28 mg·g<sup>-1</sup> f.m.). The concentration of combined chlorophyll forms (chlorophyll A + B) shows that the average concentration of chlorophylls in July and September was almost the same (1.21 mg and 1.19 mg·g<sup>-1</sup> f.m.). The concentration of carotenoids was at the same level in all of the samples in July and September.

#### 2.6. Concentration of Steviosides in *Stevia rebaudiana* Grown Using Different Fertilisation Treatments

The final analysis conducted in this study determined the concentration of steviosides (in the form of stevioside and rebaudioside A). The results of this analysis are shown in Table 9.

**Table 9.** Concentration of steviosides in stevia leaves of stevia plants grown with different nitrogen fertilisation treatments.

Sample <sup>1</sup>	Stevioside	Rebaudioside A
	[mg·100 g <sup>-1</sup> of d.m.]	
C	135.14 ± 6.33 fg	352.85 ± 6.33 g
N50	140.50 ± 5.32 e	785.20 ± 8.96 ef

Table 9. Cont.

Sample <sup>1</sup>	Stevioside	Rebaudioside A
	[mg·100 g <sup>-1</sup> of d.m.]	
N100	156.6 ± 1.12 d	1093.08 ± 106.85 cd
N150	134.11 ± 1.65 fg	1229.89 ± 18.42 c
S50	111.69 ± 1.53 h	602.18 ± 82.60 fg
S100	214.26 ± 11.45 b	1493.53 ± 133.78 b
S150	262.36 ± 17.13 a	2186.62 ± 390.54 a
U50	108.91 ± 0.70 h	817.05 ± 54.46 ef
U100	122.53 ± 6.54 gh	935.04 ± 79.86 de
U150	182.46 ± 8.59 c	490.24 ± 27.96 g
<b>Total average</b>	<b>156.86 ± 17.99</b>	<b>998.57 ± 234.99</b>

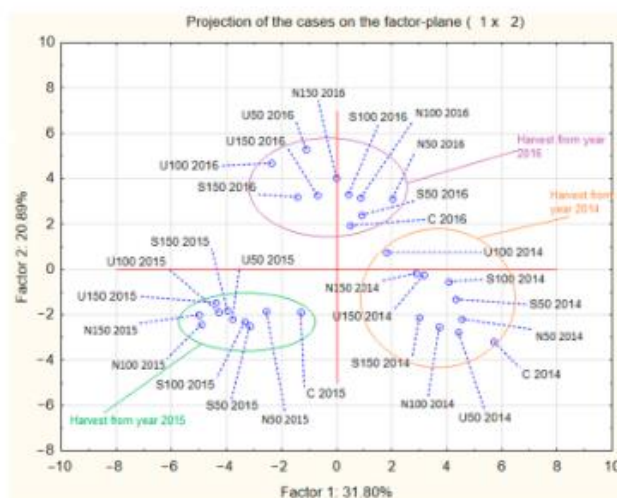
<sup>1</sup> Values are expressed as the mean (n = 9) ± standard deviation. Mean values with different letters (a, b, c, d, e, f, g, h) within the same column are significantly different ( $\alpha = 0.05$ ) according to Duncan's test. Abbreviations are as follows: C—stevia plants grown without the addition of nitrogen fertiliser; N50, N100, N150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of ammonium nitrate) per ha of the field; S50, S100, S150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of ammonium sulfate) per ha of the field; U50, U100, U150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of urea) per ha of the field.

The concentration of stevioside in the stevia leaves ranged from 108.91 mg to 262.36 mg per 100 g of stevia leaves dry mass, with an average of 156.86 mg. The lowest concentration of stevioside was detected in U50, and the highest was detected in S150. The concentration of rebaudioside A was significantly greater than the concentration of stevioside. On average, the analysed samples contained 998.57 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m. of rebaudioside A, with the greatest concentration detected in S150 (2186.62 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m.) and the lowest in C (352.85 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m.).

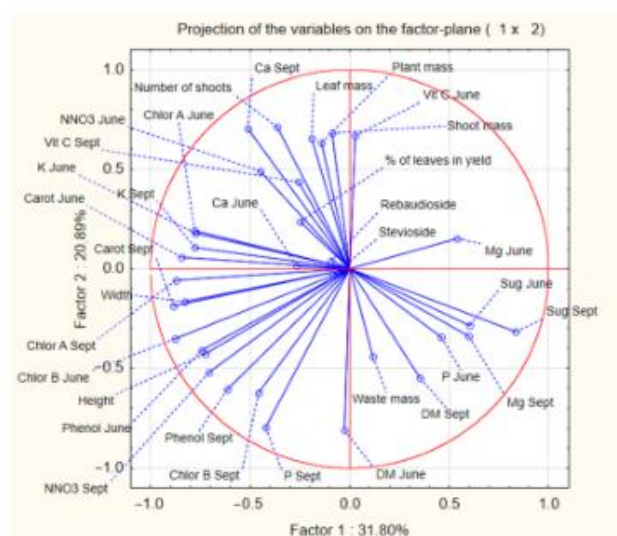
#### 2.7. Principal Component Analysis of the Data Gathered throughout the Study

Principal component analysis (PCA) was conducted on all the mean values of the *Stevia rebaudiana* characteristics gathered throughout the study. The results of the PCA are presented in Figures 1 and 2. The main goal of the PCA analysis was to determine whether the main differences between analysed samples were due to the different fertilisation treatments or due to the year in which stevia plants were planted, as well as to identify any clear influences of various characteristics on other parameters in the analysed samples.

The results of PCA analysis indicated that the year of harvest was more significant than the type of fertiliser used during the cultivation of *Stevia rebaudiana*. Total plant mass showed a positive correlation with the total mass of shoots and leaves but had a negative correlation with the total waste mass and concentration of dry mass. Plant height had an influence on the concentration of phenols, as the two parameters correlated positively. Few of the analysed parameters significantly influenced the total content of stevioside and rebaudioside A in stevia plants.



**Figure 1.** Projection of results of PCA analysis for the analysis of particular characteristics and composition of *Stevia rebaudiana* plants grown in Poland using different nitrogen fertilisation regimes. Abbreviations are as follows: C—stevia plants grown without the addition of nitrogen fertiliser; N50, N100, N150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of ammonium nitrate) per ha of the field; S50, S100, S150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of ammonium sulfate) per ha of the field; U50, U100, U150—stevia plants grown with the addition of 50/100/150 kg of N (in the form of urea) per ha of the field. Numbers 2014, 2015 and 2016 indicate data from the harvest of each particular year.



**Figure 2.** PCA analysis chart for parameters analysed in *Stevia rebaudiana* plants grown in Poland using different nitrogen fertilisation treatments. Abbreviations are as follows: Sept—data from leaves

gathered in September. June—data from leaves gathered in June. Ca—calcium content in leaves. Carot—carotenoid content in leaves. Chlor A/B—concentration of chlorophyll A or B. K—potassium content in leaves. DM—dry mass of the stevia leaves. Mg—magnesium content in leaves. NNO<sub>3</sub>—concentration of nitrate ions in leaves. P—phosphorus content in leaves. Phenol—concentration of phenolic compounds in leaves. Sug—concentration of reducing sugars in stevia leaves. Vit C—concentration of ascorbic acid in leaves.

### 3. Discussion

#### 3.1. Weight of the *Stevia rebaudiana* Plants and the Yield of the Cultivation of *Stevia* Plants

The acquired data shows that the plants grown on the fertilised field yielded a greater mass of stevia plants than the unfertilised sample (C) and were characterised by the highest yield of leaves, which are the primary reason for *Stevia rebaudiana* plantation. This finding is confirmed by various other researchers, such as Mahajan and Pal (2022), Sun et al. (2020) and Inugraha et al. (2014) [18–20]. These results are rather typical, as nitrogen is an element which can significantly impact plant metabolism and is one of the key components during all plant growth stages [21]. It was also unsurprising to find that the weight of the plants and shoots in samples fertilised with the highest dosage of nitrogen was also the highest for the same reason. The yield of the stevia plants was not far lower than the yield of *Stevia rebaudiana* planted in the warmer climate of Ethiopia, which ranged from 16,951 to 26,388 kg·ha<sup>-1</sup>, depending on the spacing between the plants [22]. However, it is necessary to acknowledge the fact that research conducted in Ethiopia did not involve any nitrogen fertilisation. Therefore, it would be more appropriate to compare this data to C, which was characterised by a lower yield of 13,770 kg·ha<sup>-1</sup>. On the other hand, data from the experiment conducted by Shivani et al. (2019) in India, a country in which the stevia plants are commercially grown, at a latitude closer to its natural habitat (25°39′42″ N compared to 19°–27° S of Paraguay) than Poland (49°–54°50′ N, with Psary and Wrocław at ~51.06° N) shows, that the yield of stevia leaves was equal to 5150–7040 kg/ha (dependent on the plant spacing) with the nitrogen fertilisation of 50 kg N per ha and 6280–10,540 kg·ha<sup>-1</sup> with the nitrogen fertilisation of 100 kg N per ha [23]. Data acquired in the study in Poland shows that it is possible to acquire an even greater yield of stevia leaves using 50 kg of N·ha<sup>-1</sup> than using 100 kg of N per ha in India. Additionally, the so-called ‘harvest index’ (ratio of leaves to the weight of the plant) of these plants was in the range of 39.33–43.67%, which was much lower than in our study. These data indicate that the amount of harvested plant material of *Stevia rebaudiana* grown in Poland could be on a similar level as in various other countries. The main differences in the stevia yield in Poland and in various other countries are most probably dictated by the large differences in temperature, as well as rainfall at these places (Tables 10 and 11). In Paraguay, temperatures of the months equivalent to the May–September period in the northern hemisphere (November–March) are between 27.2–29.6 °C, while in Poland, the average temperature in these months during the time of the study was in the range of 13.4–25.2 °C, which is significantly lower [24,25]. Data gathered by Warner (2022) have shown that stevia plants grown at a temperature of 26 °C, compared to the stevia plants grown at 17 °C were characterised by twice the height, almost three times longer branches and two times greater development rate (nodes per day), suggesting that the relatively low yield of the stevia grown in Poland might be due to lower temperatures [26]. Similarly, Paraguay receives a greater amount of rainfall during the months of stevia cultivation than Poland (116 mm of rainfall monthly compared to 52 mm of rainfall monthly during the study period) [24,25]. However, due to irrigation during periods of drought, the differences in the amount of available water might not be as crucial as the differences in the temperature during the growth of stevia.

**Table 10.** Temperature in the area of the stevia plantation during the time of the experiment and the average temperature in the previous years.

Month	Decade of the Month	Year 2014	Year 2015	Year 2016	Average Temperature in the Month during the Years 1981–2010
		[°C]			
May	1st 10-day period	11.4	13.3	15.4	14.2
	2nd 10-day period	12.2	13.0	15.5	
	3rd 10-day period	17.3	14.0	20.9	
	Monthly average	13.8	13.4	17.3	
June	1st 10-day period	18.4	18.1	21.1	17.0
	2nd 10-day period	16.6	16.4	18.5	
	3rd 10-day period	15.7	15.8	23.8	
	Monthly average	16.9	16.8	21.1	
July	1st 10-day period	20.5	20.5	20.5	19.2
	2nd 10-day period	22.5	20.3	20.1	
	3rd 10-day period	22.6	19.9	23.8	
	Monthly average	21.9	20.2	21.5	
August	1st 10-day period	21.7	27.2	20.4	18.5
	2nd 10-day period	17.4	25.2	19.7	
	3rd 10-day period	15.9	23.1	21.3	
	Monthly average	18.3	25.2	20.5	
September	1st 10-day period	17.2	17.1	21.2	13.9
	2nd 10-day period	18.6	18.8	19.3	
	3rd 10-day period	14.0	14.1	15.0	
	Monthly average	16.6	16.7	18.5	

**Table 11.** Level of rainfall in the area of stevia plantation during the time of the experiment and the average level of rainfall in the previous years.

Month	10-Day Period of the Month	Year 2014	Year 2015	Year 2016	Average Rainfall in the Month during the Years 1981–2010
		[mm of Rainfall]			
May	1st 10-day period	30.3	12.3	14.0	57.0
	2nd 10-day period	33.6	14.0	12.0	
	3rd 10-day period	42.8	0.5	0.0	
	Monthly average	106.7	26.8	26.0	
June	1st 10-day period	8.2	11.0	9.4	69.9
	2nd 10-day period	0.3	23.1	59.0	
	3rd 10-day period	15.4	32.2	0.8	
	Monthly average	23.9	66.3	69.2	
July	1st 10-day period	20.0	11.0	39.5	83.4
	2nd 10-day period	0.0	38.9	70.5	
	3rd 10-day period	26.1	3.3	24.5	
	Monthly average	46.1	53.2	134.5	
August	1st 10-day period	17.5	0.0	5.8	71.0
	2nd 10-day period	13.1	0.0	5.0	
	3rd 10-day period	35.0	2.1	13.3	
	Monthly average	65.6	2.1	24.1	
September	1st 10-day period	24.1	16.4	11.5	45.2
	2nd 10-day period	21.6	0.0	45.8	
	3rd 10-day period	14.3	0.0	0.0	
	Monthly average	60.0	16.4	57.3	

### 3.2. Biometrics of the *Stevia rebaudiana* Grown Using Different Fertilisation Treatments

It is common knowledge that proper nutrition of growing plants contributes to the increase in plant size and number of shoots and leaves, crucial parameters influencing the yield of herbaceous plants [27–31]. The conducted experiment demonstrates that the addition of just 50 kg of N per hectare can increase the height of the stevia plants by over 20% and appears necessary for cultivating stevia in Poland. However, plant height is not as important as the number of shoots and leaves, as leaves are the primary goal of stevia plantations. Additionally, thanks to the PCA analysis, it can be observed that while nitrogen addition did not consistently increase the number of shoots (C and N100 had statistically similar shoot levels), fertilisation enhanced the number of leaves on the lowest lateral shoots (the longest and oldest shoots of the plant, typically with the largest leaves) [32]. Interestingly, the amount of fertiliser used did not have as much influence on the various biometrics of stevia as the type of fertiliser used. Plants fertilised with ammonium nitrate were characterised with a lower number of shoots but a greater amount of leaves on the shoots than plants fertilised with ammonium sulfate or urea. Unfortunately, data from this study does not provide insight into the reasons for this observation, but this information can be an interesting avenue for future research. An experiment performed by Tadesse, mentioned earlier in Section 3.1, about the plantation of stevia in Ethiopia also measured various biometrics of stevia plants [22]. Plants grown in Ethiopia were characterised by lower plant height than stevia plants grown in Poland, which allowed for the acquisition of greater yield. This suggests that the increase in height of fertilised stevia plants analysed in this study might not necessarily be an advantage over C. However, another experiment performed by Baghat et al. in Jammu, India (32°74' N) also showed that plants fertilised with the addition of nitrogen were characterised with 13–38% greater height than the unfertilised control sample and a far greater amount of leaves (by 17–80%) [33]. Therefore, it seems reasonable to assume that fertilisation of *Stevia rebaudiana* plants with nitrogen might result in taller stevia plants, but most certainly will result in a greater amount of plant leaves, which are the main goal of stevia plantation and, therefore, would be recommended practice for the farmers.

### 3.3. Dry Mass and Concentration of Elements in *Stevia rebaudiana* Grown Using Different Fertilisation Treatments

The dry mass content in the leaves of stevia increased from July to September in all the samples. There appeared to be no difference in the dry mass content in leaves of stevia plants grown with the addition of nitrogen compared to those grown without it. Furthermore, the amount and type of fertiliser used did not significantly impact the dry mass content of the stevia leaves. However, the concentration of various elements (calcium, magnesium, phosphorus and potassium) differed significantly between the analysed samples. Both the fertilisation treatment and the time of the sample analysis (July and September) influenced the concentration of various elements. The concentration of each analysed element in September was higher than in July, which might be one of the factors influencing changes to the dry mass content of the stevia leaves. The concentration of calcium in the dried stevia leaves, which were gathered from the plants grown in La Serena, Chile (29°54' S), was equal to 1388.37 mg, which was 20–40% higher than the concentration of calcium in the samples grown in this study in Poland [34]. A different batch of stevia leaves, analysed by Tadhani and Subhash, grown in India in an undisclosed location, was characterised by a concentration of calcium closer to 1500 mg [35]. A comprehensive review by Lemus-Mondaca has shown that the concentration of calcium in stevia leaves ranges typically from 500 to 1500 mg per 100 g of dry leaves, indicating that the concentration of calcium in the stevia leaves grown in Poland contains an average concentration of calcium during September and rather low concentration of this element in July [36]. It should be mentioned that increasing the amount of fertiliser used always increased calcium concentration in the leaves, regardless of the type of fertiliser used or whether the leaves were analysed in July or September. The concentration of magnesium in stevia leaves,

with an average of 232.56 mg per 100 g of leaf dry mass in September, was far lower than the content of stevia leaves analysed by Tadhani and Subhash (~500 mg) and by Lemus-Mondaca et al. (2016) (867.79–1013.30 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m.) [34,35]. The review of various *Stevia rebaudiana* samples has shown that the magnesium content in stevia leaves can be as low as 349 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m., which is still higher than the magnesium content of leaves of stevia grown in Poland. The low concentration of magnesium in stevia leaves might be an indicator of various problems concerning *Stevia rebaudiana* cultivation in Poland, as it has been shown that magnesium content and bioavailability can relate to the production of steviol glycosides (with the high concentration of magnesium correlating positively with the concentration of steviosides) [36–38]. The concentration of phosphorus in stevia plants grown in this study was also lower (123.97 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m. in July, 168.34 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m. in September) than the phosphorus content in the Tadhani and Subhash stevia samples (~350 mg) [35]. However, authors like Ucar et al. (2018) determined that the concentration of phosphorus in stevia leaves, gathered from stevia grown with the addition of 80 kg of N·ha<sup>-1</sup> in Antalya, Turkey (36°54' N), was characterised by phosphorus content of 120 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m. in July and 190 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m. in September [39]. However, the concentration of potassium in the samples of Ucar et al. (2018) was in the range of 1300–1400 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m., which is over two times lower than the concentration of potassium in the stevia grown in Poland. The concentration of potassium in the aforementioned analysis of Tadhani and Subhash was at a similar level (2510 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m.) as the concentration of potassium in samples gathered in Poland [35]. Potassium is one of the elements necessary for the synthesis of glycosides, and a low concentration of potassium can reduce the number of steviol glycosides by 15–25%, but potassium-deficient stevia leaves were characterised by a potassium content of ~1500 mg, while non-deficient stevia was characterised by a potassium content of 2000 mg [40]. This shows that stevia plants grown in this study in typical conditions in Poland are rather not deficient in potassium, which indicates a perspective for the cultivation of this plant in Poland.

#### 3.4. Concentration of Ascorbic Acid, Phenolic Compounds, Reducing Sugars and Nitrate Ions in *Stevia rebaudiana* Grown Using Different Fertilisation Treatments

Ascorbic acid is one of the compounds responsible for the anti-inflammatory and antioxidant properties of *Stevia rebaudiana* leaves [8,9]. The concentration of ascorbic acid increased from July to September in all the stevia samples. Stevia plants grown in this study were characterised by similar concentrations of ascorbic acid as samples analysed by Lemus-Mondaca and 10 times larger concentration than in the study conducted by Kim et al. [41]. The high concentration of ascorbic acid in stevia plants is of interest due to its synergistic effect with stevia polyphenols, which significantly increases stevia's antioxidant potential. Changes in the concentration of phenolic compounds from July to September in the stevia leaves were not as clear as the changes in the ascorbic acid content, as some samples were characterised by the greatest concentration of phenolic compounds in July, some in September, and in some samples, the concentration of these components remained relatively the same. However, the concentration of phenolic compounds in stevia leaves from the study of Lemus-Mondaca was far lower (up to even three times) than the concentration of phenolic compounds in stevia leaves analysed in this study, suggesting that, with the relatively high concentration of ascorbic acid, stevia plants grown in Poland might be characterised with far greater antioxidant and anti-inflammatory properties than stevia grown in warmer climate [41]. However, more research about this hypothesis would have to be conducted in the future. The level of reducing sugars increased in stevia leaves between July and September; however, it is a known mechanism present in various plants from a variety of families [42–45]. The content of nitrate ions in the plant tissues is an indicator of the nutrient status of the plant, as the uptake of nitrate ions is related to the concentration of nitrates in the soil and the plant's ability to assimilate these ions. As the stevia plants were fertilised at the start of their growth, it is not surprising to see that the concentration of nitrates in September is far lower than in July. This indicates that stevia



plants have used some of the reserves of nitrate, which were assimilated when the plant was young [46,47]. Interestingly, N100 and N150, as well as S100 and S150, were characterised with a similar concentration of nitrate ions in July and U150 was characterised with a lower concentration of nitrate ions than U100. Therefore, it seems that the young *Stevia rebaudiana* plants are not able to sufficiently use nitrogen from the dosage of 150 kg of N per hectare. Thus, it is possible that the highest concentration of nitrogen, which should be applied to the *Stevia rebaudiana* plantation in order to increase nitrate concentration, should be 100 kg of N per ha or less.

### 3.5. Concentration of Chlorophyll and Carotenoids in *Stevia rebaudiana* Grown Using Different Fertilization Treatments

The concentration of chlorophyll remained at a rather similar level in most of the samples analysed during July and September. It is important to note that the concentration of chlorophyll in plant leaves can be a useful indicator of the development of chloroplasts, photosynthetic capacity and overall plant vigour [48]. The concentration of chlorophyll A in the stevia leaves was higher than the concentration of chlorophyll B, as is typical in most plants [49–52]. The concentration of chlorophyll A in July was at a similar level in most of the samples, with the exception of the sample with the lowest content (N50) and the highest content (U50). This fact might suggest that the amount of fertiliser is not as important when it concerns the concentration of chlorophyll, but the form of the nitrogen introduced to the plants might have a more important role. However, interestingly, N100, measured in September, was characterised by the greatest concentration of chlorophyll B, while S100 was characterised by the lowest. The data acquired in this research does not provide precise answers for this phenomenon, but these results could be analysed more meticulously in future studies. It is important to note, however, that stevia plants analysed in this study were characterised by rather low (3–4 times lower) concentration of chlorophyll when compared to the data acquired by Shahverdi et al. (2019), grown in Karaj Iran (35°48' N) [53]. Similar differences can be seen between samples of Ucar et al. grown in Antalya, Turkey (36°54' N), where the total concentration of chlorophyll in stevia leaves was equal to 7.5 mg·g<sup>-1</sup> of fresh leaf mass (concentration six times higher than in Polish stevia plants) [39]. These results suggest that the impact of nitrogen fertilisation is minuscule when compared to the impact of the amount of sunlight that the stevia plant acquires during its growth. Carotenoid content in the stevia leaves was not affected by the changes in nitrogen fertilisation and remained at almost the same level in July and September. The concentration of carotenoids in plant leaves is often related to the intensity of light during growth of the plant, as demonstrated in the study by Simlat et al. (2016) in *Stevia rebaudiana* plants [54]. This fact might explain the lower concentration of carotenoids in stevia plants grown in Poland when compared to stevia plants grown in Iran, which were characterised by a 3–4 times higher concentration of carotenoids in leaves [55].

### 3.6. Concentration of Steviosides in *Stevia rebaudiana* Grown Using Different Fertilisation Treatments

Steviosides are the primary reason for cultivating *Stevia rebaudiana* plants, and the goal of stevia farmers is to achieve the largest yield with the highest concentration of steviosides [56]. The main factors influencing stevioside content are temperature and amount of sunlight received by the plants, as well as the variety of the *Stevia rebaudiana* plant [57,58]. Stevia plants analysed in this study exhibited a very low concentration of steviosides compared to those grown in warmer countries, where the concentration typically ranges from 4% to even 20% of the dry weight [59,60]. However, one of the crucial aspects of this work is the fact that the addition of nitrogen fertiliser increased the total concentration of steviosides in the stevia plants grown in Poland. Additionally, it is worth noting that S100 and S150 were characterised with far greater concentrations of steviosides than other samples, indicating that this type and amount of fertiliser should be used by farmers seeking to maximise the concentration of rebaudioside A and stevioside in stevia plants grown in Poland. Nevertheless, it is crucial to point out that one of the most

important factors influencing the concentration of steviosides in *Stevia rebaudiana* leaves is the temperature at which the plants are growing [61,62]. As mentioned in Section 3.1., Poland experiences much lower temperatures than regions typically suited for stevia growth. Higher temperatures of the stevia cultivation, with the optimum close to 25 °C, have been shown to result in higher transcript levels of fifteen steviol glycoside biosynthesis pathways genes, while the temperatures close to 15 °C (similar to the average temperature of May, June and September in Poland) significantly restrain the transcription of these genes [61,62].

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Experimental Design

###### 4.1.1. Preparation of Seedlings

Seedlings used in the study were grown in a heated greenhouse. Seeds of the *Stevia rebaudiana* plant (Legutko Seed Company, Jutrosin, Poland) were sown during 1st decade of April of the year 2014, 2015, and 2016 in seed trays (30 × 40 cm) filled with peat substrate (Compo Sana) which were then covered with the thin layer of peat substrate and watered. After 3–4 weeks from seed sowing (during 1st decade of May), seedlings with at least one pair of foliage leaves were transferred to 54-site propagation kits filled with peat substrate. Later, during 3rd decade of May, plants with at least three pairs of foliage leaves and a height of at least 10 cm were transferred to pots with a diameter of 10 cm. Prior to adding peat substrate, the seed trays, propagation kits and pots were disinfected with 1% solution (v/v) of HortiSept 402D (Hortico, Wrocław, Poland).

###### 4.1.2. Preparation of the Field Used to Perform the Experiment

Prior to transplanting the seedlings from the greenhouse to the field, specific agrotechnical procedures were carried out on the field. In the winter preceding the experiment (i.e., 2013 for the experiment commencing in 2014, etc.), the field underwent ploughing. During the spring of the experiment year, the field was further prepared by dragging, tilling and harrowing. The soil selected for the experiment was black degraded soil with a humus content of 1.8%, slightly alkaline pH and salinity of 57  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-3}$ . The soil's phosphorus concentration was 41  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ; potassium concentration was 320  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ; calcium concentration was 3000  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ; and magnesium concentration was 30  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Additionally, the soil contained a trace amount of  $\text{NO}_3^-$  ions. After applying pre-plant fertilisation according to the methodology described in Section 4.1.3, the fertiliser was incorporated into the soil, and the field was covered with black agro-textile (UV P-100) to suppress weed growth. Additional fertiliser in the form of ammonium nitrate (50  $\text{kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) was applied as a top-dressing four weeks after planting the seedlings.

###### 4.1.3. Field Experiment

Field experiment involving *Stevia rebaudiana* plants was conducted in the years 2014, 2015 and 2016 at the Research and Didactic Station in Psary, Wrocław University of Environmental and Life Sciences: (51°19'055913609418" N, 17°03'36781036313" E). The experiment followed a split-plot design with three replications. Two main factors were considered throughout the experiment: fertiliser amount (three different doses) and fertiliser type (three different nitrogen forms:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ) used for pre-plant fertilisation. The fertiliser was thoroughly mixed with the soil prior to planting the *Stevia rebaudiana* seedlings. This experimental setup allowed for the investigation of ten different fertilisation treatments for *Stevia rebaudiana*:

- Control plots (C): no fertiliser was applied before planting the seedlings.
- Plots fertilized with ammonium nitrate (50  $\text{kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) before planting the seedlings (N50)
- Plots fertilized with ammonium nitrate (100  $\text{kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) before planting the seedlings (N100)
- Plots fertilized with ammonium nitrate (150  $\text{kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) before planting the seedlings (N150)
- Plots fertilized with ammonium sulfate (50  $\text{kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) before planting the seedlings (S50)

- Plots fertilized with ammonium sulfate ( $100 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) before planting the seedlings (S100)
- Plots fertilized with ammonium sulfate ( $150 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) before planting the seedlings (S150)
- Plots fertilized with urea ( $50 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) before planting the seedlings (U50)
- Plots fertilized with urea ( $100 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) before planting the seedlings (U100)
- Plots fertilized with urea ( $150 \text{ kg N}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) before planting the seedlings (U150)

In total, the experiment comprised 30 field plots, each with an area of  $1 \text{ m}^2$ . Ten stevia seedlings (as described in Section 4.1.1) were planted in each plot with a spacing of  $45 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$ . Each field plot was separated from adjacent plots by an uncultivated soil strip with a width of  $50 \text{ cm}$ . The total area of the experiment was  $62.5 \text{ m}^2$ . Standard agronomic practices were followed for plant care, including manual weed removal and irrigation during dry periods with  $20 \text{ mm}$  of water per irrigation session. Temperature and rainfall data during the experiment period at the stevia planting site are presented in Tables 10 and 11.

#### 4.1.4. Harvesting

The *Stevia rebaudiana* plants were harvested in the first decade of September each year, before the flowering stage. Harvesting was conducted manually by cutting the stalk  $10 \text{ cm}$  over the ground. During harvesting, the plants were weighed to determine the total biomass yield per unit area. After weighing, the leaves, shoots and any plant waste (sick or dried leaves) were weighed separately. These data were then used to calculate the percentage of leaves, shoots and plant waste in the harvested plant material. A total of ten measurements were taken each year (one per plant), resulting in 30 measurements for the entire experiment. The yield was calculated based on three measurements (once per year).

#### 4.1.5. Biometrics Measurements

Before harvesting, simple biometric measurements were taken on fully developed and healthy plants. The total height of the plant was measured, as well as lateral width at two-thirds of the plant height. The number of first-order shoots and the number of leaves on the lowest lateral shoot were recorded. Six measurements were taken each year, resulting in 18 measurements for the entire experiment.

#### 4.2. Chemical Analyses

All analyses were conducted on healthy, undamaged leaves of *Stevia rebaudiana* collected from the midpoint of the plant height. Each analysed sample consisted of leaves gathered from six plants from each field, which weighed approximately  $10\text{--}15 \text{ g}$  per plant. Leaves were collected once in July and once at harvest in September. Three measurements were taken each year in July and September, resulting in a total of eighteen measurements for the entire experiment, except for the concentration of steviosides, which was only analysed in September.

##### 4.2.1. Dry Mass Content

The dry mass content of the analysed leaves was determined using the PN-90/A-75101/03 method, utilising a Binder ED400 (Merzet, Poznan, Poland) dryer and a WTC2000 (Radwag, Radom, Poland) analytical scale. Approximately  $10\text{--}20 \text{ g}$  of fresh leaf material was used for each analysis [63].

##### 4.2.2. Extraction of Elements and Ions from the Plant Material

Before analysing the concentration of nitrate ions, magnesium, potassium, calcium and phosphorus, extracts of these elements had to be prepared according to the method by Nowosielski [64]. Dried and ground leaves ( $0.4 \text{ g}$ ) were transferred to plastic containers with the screw-cap, to which  $100 \text{ cm}^3$  of 2% (v/v) acetic acid and  $1 \text{ g}$  of active carbon were added. The containers were shaken for  $30 \text{ min}$ . in a MaxQ2000 shaker (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) at  $150 \text{ rpm}$ . After shaking, the mixture was filtered through a paper filter to  $200 \text{ cm}^3$  Erlenmeyer flasks. The clear filtrate was then used for subsequent analyses of element and ion concentrations.

#### Concentration of Magnesium in Plant Material

The magnesium content in the filtrate was assessed spectrophotometrically using a WPA S106 spectrophotometer (Biochrom, Cambridge, UK). Five cm<sup>3</sup> of the filtrate was transferred using an automatic pipette to graduated glass test tubes. Twenty cm<sup>3</sup> of the compound reagent (consisting of 480 mg sodium hydroxide, 250 mg of glycerol, 50 mg hydroxylammonium chloride, 50 mg polyvinyl alcohol and 1.25 mg of titan yellow, adjusted to 20 cm<sup>3</sup> with distilled water) was added to the tubes. Then, 3.5 cm<sup>3</sup> of the resulting solution was transferred to a polystyrene cuvette (optical path of ten mm). Absorbance was read at the wavelength equal to 555 nm. A blank sample was created by adding five cm<sup>3</sup> of 2% acetic acid solution to the twenty cm<sup>3</sup> of the previously described compound solution.

#### Concentration of Phosphorus in Plant Material

The phosphorus content in the filtrate was assessed spectrophotometrically. Twenty cm<sup>3</sup> of the filtrate was transferred to graduated glass test tubes, and 5 cm<sup>3</sup> of a solution containing 2.5 mg of ammonium metavanadate and 125 mg of ammonium heptamolybdate was added. The resulting solution was transferred (3.5 cm<sup>3</sup>) to a polystyrene cuvette, and absorbance was measured at the wavelength of 470 nm. A blank sample was created by adding twenty cm<sup>3</sup> of 2% acetic acid solution to five cm<sup>3</sup> of the solution containing 2.5 mg of ammonium metavanadate and 125 mg of ammonium heptamolybdate.

#### Concentration of Calcium and Potassium in Plant Material

The concentration of calcium and potassium in the plant material was determined in the filtrate using flame photometry with a Carl Zeiss Jena-type flame photometer.

#### Concentration of Nitrate Ions in Plant Material

The concentration of nitrate ions in the plant material was determined in the filtrate using an Orion 5 Star ionometer (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) calibrated in the range of 10–1000 mg of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> per dm<sup>3</sup> of the sample.

#### 4.2.3. Concentration of Reducing Sugars in the Plant Material

Twenty grams of fresh stevia leaves were weighed and transferred to 200 cm<sup>3</sup> volumetric flasks. Ten cm<sup>3</sup> of distilled water was added to each flask, and the flasks were placed in a water bath filled with boiling water for 30 min. After this procedure, the concentration of reducing sugars in the plant material was determined using Lane-Eynon general volumetric method accepted by the Polish Committee for Standardisation, described previously by Godlewska et al. (2021) [PN-90/A-75101/07] [65,66].

#### 4.2.4. Concentration of Carotenoids and Chlorophyll A and B

The concentration of chlorophyll A, chlorophyll B and carotenoids was determined spectrophotometrically. Fresh stevia leaves (0.4 g) were weighed and transferred to the mortar, where they were ground with the addition of previously dried sand and calcium carbonate. A few drops of 80% acetone were added to the mortar, and the mortar contents were ground to obtain a homogenous mass. Twenty cm<sup>3</sup> of acetone was used to transfer the ground leaves to the Schott filtration system and filter them under the vacuum. The filtrate was transferred to a 50 cm<sup>3</sup> volumetric flask, filled with 80% acetone and mixed thoroughly. The absorbance of the filtrate was measured in the quartz cuvettes (optical path of ten mm) at the wavelengths of 470 nm, 645 nm and 663 nm. The blank sample consisted of 80% acetone [67].

#### 4.2.5. Concentration of Vitamin C (Ascorbic Acid)

The concentration of vitamin C (ascorbic acid) in plant material was determined using methodology by Bieniek (2012) and Krężel and Kołota (2014), as previously outlined by the Polish Committee for Standardization [67–69]. Fresh stevia leaves (~10 g) were homogenised using a Koenic blender with oxalic acid (200 cm<sup>3</sup>, 2%). The resulting solutions

were filtered, and filtrates (10 cm<sup>3</sup>) were collected and titrated with a solution of 2,6-dichlorophenolindophenol (Tillmans' reagent) until a light pinkish colour appeared and lasted for at least 1 min [67,68].

#### 4.2.6. Concentration of Phenolic Compounds

The total concentration of phenolic compounds was measured according to the Folin-Ciocalteu method described by Jałoszyński et al. (2008) with slight modifications described by Godlewska et al. (2021) by extracting the phenolic compound from a 5 g sample of stevia leaves [66,70].

#### 4.2.7. Concentration of Steviosides

The concentration of stevioside and rebaudioside A in the plant material was determined using high-performance liquid chromatography as previously described by Vaněk et al. [71]. The concentration of steviosides was measured only in the final product (leaves gathered in September). Two grams of leaf sample was used for one extraction procedure per year, and HPLC analysis was performed three times on each of the extracts.

#### 4.3. Data Analysis

The data collected over all years during this study (biometrics measurements, concentration of various elements and ions in plant material, concentration of reducing sugars, chlorophyll A, chlorophyll B, carotenoids, ascorbic acid, phenolic compounds and steviosides) were statistically analysed using Statistica. A two-way ANOVA ( $\alpha = 0.05$ ) was employed, with the Duncan test used to establish homogenous groups. Additionally, to determine whether the main differences between the analysed samples were due to different fertilisation treatments or the year in which stevia plants were planted, a principal component analysis (PCA) was conducted on the mean results from each year of the study. In the PCA, the single-linkage agglomerative method was used, employing the Euclidean measure to determine the distance between each analysed parameter and the samples of stevia grown with different fertilisation treatments each year.

### 5. Conclusions

Cultivating *Stevia rebaudiana* plants in Poland, in comparison to countries closer to the equator where temperatures are higher and which receive more sunlight, appears to be less profitable due to lower yields and lower concentrations of steviosides in the plant leaves. However, the addition of various nitrogen fertilisers can enhance the quality and yield of *Stevia rebaudiana* plantations in Poland. The addition of 100 kg or 150 kg of nitrogen per hectare of the field in the form of urea or ammonium nitrate increases the total yield of the stevia plants. Conversely, the addition of 100 kg and 150 kg of nitrogen per hectare of the field in the form of ammonium sulfate does not increase the stevia yield as the addition of mentioned fertilisers, but it maximises the number of steviosides present in the *Stevia rebaudiana* leaves. Data collected thus far indicates that cultivating *Stevia rebaudiana* in Poland presents challenges due to the low concentration of steviosides in the plants, which is the primary goal of stevia cultivation. However, further research into stevia cultivation in Poland could be a worthwhile avenue of study in light of progressive climate change, which is increasing average temperatures in the region.

**Author Contributions:** Conceptualisation, J.Ś. and A.B.; methodology, J.Ś. and A.B.; software, J.Ś. and A.G.; validation, J.Ś. and A.B.; formal analysis, J.Ś.; investigation, J.Ś.; resources, A.B.; data curation, J.Ś. and A.B.; writing—original draft preparation, J.Ś. and A.G.; writing—review and editing, J.Ś., A.B. and A.G.; visualisation, A.G.; supervision, A.B.; project administration, A.B.; funding acquisition, A.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The article is part of a PhD dissertation titled ‘The effect of selected agronomic factors on growth, yielding and chemical composition of *Stevia rebaudiana* Bert.’, prepared during Doctoral Studies at the Wrocław University of Environmental and Life Sciences. The APC is financed by Wrocław University of Environmental and Life Sciences.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

- Ahmad, J.; Khan, I.; Blundell, R.; Azzopardi, J.; Mahomoodally, M.F. *Stevia rebaudiana* Bertoni.: An updated review of its health benefits, industrial applications and safety. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, *100*, 177–189. [\[CrossRef\]](#)
- Xu, M.-L.; Cheng, Y.; Feng, M.; Lu, Q.; Lian, Y. Identifying Potential Sources of Phthalate Contamination in the Leaves of *Stevia Rebaudiana* (Bertoni) and the Development of Removal Technology. *Molecules* **2024**, *29*, 1627. [\[CrossRef\]](#)
- Samuel, P.; Ayooob, K.T.; Magnuson, B.A.; Wölwer-Rieck, U.; Jeppesen, P.B.; Rogers, P.J.; Rowland, I.; Mathews, R. Stevia Leaf to Stevia Sweetener: Exploring Its Science, Benefits, and Future Potential. *J. Nutr.* **2018**, *148*, 1186S–1205S. [\[CrossRef\]](#)
- Latarissa, I.R.; Barliana, M.I.; Lestari, K. A Comprehensive review of *Stevia rebaudiana* Bertoni effects on human health and its mechanism. *J. Adv. Pharm. Educ. Res.* **2020**, *10*, 91–96.
- Orellana-Paucar, A.M. Steviol Glycosides from *Stevia rebaudiana*: An Updated Overview of Their Sweetening Activity, Pharmacological Properties, and Safety Aspects. *Molecules* **2023**, *28*, 1258. [\[CrossRef\]](#)
- Bugaj, B.; Leszczynska, T.; Pysz, M.; Kopec, A.; Pacholarz, J.; Pysz-Izdebska, K. Charakterystyka i prozdrowotne właściwości *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Żywność Nauka Technol. Jakość* **2013**, *20*, 27–35.
- Timotina, M.; Aghajanyan, A.; Schubert, R.; Trchounian, K.; Gabrielyan, L. Biosynthesis of silver nanoparticles using extracts of *Stevia rebaudiana* and evaluation of antibacterial activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2022**, *38*, 196. [\[CrossRef\]](#)
- Gawel-Beben, K.; Bujak, T.; Nizioł-Lukaszewska, Z.; Antosiewicz, B.; Jakubczyk, A.; Karaś, M.; Rybczyńska, K. *Stevia Rebaudiana* Bert. Leaf Extracts as a Multifunctional Source of Natural Antioxidants. *Molecules* **2015**, *20*, 5468–5486. [\[CrossRef\]](#)
- Gupta, E.; Purwar, S.; Sandaram, S.; Gai, G.K. Nutritional and therapeutic values of *Stevia rebaudiana*: A review. *J. Med. Plants Res.* **2013**, *7*, 3343–3353.
- Basharat, S.; Huang, Z.; Gong, M.; Lv, X.; Ahmed, A.; Hussain, I.; Li, J.; Du, G.; Liu, L. A review on current conventional and biotechnical approaches to enhance biosynthesis of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana*. *Chin. J. Chem. Eng.* **2021**, *30*, 92–104. [\[CrossRef\]](#)
- Yücesan, B.; Altuğ, C. Chemical and enzymatic modifications of steviol glycosides. In *Steviol Glycosides*, 1st ed.; Charis, M.G., Ed.; Academic Press: London, UK, 2021; pp. 81–102.
- Serra, P.; Fancello, G. Towards the IMO’s GHG Goals: A Critical Overview of the Perspectives and Challenges of the Main Options for Decarbonizing International Shipping. *Sustainability* **2020**, *12*, 3220. [\[CrossRef\]](#)
- Cappelli, L.; D’Ascenzo, F.; Ruggieri, R.; Gorelova, I. Is Buying Local Food a Sustainable Practice? A Scoping Review of Consumers’ Preference for Local Food. *Sustainability* **2022**, *14*, 772. [\[CrossRef\]](#)
- Enthoven, L.; Van den Broeck, G. Local food systems: Reviewing two decades of research. *Agric. Syst.* **2021**, *193*, 103226. [\[CrossRef\]](#)
- Brown, C. Consumers’ preferences for locally produced food: A study in southeast Missouri. *Am. J. Altern. Agric.* **2003**, *18*, 213–224. [\[CrossRef\]](#)
- Barroso, M.R.; Martins, N.; Barros, L.; Antonio, A.L.; Rodrigues, M.Â.; Sousa, M.J.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I.C.F.R. Assessment of the nitrogen fertilization effect on bioactive compounds of frozen fresh and dried samples of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Food Chem.* **2018**, *243*, 208–213. [\[CrossRef\]](#)
- Tavarini, S.; Sgherri, C.; Ranieri, A.M.; Angelini, L.G. Effect of nitrogen fertilization and harvest time on steviol glycosides, flavonoid composition, and antioxidant properties in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 7041–7050. [\[CrossRef\]](#)
- Mahajan, M.; Pal, P.K. Yield response, accumulation of bioactive ingredient and ion uptake of *Stevia rebaudiana* to different soil-moisture and nitrogen levels. *Agric. Water Manag.* **2022**, *264*, 107511. [\[CrossRef\]](#)
- Sun, Y.; Yang, Y.; Hou, M.; Huang, X.; Zhang, T.; Huang, S.; Xu, X.; Yuan, H. Optimized nitrogen topdressing strategies enhance steviol glycoside productivity in stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) Plants. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **2020**, *20*, 1133–1143. [\[CrossRef\]](#)
- Inugraha, I.; Maghfoer, M.D.; Widaryanto, E. Response of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) to nitrogen and potassium fertilization. *IOSR J. Agric. Veter. Sci.* **2014**, *7*, 47–55. [\[CrossRef\]](#)
- Sun, Y.; Wang, M.; Mur, L.A.J.; Shen, Q.; Guo, S. Unravelling the Roles of Nitrogen Nutrition in Plant Disease Defences. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 572. [\[CrossRef\]](#)
- Tadesse, N.; Gebere, A.; Lulie, B.; Hordofa, M. Influence of plant population density on growth and yield of *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni L.) at Wondo Genet South Ethiopia. *Acad. Res. J. Agri. Sci. Res.* **2016**, *4*, 321–329.

23. Shivani, K.; Gautam, G.; Sukany, G.; Mesharm, M.R. Impact of spacing and levels of nitrogen on growth and yield of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2019**, *8*, 1878–1881.
24. Gómez Gómez, R.E.; Kim, J.; Hong, K.; Jang, J.Y.; Kisiju, T.; Kim, S.; Chun, B.C. Association between Climate Factors and Dengue Fever in Asuncion, Paraguay: A Generalized Additive Model. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 12192. [CrossRef]
25. Available online: <https://www.climatestotravel.com/climate/paraguay> (accessed on 15 April 2024).
26. Warner, R.M. Influence of environmental parameters, pinching, and ethephon application on growth and branching of potted stevia. *HortScience* **2022**, *57*, 81–84. [CrossRef]
27. Chen, H.; Chen, S.; Wang, X.; Liu, X.; Wang, X.; Zhu, R.; Mo, W.; Wang, R.; Zhang, S. Different Environmental and Phylogenetic Controls over the Altitudinal Variation in Leaf N and P Resorption Traits between Woody and Herbaceous Plants. *Forests* **2023**, *14*, 5. [CrossRef]
28. Reinhardt, J.; Hilgert, P.; von Cossel, M. Biomass Yield of Selected Herbaceous and Woody Industrial Crops across Marginal Agricultural Sites with Shallow Soil. *Agronomy* **2021**, *11*, 1296. [CrossRef]
29. Sharma, L.K.; Zaeen, A.A.; Bali, S.K.; Dwyer, J.D. Improving nitrogen and phosphorus efficiency for optimal plant growth and yield. In *New Visions in Plant Science*; IntechOpen: London, UK, 2017; pp. 13–40.
30. Güsewell, S. N: P ratios in terrestrial plants: Variation and functional significance. *New Phytol.* **2004**, *164*, 243–266. [CrossRef]
31. Müller, I.; Schmid, B.; Weiner, J. The effect of nutrient availability on biomass allocation patterns in 27 species of herbaceous plants. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* **2000**, *3*, 115–127. [CrossRef]
32. Falster, D.S.; Westoby, M. Leaf size and angle vary widely across species: What consequences for light interception? *New Phytol.* **2003**, *158*, 509–525. [CrossRef]
33. Baghat, A.K.; Gupta, L.M.; Gupta, M.; Gupta, S.K.; Raina, N.S. Effect of Integrated Nutrient Management on Growth and Yield of Stevia (*Bertoni*) *Stevia rebaudiana*. *Indian J. Ecol.* **2022**, *49*, 1965–1967.
34. Lemus-Mondaca, R.; Ah-Hen, K.; Vega-Gálvez, A.; Honores, K.; Moraga, N. *Stevia rebaudiana* leaves: Effect of drying process temperature on bioactive components, antioxidant capacity and natural sweeteners. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2016**, *71*, 49–56. [CrossRef] [PubMed]
35. Tadhani, M.; Subhash, R. Preliminary studies on *Stevia rebaudiana* leaves: Proximal composition, mineral analysis and phytochemical screening. *J. Med. Sci.* **2006**, *6*, 321–326.
36. Lemus-Mondaca, R.; Vega-Gálvez, A.; Zura-Bravo, L.; Ah-Hen, K. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chem.* **2012**, *132*, 1121–1132. [CrossRef] [PubMed]
37. Ahmad, M.A.; Deng, X.; Adeel, M.; Rizwan, M.; Shakoore, N.; Yang, Y.; Javed, R. Influence of calcium and magnesium elimination on plant biomass and secondary metabolites of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2022**, *69*, 2008–2016. [CrossRef]
38. Desai Heta, B.; Desai Charmi, V.; Desai Charmi, P.; Singh, D.; Suthar, H. Effect of magnesium nanoparticles on physiology and stevioside in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Eur. J. Biomed. Pharm. Sci.* **2017**, *4*, 642–646.
39. Ucar, E.; Ozyigit, Y.; Eruygur, N.; Güven, D.; Yur, S.; Turgut, K.; Özek, T.; Kütük, N. The effect of the plant age and growth period on the nutritional substance, chlorophyll and steviol glycoside rates in *Stevia (Stevia rebaudiana* Bertoni) leaves. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **2018**, *49*, 291–302. [CrossRef]
40. Sun, Y.M.; Huang, X.L.; Zhang, T.; Yang, Y.H.; Cheng, X.F.; Xu, X.Y.; Yuan, H.Y. Potassium deficiency inhibits steviol glycosides synthesis by limiting leaf sugar metabolism in stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) plants. *J. Integr. Agric.* **2021**, *20*, 2932–2943. [CrossRef]
41. Kim, J.S.; Yang, M.; Lee, O.H.; Kang, S.N. The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *LWT-Food Sci. Technol.* **2011**, *44*, 1328–1332. [CrossRef]
42. Emendack, Y.; Burke, J.; Laza, H.; Sanchez, J.; Hayes, C. Abiotic stress effects on sorghum leaf dhurrin and soluble sugar contents throughout plant development. *Crop Sci.* **2018**, *58*, 1706–1716. [CrossRef]
43. Pereira, L.F.; Ferreira, V.M.; Oliveira, N.G.; Sarmiento, P.L.; Endres, L.; Teodoro, I. Sugars levels of four sugarcane genotypes in different stem portions during the maturation phase. *An. Acad. Bras. Ciências* **2017**, *89*, 1231–1242. [CrossRef]
44. Shi, H.; Wang, B.; Yang, P.; Li, Y.; Miao, F. Differences in sugar accumulation and mobilization between sequential and non-sequential senescence wheat cultivars under natural and drought conditions. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0166155. [CrossRef]
45. McCormick, A.J.; Watt, D.A.; Cramer, M.D. Supply and demand: Sink regulation of sugar accumulation in sugarcane. *J. Exp. Bot.* **2009**, *60*, 357–364. [CrossRef]
46. Raddatz, N.; Morales de los Ríos, L.; Lindahl, M.; Quintero, F.J.; Pardo, J.M. Coordinated transport of nitrate, potassium, and sodium. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 247. [CrossRef]
47. Dechorgnat, J.; Nguyen, C.T.; Armengaud, P.; Jossier, M.J.; Diatloff, E.; Filleur, S.; Daniel-Vedele, F. From the soil to the seeds: The long journey of nitrate in plants. *J. Exp. Bot.* **2011**, *62*, 1349–1359. [CrossRef]
48. Pal, P.K.; Prasad, R.; Singh, R.D. Evaluating the non-destructive method for determining the chlorophyll and nitrogen content in *Stevia rebaudiana* (Bertoni) leaf. *Plant Biosyst. Int. J. Deal. All Asp. Plant Biol.* **2015**, *149*, 131–135.
49. Gitelson, A.A.; Vina, A.; Verma, S.B.; Rundquist, D.C.; Arkebauer, T.J.; Keydan, G.; Leavitt, B.; Ciganda, V.; Burba, G.G.; Suyker, A.E. Relationship between gross primary production and chlorophyll content in crops: Implications for the synoptic monitoring of vegetation productivity. *J. Geophys. Res. Atmos.* **2006**, *111*, 3–8. [CrossRef]

50. Leong, T.Y.; Anderson, J.M. Adaptation of the thylakoid membranes of pea chloroplasts to light intensities. I. Study on the distribution of chlorophyll-protein complexes. *Photosynth. Res.* **1984**, *5*, 105–115. [[CrossRef](#)]
51. Chen, W.M.; Jin, N.; Shi, Y.; Su, Y.Q.; Fei, B.J.; Li, W.; Qiao, D.R.; Cao, Y. Coordinate expression of light-harvesting chlorophyll a/b gene family of photosystem II and chlorophyll a oxygenase gene regulated by salt-induced phosphorylation in *Dunaliella salina*. *Photosynthetica* **2010**, *48*, 355–360. [[CrossRef](#)]
52. Hobe, S.; Fey, H.; Rogl, H.; Paulsen, H. Determination of relative chlorophyll binding affinities in the major light-harvesting chlorophyll a/b complex. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 5912–5919. [[CrossRef](#)]
53. Shahverdi, M.A.; Omid, H.; Tabatabaei, S.J. Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) responses to NaCl stress: Growth, photosynthetic pigments, diterpene glycosides and ion content in root and shoot. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* **2019**, *18*, 355–360. [[CrossRef](#)]
54. Simlat, M.; Ślęzak, P.; Moś, M.; Warchoń, M.; Skrzypek, E.; Ptak, A. The effect of light quality on seed germination, seedling growth and selected biochemical properties of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Sci. Hortic.* **2016**, *211*, 295–304. [[CrossRef](#)]
55. Gerami, M.; Majidian, P.; Ghorbanpour, A.; Alipour, Z. *Stevia rebaudiana* Bertoni responses to salt stress and chitosan elicitor. *Physiol. Mol. Biol. Plants* **2020**, *26*, 965–974. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Hossain, M.F.; Islam, M.T.; Islam, M.A.; Akhtar, S. Cultivation and uses of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni): A review. *Afr. J. Food Agric. Nutr. Dev.* **2017**, *17*, 12745–12757. [[CrossRef](#)]
57. Libik-Konieczny, M.; Capecka, E.; Tuleja, M.; Konieczny, R. Synthesis and production of steviol glycosides: Recent research trends and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *105*, 3883–3900. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Peteliuk, V.; Rybchuk, L.; Bayliak, M.; Storey, K.B.; Lushchak, O. Natural sweetener *Stevia rebaudiana*: Functionalities, health benefits and potential risks. *EXCLI J.* **2021**, *20*, 1412–1430. [[PubMed](#)]
59. Geuns, J.M. Stevioside. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 913–921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Yadav, A.K.; Singh, S.; Dhyani, D.; Ahuja, P.S. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Can. J. Plant Sci.* **2011**, *91*, 1–6. [[CrossRef](#)]
61. Miladinova-Georgieva, K.; Geneva, M.; Stancheva, I.; Petrova, M.; Sichanova, M.; Kirova, E. Effects of Different Elicitors on Micropropagation, Biomass and Secondary Metabolite Production of *Stevia rebaudiana* Bertoni—A Review. *Plants* **2023**, *12*, 153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Yang, Y.; Huang, S.; Han, Y.; Yuan, H.; Gu, C.; Wang, Z. Environmental cues induce changes of steviol glycosides contents and transcription of corresponding biosynthetic genes in *Stevia rebaudiana*. *Plant Physiol. Biochem.* **2015**, *86*, 174–180. [[CrossRef](#)]
63. PN-90/A-75101/03; Przetwory Owocowe i Warzywne Przygotowanie Próbek i Metody Badań Fizykochemicznych Oznaczanie Zawartości Suchej Masy Metodą Wagową. Polish Committee for Standardisation: Warszawa, Poland, 1990.
64. Nowosielski, O. *Principles of Preparation of Fertilizing Recommendations in Horticulture*; PWRiL: Warszawa, Poland, 1988; ISBN 8309013485.
65. PN-90/A-75101/07; Fruit and Vegetable Products—Preparation of Samples and Testing Methods. Determination of Sugars and Sugar-Free Extract in Polish—Przetwory Owocowe i Warzywne. Przygotowanie Próbek i Metody Badań. Oznaczanie Zawartości Cukrów i Ekstraktu Bezcukrowego. Polish Committee for Standardisation: Warszawa, Poland, 1990.
66. Godlewska, K.; Pacyga, P.; Michalak, I.; Biesiada, A.; Szumny, A.; Pachura, N.; Piszcz, U. Effect of Botanical Extracts on the Growth and Nutritional Quality of Field-Grown White Head Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*). *Molecules* **2021**, *26*, 1992. [[CrossRef](#)]
67. Bieniek, A. Yield, Morphology and Biological Value of Fruits of *Actinidia arguta* and *Actinidia purpurea* and Some of their Hybrid Cultivars Grown in North-Eastern Poland. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* **2012**, *11*, 117–130.
68. Krężel, J.; Kołota, E. Source of Nitrogen Affects the Yield and Quality of Spinach Cultivars Grown for Autumn Harvest. *Acta Agric. Scand. Sect. B Plant Soil Sci.* **2014**, *64*, 583–589. [[CrossRef](#)]
69. *Fruit and Vegetable Products—Preparation of Samples and Testing Methods—Determination of Ascorbic Acid Content*; Polish Committee for Standardization: Warszawa, Poland, 1990.
70. Jalozyński, K.; Figiel, A.; Wojdyło, A. Drying kinetics and antioxidant activity of oregano. *Acta Agrophysica* **2008**, *11*, 81–90.
71. Vaněk, T.; Nepovim, A.; Valíček, P. Determination of stevioside in plant material and fruit teas. *J. Food Compos. Anal.* **2001**, *14*, 383–388. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



2. “Effect of spacing on growth, yield and chemical composition of stevia plants (*Stevia rebaudiana* Bert.)”



Article

# Effect of Spacing on Growth, Yield and Chemical Composition of Stevia Plants (*Stevia rebaudiana* Bert.)

Joanna Śniegowska<sup>1,2,\*</sup> and Anita Biesiada<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Horticulture, Wrocław University of Environmental and Life Sciences; [katedra.ogrodnictwa@upwr.edu.pl](mailto:katedra.ogrodnictwa@upwr.edu.pl)

<sup>2</sup> Department of Fermentation and Cereals Technology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences; [ktfiz@upwr.edu.pl](mailto:ktfiz@upwr.edu.pl)

\* Correspondence: [joanna.sniegowska@upwr.edu.pl](mailto:joanna.sniegowska@upwr.edu.pl)

**Abstract:** The aim of this study was to determine the effect of plant spacing on growth, yield and chemical composition of stevia grown in Poland. The variable factor was spacing of 50x30 cm, 45x25 cm, and 30x30 cm. Seedlings were planted in 1<sup>st</sup> decade of June and the plant material was harvested in 2<sup>nd</sup> decade of September. In July and September seedlings were subjected to biometric measurements and plant samples were taken for chemical analyses. Plants grown at 50x30 cm spacing were characterized by increased content of reducing sugars, nitrates, phosphorous, potassium, and magnesium, but yield of the herb and leaves was smallest. Greatest yield of the herb and leaves was found for 30x30 and 45x25 cm spacing, with lowest mass of single plant. Leaves from plants grown in the 30x30 cm spacing were also characterised with the greatest concentration of dry mass and phenolic compounds and the lowest concentration of phosphorus and magnesium. Spacing did not significantly affect the biometric parameters in July of the plants but in September difference was observed in lateral width and total number of shoots. Spacing did not affect the content of plant pigments contents in the leaves of Stevia.

**Keywords:** stevia; spacing; chlorophyll; polyphenols; biometric measurements; yield

---

## 1. Introduction

*Stevia rebaudiana* Bert. is a plant of the *Asteraceae* family originating from Paraguay. Stevia produces an interesting array of biologically active compounds characterised with very sweet taste. The plant-derived steviol glycosides present in stevia (over 30 have been identified) may be up to 300 times sweeter than sucrose [1]. At the same time, the stevia plant possesses low energetic value at the level of 2.7 kcal·g<sup>-1</sup> d.m. Stevia is also a source of important antioxidants, such as

polyphenolic metabolites including, flavons, flavonols and chlorogenic acids. Due to these properties, stevia plant is widely used in the food, pharmaceutical and cosmetic industries [1,2]. As diabetes, caused mainly by sugar consumption, becomes more crucial worldwide problem, more analyses of the viable sources of sugar substitutes seem like an adequate avenue of research in the fields of agriculture, biotechnology and food technology. Various in vitro and in vivo studies have revealed that steviol glycosides possess glucogonostatic, insulinotropic, antihyperglycemic properties [3]. Rebaudioside A and steviol can induce various anti-inflammatory, antidiarrhoeal, diuretic and immunomodulatory actions [4]. Furthermore, studies on rats revealed that consumption of stevia leaves can decrease glycaemia and gluconeogenesis [5]. In a similar study performed by Aswar et al., (2019) [6], consumption of stevioside had positive effects on blood glucose level and lipid profile, as well as on advanced glycated end products. A study performed on humans, with a group consisting of lean and obese individuals have revealed that consumption of stevia (compared with sucrose or aspartame) has shown positive effects, such as reduced postprandial glucose level or postprandial insulin levels. Other authors [7] also describe stevia positive effects of stevia consumption on the postprandial glucose level. Study conducted by Mohd-Radzman et al. (2013) [8] has shown that stevioside from stevia can improve 3T3-L1 insulin sensitivity by enhanced expression of proteins which are involved in the insulin-signaling pathway. Rebaudioside A, another of the steviosides, in the study of Saravanan et al. (2012) [9] had an influence on reducing blood glucose levels in rats with diabetes and has exhibited protective action towards the pancreas. Stevia and steviosides also have anti-inflammatory and antimicrobial properties [10]. Research conducted by Atas et al. (2018) [11] has shown that stevia leaves can be used to produce extracts which possess antimicrobial properties against *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus pneumonia*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas fluorescens*. These results and the fact that there is a growing interest of people in healthy lifestyle and in natural ingredients of food results in increased demand for that herbal raw material, and consequently leads to a more extensive cultivation of plants with functional and healthy properties, stevia including [12-14]. This plant is currently grown in a variety of countries besides South America, such as China, Malaysia, Singapore, South Korea, Taiwan, and Thailand [15]. However, there is not much information about viability of *Stevia rebaudiana* plantation in various countries characterised with a cooler climate than native region for stevia. Due to the fact that stevia is currently used worldwide, stevia cultivation in the country, in which stevia plants would be used in the production of various food products or cosmetics could possibly reduce costs and carbon emission due to the reduction of the distances needed for stevia transportation [16-17]. This study analysed the possibility of cultivation *Stevia rebaudiana* Bertoni plants in Poland and additionally aimed to determine, whether various plant spacing in the stevia cultivation can influence various characteristics of the stevia plantation, such as yield, growth parameters and the composition of the produced plants. Research on the selection of the appropriate spacing in plant cultivation, particularly in new areas with climatic conditions differing from natural sites can be of significant interest to the potential farmers in the new regions. Data acquired in this study could be of great economic and physiological importance. It could be potentially used in optimizing field surface usage to enhance yield quantity and biological significance by selecting the optimal space for plant growth, thereby influencing the attainment of higher-quality raw materials [18-20].

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Experimental Design

Stevia plants used in the experiment were planted on black degraded soil characterized with humus content of 1.8%, salinity of 54  $\mu\text{S}/\text{cm}^3$  and pH of 7.44 in the years 2014, 2015 and 2016: the values are given as the average of the years of the experiment. Stevia was planted at the Research and Didactic Station in Psary, Wrocław University of Environmental and Life Sciences: (51°19'055913609418" N, 17°03'36781036313" E). The experiment was performed in one-factor randomized block design in triplicate, on the plots with the area of 1.5 m<sup>2</sup>. Each of the field plots were separated from the other plots with an uncultivated plot of soil with the width of 50 cm. Total area of the experiment was equal to 33.75 m<sup>2</sup>. The variable factor of the experiment was the spacing between stevia plants, which was equal to: 50x30 cm (10 plants per plot), 45x25 cm (12 plants per plot), and 30x30 cm (15 plants per plot). The seedlings were obtained from an own heated greenhouse, where seeds were grown in the plastic boxes filled with peat substrate. Seeds were sown in the first decade of April. Three weeks after sowing, stevia plants were transferred to 54-site seedlings trays filled with peat substrate. Plants with at least three pairs of foliage leaves were planted during the third decade of May planted into 10 cm pots filled with peat substrate and then, during the first decade of June plants were planted into the plots, which have been fertilized with ammonium nitrate at 100 kg N·ha<sup>-1</sup> and covered with black agrotexile. Concentration of phosphorus in the soil was equal to 45 mg·dm<sup>-3</sup>; concentration of potassium in the soil was equal to 310 mg·dm<sup>-3</sup>; concentration of calcium was equal to 2800 mg·dm<sup>-3</sup>; concentration of magnesium was equal to 34 mg·dm<sup>-3</sup>. Additional fertilizer in the form of ammonium nitrate (50 kg N·ha<sup>-1</sup>) was used as a top-dressing four weeks after planting of the seedlings into the field. Plants were cared for with generally accepted methods and plants were watered during dry periods with 20mm of water per square meter of the plot (20 dm<sup>3</sup> per m<sup>2</sup>).

The weather conditions at the site of the stevia plantation (temperature and amount of rainfall) in the particular months of the experiment are shown in Table 1.

**Table 1.** Rainfall and temperature on site of the experiment during the time of the stevia growth

Month	Decade of the month	Year 2014		Year 2015		Year 2016		Average in years 1981-2010	
		[°C]	[mm]	[°C]	[mm]	[°C]	[mm]	[°C]	[mm]
May	1st	11.4	30.3	13.3	12.3	15.4	14.0		
	2nd	12.2	33.6	13.0	14.0	15.5	12.0		
	3rd	17.3	42.8	14.0	0.5	20.9	0.0	14.2	57
	Monthly average	13.8	106.7	13.4	26.8	17.3	26.0		
June	1st	18.4	8.2	18.1	11.0	21.1	9.4		
	2nd	16.6	0.3	16.4	23.1	18.5	59.0	17	69.9
	3rd	15.7	15.4	15.8	32.2	23.8	0.8		

	Monthly average	16.9	23.9	16.8	66.3	21.1	69.2		
	1st	20.5	20.0	20.5	11.0	20.5	39.5		
	2nd	22.5	0.0	20.3	38.9	20.1	70.5		
July	3rd	22.6	26.1	19.9	3.3	23.8	24.5	19.2	83.4
	Monthly average	21.9	46.1	20.2	53.2	21.5	134.5		
	1st	21.7	17.5	27.2	0.0	20.4	5.8		
	2nd	17.4	13.1	25.2	0.0	19.7	5.0		
August	3rd	15.9	35.0	23.1	2.1	21.3	13.3	18.5	71
	Monthly average	18.3	65.6	25.2	2.1	20.5	24.1		
	1st	17.2	24.1	17.1	16.4	21.2	11.5		
	2nd	18.6	21.6	18.8	0.0	19.3	45.8		
September	3rd	14.0	14.3	14.1	0.0	15.0	0.0	13.9	45.2
	Monthly average	16.6	60.0	16.7	16.4	18.5	57.3		

Plants were harvested manually by cutting the stalk 10 cm over the ground in the second decade of September each year. After the harvest, plants were weighed to assess the total yield of the herbs and leaves ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$ ) these data were then used to yield and calculate the percentage of leaves. After weighing the single plants, leaves and shoots from the single plant were also weighed to determine their percentage in the total yield. Biometric measurements such as plant height, lateral width (measured at the two thirds of plant height), total number of shoots (of the first order), total number of leaves on the lowest lateral shoot were also taken in July (during the intensive growth) and just before the harvest in September. Height of all the plants was measured and biometric measurements of the three healthy stevia plants of the average height for each of the plots were selected for the complete analysis of the biometric measurements (three per plot, nine per spacing, 27 for each spacing throughout the 3 years of the experiment. Healthy, undamaged leaves (circa 10-15g per plant) were gathered for the chemical analyses from the 1/2 of plant height. Amount of measurements per year was three in July and in September per each field (nine for each spacing, 27 for each spacing throughout the 3 years of the experiment).

## 2.2. Analytical Methods

Concentration of dry mass in ste stevi leaves was determined via the gravimetric method, using a Binder ED400 (Merazet, Poznan, Poland) dryer and a WTC2000 (Radwag, Radom, Poland) analytical scale [21]. Vitamin C concentration

was measured in fresh stevia leaves using Tillman's method [22]. Approximately 10 g of stevia leaves were homogenized with oxalic acid (200 cm<sup>3</sup>, 2%) using a Koenic blender. The homogenate was filtered, and 10 cm<sup>3</sup> of the resulting filtrate was titrated with 2,6-dichlorophenolindophenol (Tillman's reagent) until a persistent light pink color was present for at least one minute.

Chlorophyll a+b and carotenoid concentrations were analysed spectrophotometrically. Fresh leaves (0.4 g) were ground in a mortar with dried sand, calcium carbonate, and a few drops of 80% acetone to form a homogeneous mass. Twenty cm<sup>3</sup> of acetone was used to transfer ground leaves from the mortar to the Schott filtration system, where the homogenous mass was filtered under vacuum. The resulting filtrate was then transferred to a 50 cm<sup>3</sup> volumetric flask, which was filled with 80% acetone and mixed. The filtrate's absorbance was measured in quartz cuvettes (10 mm optical path) at wavelengths of 470 nm, 645 nm, and 663 nm. A blank sample was 80% acetone [23].

Reducing sugars were analyzed by weighing 20 g of fresh stevia leaves and adding them to 200 cm<sup>3</sup> volumetric flasks, which was followed by addition of 10 cm<sup>3</sup> of distilled water. Flasks were then heated in the water bath and heated in the boiling water for 30 min. The reducing sugar concentration was then determined using the Lane-Eynon volumetric method [24]. Phenolic compounds were measured using the Folin-Ciocalteu method [25], with compounds extracted from approximately 5 g of fresh stevia leaves in 20 cm<sup>3</sup> of 80% methanol. To analyze nitrates, magnesium, potassium, calcium, and phosphorus, extracts were prepared according to Nowosielski [26]. Dried and ground leaves (0.4 g) were mixed with 100 cm<sup>3</sup> of 2% acetic acid and 1 g of activated carbon in screw-cap containers and shaken for 30 minutes at 150 rpm using a MaxQ2000 shaker (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The mixture was filtered, and the filtrate was used for subsequent element and ion concentration analyses.

Magnesium content was determined using a WPA S106 spectrophotometer (Biochrom, Cambridge, UK). Five cm<sup>3</sup> of the filtrate was mixed with 20 cm<sup>3</sup> of a compound reagent (containing sodium hydroxide, glycerol, hydroxylammonium chloride, polyvinyl alcohol, and titan yellow), and 3.5 cm<sup>3</sup> of this solution was transferred to the polystyrene cuvette (10 mm optical path) and absorbance was measured at 555 nm. A blank sample was prepared by adding 5 cm<sup>3</sup> of 2% acetic acid solution to 20 cm<sup>3</sup> of the compound reagent.

Phosphorus content was also assessed spectrophotometrically. Twenty cm<sup>3</sup> of the filtrate was mixed with 5 cm<sup>3</sup> of a reagent solution containing ammonium metavanadate and ammonium heptamolybdate, and 3.5 cm<sup>3</sup> of this mixture was transferred to the polystyrene cuvette (optical path of 10 mm) and absorbance was measured at 470 nm. A blank sample was prepared with 20 cm<sup>3</sup> of 2% acetic acid and 5 cm<sup>3</sup> of the reagent solution.

Calcium and potassium concentrations were analyzed using flame photometry utilising a Carl Zeiss Jena-type flame photometer. Nitrate ion concentration was measured in the filtrate using an Orion 5 Star ionometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) calibrated for 10–1000 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup> per dm<sup>3</sup> of the sample.

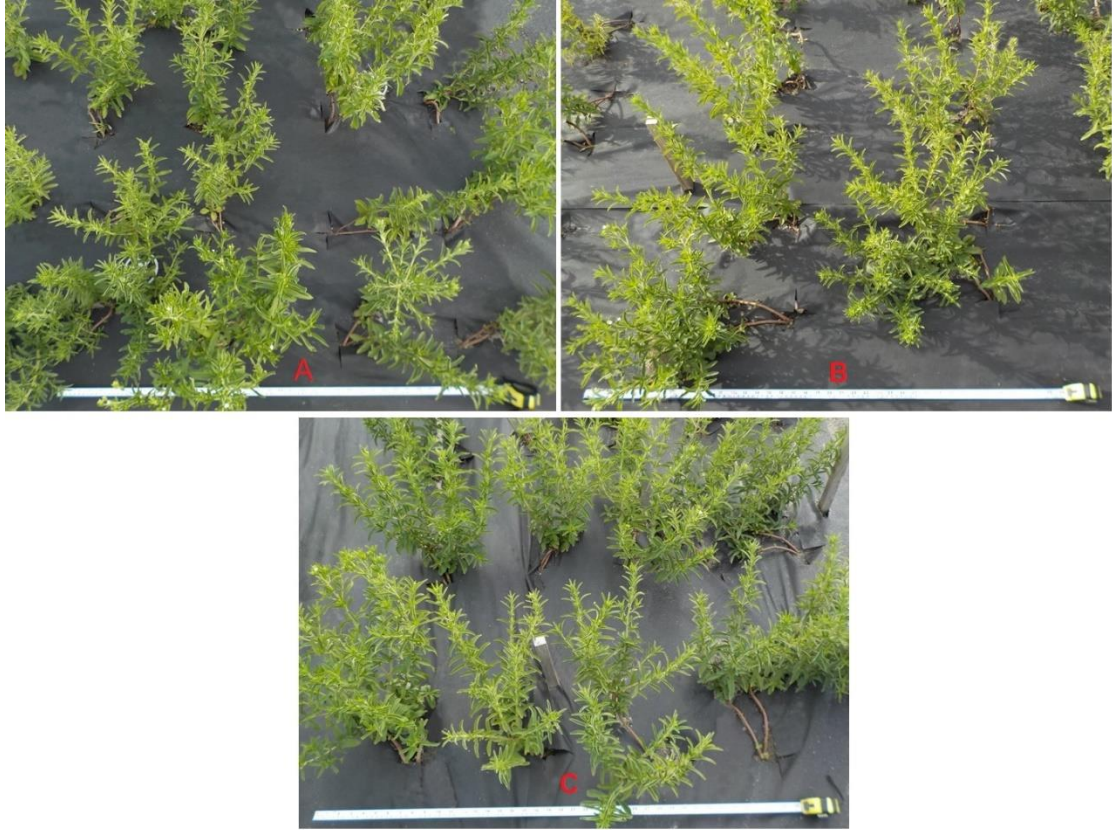
### 2.3. Data Analysis

Data gathered throughout the study were analysed statistically using Statistica 13 program (Statsoft, USA) using one-way ANOVA at  $\alpha = 0.05$ . Tukey test was used to determine homogenous groups. Principal component analysis (PCA) was conducted to compare analysed parameters of the stevia grown in different spacings. The single-linkage agglomerative method was used, employing the Euclidean measure to determine the distance between each analysed parameter and the samples of stevia.

### 3. Results

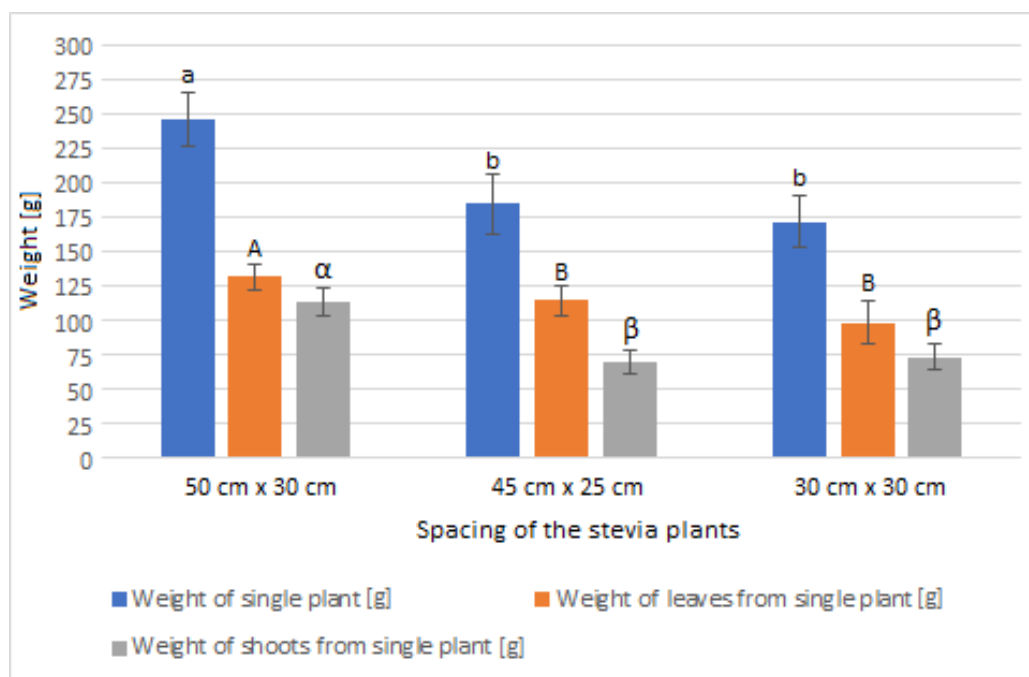
Results of the experiment have shown that there was a significant effect of various spacing of stevia plants on the growth, biometric measurements, yield and chemical composition of stevia plants.

Selected stevia plants grown in the study are presented on the Figure 1.



**Figure 1.** Stevia plants grown in the spacing of 30x30 cm (A), 45x25 cm (B) and 50x30 cm (C)

Greatest average weight of single plant, as well as average weight of leaves and shoots from a single plant was measured in the stevia plants grown in spacing equal to 50cm x 30 cm (Figure 2). Weight of the analysed plants was used to determine the yield of the stevia and is presented in the Table 2.



\*Data are given as means (n = 27) with standard deviation. Small letters show homogenous groups in the measurement of weight of the stevia plants (Tukey test,  $\alpha = 0.05$ ), capital letters show homogenous groups in the measurement of weight of the leaves from the stevia plants (Tukey test,  $\alpha = 0.05$ ), Greek letters show homogenous groups in the measurement of weight of the shoots from the stevia plants (Tukey test,  $\alpha = 0.05$ ).

**Figure 2.** Weight of the stevia plants grown in different spacings

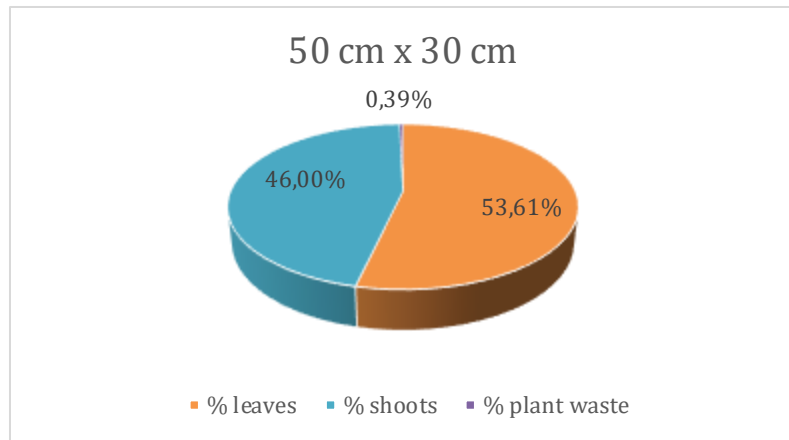
**Table 2.** Yield of the stevia plants grown in different spacings

Spacing	Yield of stevia plants [ $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$ ] <sup>1</sup>	Yield of stevia leaves [ $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$ ]	Yield of stevia shoots [ $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$ ]	Yield of plant waste [ $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$ ]
50x30 cm	1.62 ± 0.10 b	0.87 ± 0.11 b	0.75 ± 0.09 a	0.01 ± 0.01 a
45x25 cm	2.04 ± 0.15 a	1.26 ± 0.22 a	0.77 ± 0.07 a	0.01 ± 0.01 a
30x30 cm	1.89 ± 0.12 a	1.08 ± 0.10 a	0.81 ± 0.11 a	0.00 ± 0.00 a

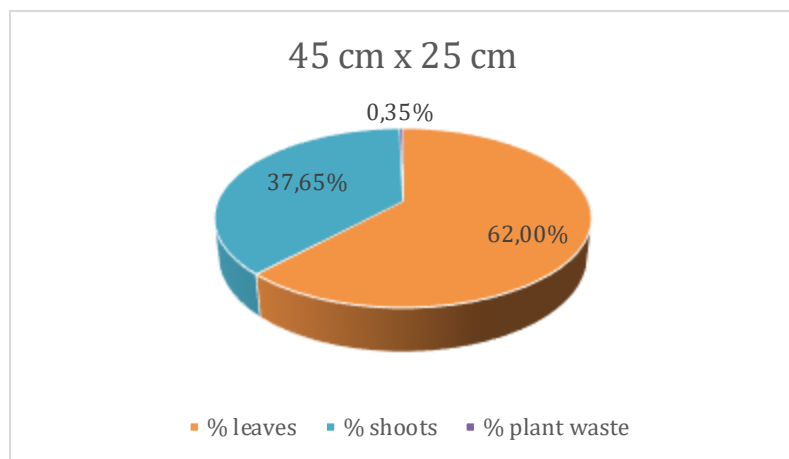
<sup>1</sup>Values are expressed as the mean (n = 27) ± standard deviation. Mean values with different letters (a, b,) within the same column are significantly different ( $\alpha = 0.05$ ) according to Tukey test.

At the same time, stevia plants grown in spacings of 45x25 cm and 30x30 cm were characterised with lower mass of each plant when compared to the spacing of 50x30 cm. Despite the greatest average weight of the single plants, leaves and shoots of the stevia plants grown in the spacing of 50x30 cm, yield of the stevia plants grown in the spacing of 50x30 cm was lower than in stevia plants grown in the spacing of 45x25 cm or 30x30 cm. Despite that difference, the yield of stevia shots and plant waste was similar in all the analysed samples. Additionally, stevia plants grown in the spacing 45x25 cm and 30x30 cm were characterised with greater percentage of the leaf weight in the total weight of the plant, with the highest for 45x25 cm, equal

to 62.00%, compared to 53.61% in the spacing 50x30 cm (Figure 3, Figure 4 and Figure 5)

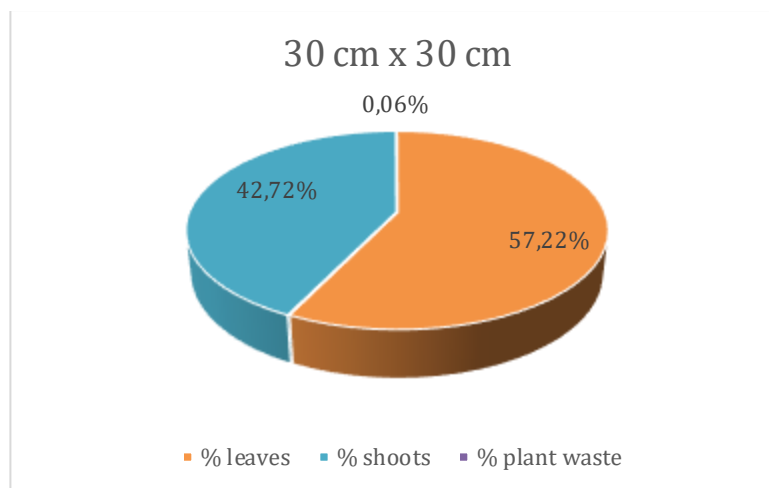


**Figure 3.** Contribution of various parts of the stevia plants (leaves, shoots and plant waste: dried and damaged leaves and shoots) in the total yield of stevia grown in the spacing of 50x30 cm



**Figure 4.** Contribution of various parts of the stevia plants (leaves, shoots and plant waste: dried and damaged leaves and shoots) in the total yield of stevia grown in the spacing of 45x25 cm





**Figure 5.** Contribution of various parts of the stevia plants (leaves, shoots and plant waste: dried and damaged leaves and shoots) in the total yield of stevia grown in the spacing of 30x30 cm

Analysis of biometric measurements (Table 3) in July has not shown any significant differences between stevia plants grown in different spacings, but measurements in September have shown that the height of the plants and number of leaves on the lowest lateral shoot was still similar, but width and number of shoots on a single plant was lower in stevia plants grown in the spacing of 45x25 cm and 30x30 cm.

**Table 3.** Biometric measurements of stevia plants grown in different spacings

Spacing <sup>1</sup>		50x30 cm	45x25 cm	30x30 cm
July	Plant height [cm]	28.65 ± 2.94 a	28.69 ± 3.15 a	27.65 ± 2.56 a
	Lateral width [cm]	20.50 ± 2.18 a	21.00 ± 3.27 a	20.00 ± 2.41 a
	Number of shoots of the first order	7.89 ± 1.52 a	7.56 ± 2.16 a	6.74 ± 1.58 a
	Number of leaves on the lowest lateral shoot	12.33 ± 2.94 a	12.74 ± 3.08 a	11.30 ± 1.98 a
September	Plant height [cm]	57.61 ± 4.52 a	59.35 ± 4.88 a	59.15 ± 5.12 a
	Lateral width [cm]	29.05 ± 1.04 a	27.00 ± 0.95 b	26.05 ± 1.64 b
	Number of shoots of the first order	16.8 ± 1.96 a	12.23 ± 1.52 b	10.23 ± 1.07 b
	Number of leaves on the lowest lateral shoot	26.44 ± 3.66 a	28.56 ± 3.42 a	25.41 ± 2.98 a

<sup>1</sup>Values are expressed as the mean (n=27) ± standard deviation. Mean values with different letters (a, b,) within the same column for different time of analysis (July or September) are significantly different ( $\alpha=0.05$ ) according to Tukey test.

Results of the analysis of elements and nitrates in the stevia leaves are shown in the Table 4.

**Table 4.** Concentration of nitrates and elements in the leaves of stevia plants grown in different spacings

		<b>N-NO<sub>3</sub></b>	<b>P</b>	<b>K</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>
<b>Spacing<sup>1</sup></b>		(mg·kg <sup>-1</sup> d.m.)	(mg·100 g <sup>-1</sup> d.m.)			
July	50x30 cm	1360.99 ±	134.58 ±	2648.61 ±	836.11 ±	166.11 ±
		143.11 a	14.48 a	84.12 a	21.49 a	5.92 a
	45x25 cm	1343.82 ±	126.39 ±	2554.17 ±	841.67 ±	168.89 ±
		125.52 a	17.45 a	59.04 a	19.83 a	10.14 a
	30x30 cm	1003.1 ±	117.5 ±	2465.28 ±	791.67 ±	143.89 ±
		97.43 b	19.83 a	49.51 b	12.90 b	6.43 b
September	50x30 cm	1856.18 ±	234.17 ±	2828.93 ±	861.94 ±	176.39 ±
		194.44 a	11.80 a	68.39 a	95.23 a	2.19 a
	45x25 cm	1219.28 ±	185.14 ±	2748.43 ±	888.18 ±	172.22 ±
		283.67 b	9.15 b	52.85 b	61.09 a	1.46 b
	30x30 cm	1073.57 ±	155.69 ±	2701.39 ±	835.31 ±	156.94 ±
		150.81 b	6.41 c	47.92 b	54.97 a	1.01 c

<sup>1</sup>Values are expressed as the mean (n=9) ± standard deviation. Mean values with different letters (a, b, c) within the same column for different time of analysis (July or September) are significantly different ( $\alpha=0.05$ ) according to Tukey test.

Stevia plants grown in the spacing of 30x30 cm were characterised with the lowest concentration of nitrate ions in July (1003.1 mg·kg<sup>-1</sup> f.m.) and in September (1073 mg·kg<sup>-1</sup> f.m.). However, stevia plants grown in the spacing of 50x30 cm and 45x25 cm were characterized with similar concentration of nitrate ions in July (1360.99 and 1343.82 mg·kg<sup>-1</sup> f.m., consecutively), but stevia plants grown in the spacing of 50x30 cm were characterized with greater concentration of nitrate ions in September (1856.18 mg·kg<sup>-1</sup> f.m.). In July, concentration of phosphorus was similar for all analyzed samples (in the range of 117.50-134.58 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m.), while, in September, it was highest in the stevia plants grown in the spacing 50x30 cm (234.17 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m.) and lowest in stevia plants grown in spacing of 30x30 cm (155.69 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m.). Concentration of potassium (Figure 14) was greater in the stevia samples harvested in September. Stevia grown in the spacing of 50x30cm was characterised with higher concentration of potassium than stevia grown in other

spacings. All analyzed samples were characterized with similar calcium content (Figure 15) in September (835.31-888.18 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m.), while in July highest concentration of calcium was detected in stevia plants grown in the spacing of 50x30 cm and 45x25 cm (836.11-841.67 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m.). Stevia plants grown in the spacing of 30x30 cm were characterised with lowest concentration of magnesium (Figure 16) in July (143.89 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m.) and September (156.94 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m.), while it was the highest in stevia plants grown in the spacing of 45x25 cm and 50x30 cm (166.11-168.89 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m. in July and 172.22-176.39 mg·100 g<sup>-1</sup> d.m. in September).

The various kinds of spacings between stevia plants also had an effect on the dry mass content, concentration of reducing sugars, concentration of vitamin C, phenolic compounds in the leaves of stevia plants, which are shown in the Table 5.

**Table 5.** Concentration of dry mass, reducing sugars, vitamin C and phenolic compounds in the leaves of stevia plants grown in different spacings

Spacing <sup>1</sup>	Dry mass	Reducing sugars	Vitamin C	Phenolic compounds	
	% [f.m.]		[mg·100g <sup>-1</sup> f.m.]		
July	50x30 cm	24.48 ± 3.15 a	1.42 ± 0.13 a	124.17 ± 2.84 c	187.61 ± 10.52 b
	45x25 cm	24.70 ± 2.95 a	1.08 ± 0.09 b	144.39 ± 2.12 a	176.86 ± 11.61 b
	30x30 cm	25.16 ± 2.18 a	0.72 ± 0.10 c	133.30 ± 1.98 b	202.11 ± 9.81 a
September	50x30 cm	26.55 ± 1.44 b	2.48 ± 0.36 a	134.19 ± 2.81 a	255.33 ± 18.94 b
	45x25 cm	26.66 ± 0.99 b	1.88 ± 0.15 b	125.92 ± 1.28 b	249.53 ± 26.51 b
	30x30 cm	28.67 ± 0.45 a	1.64 ± 0.29 b	126.90 ± 1.04 b	314.66 ± 29.49 a

<sup>1</sup>Values are expressed as the mean (n=9) ± standard deviation. Mean values with different letters (a, b, c) within the same column for different time of analysis (July or September) are significantly different ( $\alpha=0.05$ ) according to Tukey test.

Dry mass content was similar for all analyzed samples in June (24.48-25.16%), but in September, it was highest in the stevia plants grown in the spacing of 30x30 cm (28.67%). Despite that fact, stevia plants grown in the spacing of 30x30 cm were characterized with the lowest concentration of reducing sugars (0.72% in July and 1.64% in September), while stevia plants grown in the spacing of 50x30 cm were characterized with the highest concentration of sugars (1.42% in July and 2.48% in September). Concentration of vitamin C in July was highest for stevia plants grown in the spacing of 45x25 cm (144.39 mg·100g<sup>-1</sup> f.m.) and in September it was highest for stevia grown in the spacing of 50x30 cm (134.19 mg·100g<sup>-1</sup> f.m.). Total concentration of phenolic compounds varied significantly depending on the spacing of stevia plants as well as the time of the analysis. Stevia grown in the spacing of 30x30 cm was characterized with highest concentration of phenolic compounds in July (202.11 mg·100g<sup>-1</sup> f.m.) compared to 176.86-187.61 mg·100g<sup>-1</sup> f.m. in the stevia

grown in the spacing of 45x25 cm and 50x30 cm and it increased to 314.66 mg·100g<sup>-1</sup> f.m. in September.

Concentration of chlorophyll a+b (Table 6) was similar in all the analysed samples and it ranged from 1.26 to 1.42 mg·g<sup>-1</sup> f.m. in June and from 1.47 to 1.58 mg·g<sup>-1</sup> f.m. in September. Statistical analysis also has not shown significant differences between concentration of carotenoids in stevia samples: carotenoid content ranged from 2.68 to 2.80 mg·g<sup>-1</sup> f.m. in July and it ranged from 2.83 to 3.07 mg·g<sup>-1</sup> f.m. in September.

**Table 6.** Concentration of chlorophylls and carotenoids in the leaves of stevia plants grown in different spacings

Spacing <sup>1</sup>		Chlorophyll a+b	Total carotenoids
		(mg·g <sup>-1</sup> f.m.)	
July	50x30 cm	1.34 ± 0.11 a	2.70 ± 0.31 a
	45x25 cm	1.42 ± 0.15 a	2.80 ± 0.34 a
	30x30 cm	1.26 ± 0.14 a	2.68 ± 0.28 a
September	50x30 cm	1.47 ± 0.16 a	2.83 ± 0.30 a
	45x25 cm	1.58 ± 0.12 a	3.07 ± 0.35 a
	30x30 cm	1.54 ± 0.21 a	2.90 ± 0.26 a

<sup>1</sup>Values are expressed as the mean (n=9) ± standard deviation. Mean values with different letters (a, b, c) within the same column for different time of analysis (July or September) are significantly different ( $\alpha=0.05$ ) according to Tukey test.

Figure 6 and Figure 7 show results of the principal component analysis (PCA) of all analysed characteristics of stevia grown in different spacings. Dry mass content correlated positively with carotenoid content and correlated negatively with vitamin C content. Height of the plants correlated with number of leaves and these isometric characteristics correlated positively with concentration of chlorophyll and carotenoids. Number of shoots correlated concentration of potassium, calcium and phosphorus. Projection of the PCA results (Figure 7) shows, that in July, there were many similarities between stevia plants grown in the spacing of 50x30 cm and 45x25 cm, but in September, different spacings had greater influence on the differentiation of the characteristics of stevia.

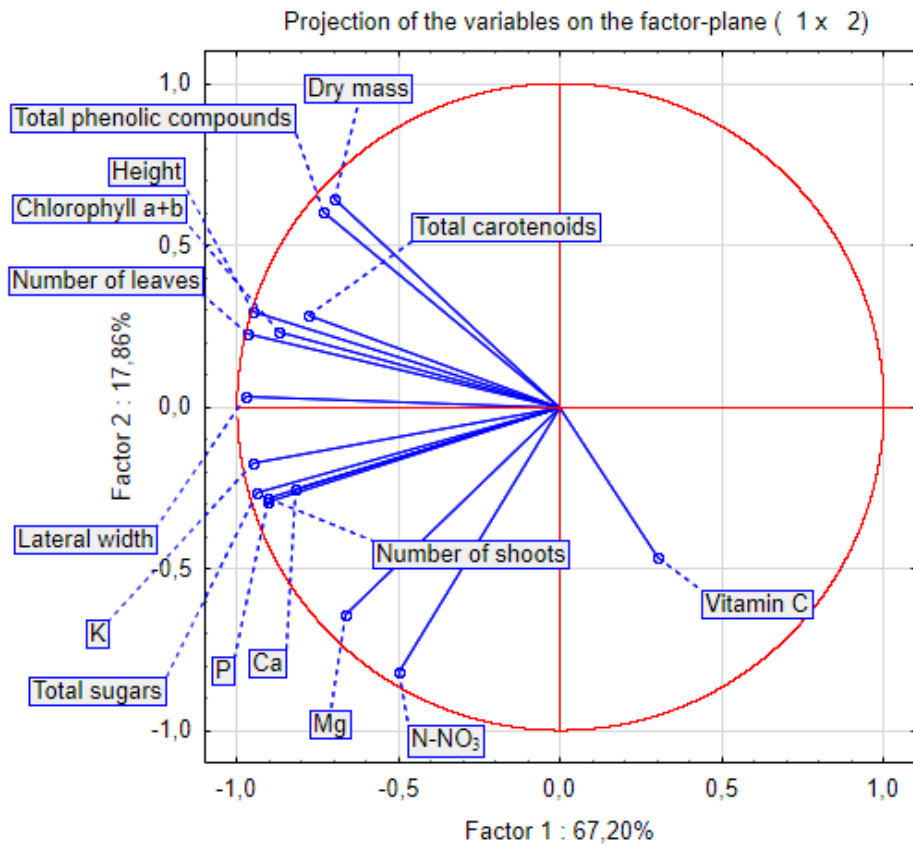


Figure 6. PCA analysis chart for characteristics of stevia grown in different spacings

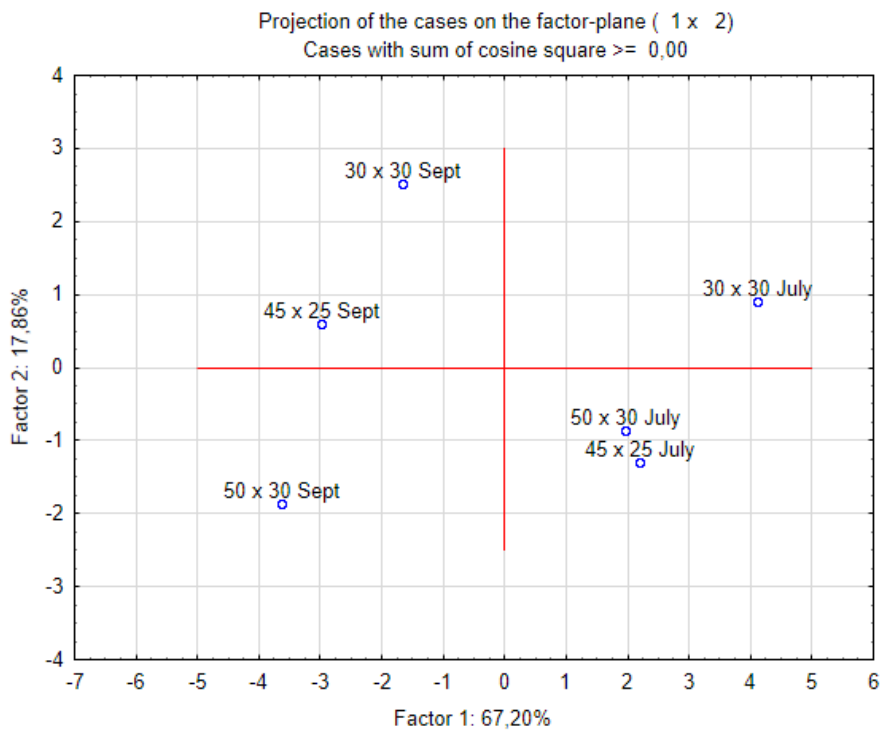


Figure 7. Projection of results of PCA analysis for characteristics of ste via grown in different spacings

#### 4. Discussion

Kumar et al. [27] acquired similar results regarding plant height of the stevia plants in a study, where *Stevia rebaudiana* seedlings were planted in the spacing of 30x30 cm and 45x30 cm and different spacings used in this study did not have an effect on the plant height. However, in the study of Kumar et al. [27], stevia plants grown in the spacing of 30x30 cm had a higher number of shoots than stevia plants grown in the spacing of 45x30 cm, which is contrary to the results acquired in this study. Observations conducted by Ramesh et al. [28] showed that with stevia perennial cultivation, roots of stevia plants increase over 30 cm over each side of the plant, which would suggest that the spacing should be greater than 30x30 cm. However, studies by Tan et al. [29], Liu et al. [30] and Kumari et al. [31], in which the spacing distance was equal to 20 cm have not shown any adverse effects of this factor. Additionally, from the point of the view of a farmer, yield of the stevia plants and, especially, stevia leaves is most important and smaller spacing distance has a positive effect on total yield of plants as well as leaves (mainly due to the greater number of plants per area), which was also confirmed by various scientists, such as Tadesse et al. [32], Singh et al. [33] and Taleie et al. [34]. Both during intensive growth in July and before harvest, in September, the spacing did not have significant effect on plant height, which was confirmed by earlier studies on stevia by Kumar et al. [27,35] and on *Chelidonium majus* L. by Mordalski et al. [36]. Spacing differentiated the number of shoots the plant formed, which became apparent especially at the end of the stevia cultivation. However, as mentioned before, a different effect was observed by Kumar et al. [27]. In his study, an increase of shoot number by 20% was determined in stevia plants grown in the spacing of 30x30 cm. However, in consecutive study by Kumar et al. [37], a greater shoot number was detected in stevia plants grown in the spacing of 45x45 cm in comparison with stevia plants grown in the spacing of 30x30 cm, 45x30 cm and 60x45 cm. Previous study about nitrogen fertilization of stevia plants grown in Poland by Śniegowska et al. [38] have shown, that stevia plants grown with various nitrogen fertilization (50, 100 or 150kg of N per hectare, in the form of ammonium nitrate, ammonium sulfate or urea) in the spacing of 45x20 cm were characterised with the average height of 57.86 cm, which is similar to the height acquired by the plants grown in the spacing of 50x30 cm of this study. Lateral width of unfertilized stevia plants grown by Śniegowska et al. [38] was equal to 26.61 cm, which is similar to the lateral width of the stevia grown in the spacing of 30x30 cm and 45x25 cm. Number of shoots of the stevia plants grown in the spacings of 50x30 cm and 45x25 cm was greater than the average number of shoots in the study of Śniegowska et al. [38], which was equal to 10.97. Stevia plants grown in the study about nitrogen fertilization were, however, characterised with greater average number of leaves on the lowest lateral shoot (29.21) than stevia grown in different spacings. In the study of Büyük et al. [39], stevia plants grown in the spacing of 70x33 cm in Turkey were characterised with the average height of 68.1 cm, which is significantly greater than the height of the stevia plants grown in different spacings in Poland. Stevia plants in the study by Büyük et al. [39] were also characterised with greater number of shoots, equal to 20.4 per plant. Contrary to biometric measurements, different kinds of spacing had significant influence on the chemical composition of the stevia leaves, which was done in two periods, in July, during the stevia intensive growth, as well as in September, prior to harvest. Different authors have not analysed the influence of plant spacing on concentration of various components in the stevia leaves. In different plants, such as *Sorghum saccharatum* (L.) Moench, changes in the spacing of the plants have not shown any significant influence on the concentration of various minerals in the plant tissues [40]. Similar results have been noted for Columbus grass (*Sorghum almum* stapf) [41]. However, it seems that plant variety can have a

tremendous importance in the matter of the concentration of elements and spacing in the cultivation. For example, as was shown in the study over a broccoli by Grabowska et al. [42], the phosphorus content was greatest in the plants grown with the largest spacing, similar to the stevia plants grown in this study. In the study by Büyük [39], stevia plants were characterised with average phosphorus level similar, albeit slightly smaller (0.27%) to the concentration acquired by stevia plants grown in the spacing of 50x30 cm. However, total potassium content of the plants analyzed by Büyük [39] was almost two-times lower than the content of potassium in the stevia plants grown in Poland. However, stevia plants analyzed by Śniegowska et al. [38] were characterised with similar potassium concentration. However, phosphorus content of the stevia plants grown by Śniegowska et al. [38] was similar to the concentration of the phosphorus of stevia plants grown in the spacing of 45x25 cm and 30x30 cm, but lower than in stevia plants grown in the spacing of 50x30 cm. This might indicate that spacing of the plants could affect total concentration of phosphorus in stevia plants. Different results can be seen in the concentration of calcium and magnesium. Average concentration of calcium and magnesium in the stevia plants grown in the study by Śniegowska et al. [38] were characterised with concentration of these elements greater by 20-25%. Additionally, plant spacing can affect the root system of various plants and nitrate capture seems to be affected by the architecture of roots of the plants, which might explain why stevia plants grown in the largest spacing (50x30 cm) are characterised with highest nitrate content [43]. The stevia plants grown by Śniegowska et al. [38] in the study about the nitrogen fertilization were, however, characterised with similar concentration of nitrates as the plants grown in the spacing of 30x30 cm and lower than plants grown in the spacing of 50x30 cm. This results can suggest, that it is not exactly direct influence of the plant spacing, but availability of the nitrogen of the plant, because nitrogen fertilization was applied per area, not per plant, therefore plants grown in a greater spacing had greater amount of fertilized soil available for them. Currently, there is no data regarding influence of plant spacing on the concentration of phenolic compounds or vitamin C in stevia plants, but some authors performed similar analysis regarding other plant species. Analysis by Riad et al. [44] over cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) during which various planting densities (4, 6 and 8 plants per square meter) were analysed have not shown any significant difference in the concentration of phenolic compounds or vitamin C. However, study by Mujahid & Gupta [45] conducted on the *Lactuca sativa* have shown, that denser plantation results in lower concentration of vitamin C and carotenoids. Similar results could be noted for the concentration of vitamin C in the stevia plants, as, in September, stevia plants grown in the smallest spacing (30x30 cm) were characterised with lower concentration of vitamin C than stevia plants grown in the spacing of 50x30 cm. However, study by Śniegowska et al. [38] over stevia plants grown with different nitrogen fertilization has shown, that stevia plants were characterised with concentration of phenolic compounds similar to the concentration detected in the plants grown in the spacing of 50x30 cm and 45x25 cm. The stevia plants in the study of Śniegowska et al. [38] were also characterised with similar vitamin C content, as the stevia plants grown in the spacing of 50x30 cm. Concentration of carotenoids and chlorophyll (a+b) was not affected by the differences in plant spacing, similar as in the cultivation of garlic, described in the study of Rekowska & Skupień [46]. This data is contrary to the study of Ren et al. [47] on maize, in which increasing density of planting increased concentration of carotenoids, but had no significant impact on the concentration of chlorophyll at the time of harvest. Dry mass content of stevia leaves in July was similar, but before harvest, plants grown in the spacing of 30x30 cm were characterised with dry mass content. Meta-analysis by Postma et al. [48] over hundreds of plant species has

shown that it is a typical phenomenon during plant cultivation. All these results indicate that different spacing of stevia plants can have a significant impact on the quality of the plant material. It is important, however, to note that the main goal for stevia plantation is the greatest yield of stevia leaves of good quality, which was determined for the spacing of 30x30 cm and 45x25 cm.

## 5. Conclusions

The study showed that spacing of stevia plants has a significant influence on yield and chemical composition of stevia leaves. Data gathered in this study shows that by changing spacing of the stevia plants grown in Poland, final chemical composition of the plant material, as well as yield might be modified. The greatest weight of the plant and the greatest weight of the leaves from the plant was noted for the stevia planted in the spacing of 50x30 cm, but greatest total yield (of plants and leaves alike) was noted for the stevia plants grown in the spacing of 45x25 and 30x30 cm, which were also characterised with the greatest percentage of the leaves in the total weight of the plant and yield. In July, no significant differences in the biometric measurements were determined, irrespectively of the spacing used. In September, the crucial difference was noted for the stevia plants grown in the 50x30 cm spacing, which were characterised with the largest width and largest number of shoots, but differences in the spacing had no effect on the height of the plants or average amount of leaves on the shoot. Stevia plants grown in the smallest spacing (30x30 cm) were characterised with greatest concentration of dry mass and phenolic compounds, but smaller number of plants per unit area resulted in increased content of various elements and nitrate ions in stevia leaves. However, taking in to account all analysed parameters, spacing of 45x25 cm is recommended due to the high yield and large percentage of leaves in the yield characterised with good quality.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.B. and J.Ś.; methodology, A.B. and J.Ś.; software, J.Ś.; validation, A.B. and J.Ś.; formal analysis, J.Ś.; investigation, J.Ś.; resources, A.B.; data curation, J.Ś.; writing – original draft preparation, J.Ś.; writing – review and editing, A.B. and J.Ś.; supervision, A.B.; project administration, A.B.; funding acquisition, A.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The article is part of a PhD dissertation titled 'The effect of selected agronomic factors on growth, yielding and chemical composition of *Stevia rebaudiana* Bert.', prepared during Doctoral Studies at the Wrocław University of Environmental and Life Sciences. The APC is financed by Wrocław University of Environmental and Life Sciences.

**Data Availability Statement:** Data are available from authors on a reasonable request.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Kulczyński B.; Gramza-Michałowska A.; Człapka-Matysik M. Dietary characteristics of Stevia- current state of knowledge. *Bromat. Chem. Toksykol.*, **2015**, 47 (1), 11-18.
2. Bugaj B.; Leszczyńska T., Pysz M., Kopeć A., Pacholarz J., Pysz- Izdebska K. Profile and pro-health properties of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Żywn. Nauka. Technol. Jakość.* **2013**, 3 (88): 27-38.
3. Bastaki S. Pharmacotherapy of nonnutritive sweeteners in diabetes mellitus. *Int. J. Diabetes & Metab.*, **2015**, 23(1), 11-22. <https://doi.org/10.1159/000497734>
4. Sharangi A. B.; Bhutia P. H. Stevia: Medicinal Miracles and therapeutic magic. *Int. J. Crop Sci. Technol.* **2016**, 2(2), 45-59.
5. Ferreira E. B.; Neves F. D. A. R.; da Costa M. A. D.; do Prado W. A.; Ferri L. D. A. F.; Bazotte R. B. Comparative effects of *Stevia rebaudiana* leaves and stevioside on glycaemia and hepatic gluconeogenesis. *Planta med.*, **2006**, 72(08), 691-696. <https://doi.org/10.1055/s-2006-931586>
6. Aswar U.; Gogawale V.; Miniyar P.; Patil Y. Beneficial effects of Stevioside on AGEs, blood glucose, lipid profile and renal status in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Appl. Biomed.*, **2019**, 17(3). <https://doi.org/10.32725/jab.2019.013>



7. Marcinek K.; Krejpcio Z. *Stevia rebaudiana* Bertoni: health promoting properties and therapeutic applications. *J Verbrauch Lebensm* **2016**, *11*, 3-8.
8. Mohd-Radzman N.H.; Ismail W.I.W.; Jaapar S.S.; Adam Z.; Adam A. Stevioside from *Stevia rebaudiana* Bertoni increases insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes. *Evid Based Complement Alternat*, **2013**, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/938081>
9. Saravanan R.; Vengatash babu K.; Ramachandran V. Effect of Rebaudioside A, a diterpenoid on glucose homeostasis in STZ-induced diabetic rats. *J. Physiol. Biochem.*, **2012**, *68*, 421-431. <https://doi.org/10.1007/s13105-012-0156-0>
10. Khatun M. C. S.; Muhit M. A.; Hossain M. J.; Al-Mansur M. A.; Rahman S. A. Isolation of phytochemical constituents from *Stevia rebaudiana* (Bert.) and evaluation of their anticancer, antimicrobial and antioxidant properties via *in vitro* and *in silico* approaches. *Heliyon*, **2021**, *7*(12). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08475>
11. Atas M.; Eryugur N.; Ucar E.; Ozyigit Y.; Turgut K. The Effects of different nitrogen doses on antioxidant and antimicrobial activity of *Stevia rebaudiana* Bert.). *CellMol Biol* **2018**, *64*(2), 39-45. <https://doi.org/10.14715/cmb/2018.64.2.8>
12. Vishvakarma, P.; Mandal, S.; Pandey, J.; Bhatt, A. K.; Banerjee, V. B.; & Gupta, J. K. An Analysis Of The Most Recent Trends In Flavoring Herbal Medicines In Today's Market. *J. Pharm, Negat. Results*, **2022**, 9189-9198.
13. Williamson, E.M.; Liu, X.; Izzo, A.A. Trends in use, pharmacology, and clinical applications of emerging herbal nutraceuticals. *Br. J. Pharmacol.* **2020**, *177*, 1227–1240.
14. Jadhav, C.A.; Vikhe, D.N.; Jadhav, R.S. Global and domestic market of herbal medicines: A review. *Res. J. Sci. Tech.* **2020**, *12*, 327–330.
15. Samuel, P.; Ayoob, K.T.; Magnuson, B.A.; Wölwer-Rieck, U.; Jeppesen, P.B.; Rogers, P.J.; Rowland, I.; Mathews, R. *Stevia* Leaf to *Stevia* Sweetener: Exploring Its Science, Benefits, and Future Potential. *J. Nutr.* **2018**, *148*, 1186S–1205S.
16. Enthoven, L.; Van den Broeck, G. Local food systems: Reviewing two decades of research. *Agric. Syst.* **2021**, *193*, 103226.
17. Li, M.; Jia, N.; Lenzen, M.; Malik, A.; Wei, L.; Jin, Y.; Raubenheimer, D. Global food -miles account for nearly 20% of total food-systems emissions. *Nat. Food* **2022**, *3*, 445–453.
18. Peake, A.S.; Bell, K.L.; Fischer, R.A.; Gardner, M.; Das, B.T.; Poole, N.; Mumford, M. Cultivar× management interaction to reduce lodging and improve grain yield of irrigated spring wheat: Optimising plant growth regulator use, N application timing, row spacing and sowing date. *Front. Plant Sci.* **2020**, *11*, 401.
19. Haegele, J.W.; Becker, R.J.; Henninger, A.S.; Below, F.E. Row arrangement, phosphorus fertility, and hybrid contributions to managing increased plant density of maize. *Agron. J.* **2014**, *106*, 1838–1846.
20. Craine, J.M.; Dybzinski, R. Mechanisms of plant competition for nutrients, water and light. *Funct. Ecol.* **2013**, *27*, 833–840.
21. PN-90/A-75101/03:1990 Determination of dry matter content
22. PN-90/A-75101/11 Determination of vitamin C content
23. Rumińska A.; Suchorska K.; Węglarz Z. Medicinal and special plants. SGGW-AR, **1990**, Warszawa.
24. PN-90/A-75101/07:1990 Determination of sugar content
25. Slinghart K.; Singleton V. L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual method. *Am. J. Enol. Vitic.* **1977**, *28*: 49–55. <https://doi.org/10.5344/ajev.1977.28.1.49>
26. Nowosielski O. Methods for determining fertilizer requirements. PWRiL, Warszawa. **1974**, 1-91.
27. Kumar R.; Sood S.; Sharma S.; Kasana R.C.; Pathania V.L.; Singh B.; Singh R. D. Effect of plant sparing and organic mulch on growth, yield and quality of natural sweetener plant *Stevia* and soil fertility in western Himalayas. *Int. J. Plant Prod.*, **2014a**, *8* (3), 311-334.
28. Ramesh K.; Singh V.; Megeji N.W. Cultivation of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: a comprehensive review. *Adv Agron* **2006**, *89*: 137-177. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(05\)89003-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(05)89003-0)
29. Tan S. L.; Muhammad Ghawas M.; Mohamad Najib M. Y.; Zawayi M. Preliminary evaluation and selection of *stevia* under Malaysian conditions. *J Trop Agric. Food Sci.*, **2008**, *36*(2), 000-000.
30. Liu X.; Ren G.; Shi Y. The effect of organic manure and chemical fertilizer on growth and development of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Energy Procedia*, **2011**, *5*, 1200-1204. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2011.03.210>
31. Kumari S.; Ghosh G.; Meshram M. R. TSS, yield and energetics of *stevia* as influenced by nitrogen levels and spacing under eastern UP conditions. *Agric. Sci. Dig.* **2021**, *41*(2), 319-323. <https://doi.org/10.18805/ag.D-5199>
32. Tadesse N.; Gebere A.; Lulie B.; Hordofa M. Influence of plant population density on growth and yield of *Stevia rebaudiana* Bertoni L.) at Wondo Genet South Ethiopia. *Acad. Res. J. Agri. Sci. Res.*, **2016**, *4*(6): 321-329. <https://doi.org/10.14662/ARJASR2016.038>
33. Singh B.; Singh J.; Kaur A. Agro-production, processing and utilization of *Stevia rebaudiana* as natural sweetener. *J Agric Eng Food Technol.* **2014**, *1*(1), 28-31.
34. Taleie N.; Hamidoghli Y.; Rabiei B.; Hamidoghli S. Effects of plant density and transplanting date on herbage, stevioside, phenol and flavonoid yield of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Intl. J. Agra. Crop. Sci.*, **2012**, *4*(6), 298-302.
35. Kumar R.; Sharma S.; Ramesh K.; Singh B. Effects of shade regimes and planting geometry on growth, yield and quality of the natural sweetener plant *Stevia rebaudiana* Bertoni) in North-western Himalaya. *Arch. Agron. Soil Sci.*, **2013**, *59* (7), 963-979. <https://doi.org/10.1080/03650340.2012.699676>
36. Mordalski R.; Kucharski W.A.; Gryszczyńska A.; Buchwald W. Impact of raw sparing on the yield of *Chelidonium majus* L. herb and biological value of raw material. *Post Fitoter* **2014**, *3*: 150-154.

37. Kumar R.; Sharma S.; Sood S. Yield components, light interception and marker compound accumulation of *Stevia rebaudiana* Bertoni affected by planting material and plant density under western Himalayan conditions. *Arch. Agron. Soil Sci.*, **2014b**, 60 (12), 1731-1745. <https://doi.org/10.1080/03650340.2014.909029>
38. Śniegowska, J.; Biesiada, A.; Gasiński, A. Influence of the Nitrogen Fertilization on the Yield, Biometric Characteristics and Chemical Composition of *Stevia rebaudiana* Bertoni Grown in Poland. *Molecules* **2024**, 29, 1865. <https://doi.org/10.3390/molecules29081865>
39. Villalbazo-García, T. D. C.; Hernández-Zárate, G.; Trejo-Téllez, L. I.; Bello-Bello, J. J. Endomycorrhizal fungi inoculation improves development of *Stevia rebaudiana* Bertoni plantlets during ex vitro acclimatization. *Symbiosis*, **2023**, 90(1), 53-60.
40. Kruczek A. Chemical composition of sucro- sorghum in dependence of the sowing term, plants density and distance of rows. *Nauka Przyr. Technol.*, **2014**, 8 (3), 1-10.
41. Olanite J. A.; Anele U. Y.; Arigbede O. M.; Jolaosho A. O.; Onifade O. S. Effect of plant spacing and nitrogen fertilizer levels on the growth, dry-matter yield and nutritive quality of Columbus grass (*Sorghum almum* Stapf) in southwest Nigeria. *Grass Forage Sci* **2010**, 65(4), 369-375. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.2010.00755.x>
42. Grabowska A.; Sękara A.; Kunicki E.; Kalisz A. Content of macroelements in index part of broccoli in relation to cultivation method and spacing. *Acta Agroph.*, **2013**, 20 (2), 295-314.
43. Dunbabin V.; Diggie A.; Rengel, Z. Is there an optimal root architecture for nitrate capture in leaching environments? *Plant, Cell Environ* **2003**, 26(6), 835-844. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.01015.x>
44. Riad G.; Ghoname A.; Ahmed A.; El-Baky M. A.; Hegazi A. Cabbage nutritional quality as influenced by planting density and nitrogen fertilization. *Fruit, Veg. Cereal Sci. Biotech.* **2009**, 3(1), 68-74.
45. Mujahid A. M.; Gupta A. J. Effect of plant spacing, organic manures and inorganic fertilizers and their combinations on growth, yield and quality of lettuce (*Lactuca sativa*). *Indian J. Agric. Sci.* **2010**, 80(2).
46. Rekowski E.; Skupień K. Estimation of yield and chemical composition of winter garlic grown for bunch-harvest. *J. Cent. Eur. Agric.* **2008**, 9 (4): 711-714
47. Ren B.; Liu W.; Zhang J.; Dong S.; Liu P.; Zhao B. Effects of plant density on the photosynthetic and chloroplast characteristics of maize under high-yielding conditions. *Sci Nat.* **2017**, 104, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s00114-017-1445-9>
48. Postma J. A.; Hecht V. L.; Hikosaka K.; Nord E. A.; Pons T. L.; Poorter H. Dividing the pie: A quantitative review on plant density responses. *Plant, Cell Environ* **2021**, 44(4), 1072-1094. <https://doi.org/10.1111/pce.13968>

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

3. "Irrigation practice in the cultivation of *Stevia rebaudiana* Bert. in cooler climates - case study in Poland."



Article

# Irrigation practice in the cultivation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in cooler climates - case study in Poland

Joanna Śniegowska <sup>1,2,\*</sup>, Anita Biesiada <sup>1</sup> and Alan Gasiński <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Horticulture, Wrocław University of Environmental and Life Sciences;

katedra.ogrodnictwa@upwr.edu.pl

<sup>2</sup> Department of Fermentation and Cereals Technology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences; ktfiz@upwr.edu.pl

\* Correspondence: joanna.sniegowska@upwr.edu.pl

**Citation:** To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname  
Lastname

Received: date

Revised: date

Accepted: date

Published: date



**Copyright:** © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** *Stevia rebaudiana* Bertoni originated in the South America, but has gained popularity due to the concentration of sweet steviol glycosides present in its leaves. Stevia is also currently grown on other continents in many countries characterised with warm climate. This research aimed to determine whether different irrigation practice might have a significant influence on yield and composition of the leaves of stevia plants grown in Poland, in cooler climate than native regions for stevia plants. Stevia plants were grown with four different irrigations regimes: irrigation twice a week, irrigation once a week, irrigation only during times of the drought and not irrigated at all. It was determined that different irrigation regimes have substantial effects on the yield, biometric characteristics and chemical composition of stevia leaves, but neither of the irrigation regimes was clearly supreme to the others. Yield of stevia plants which were irrigated once a week or only during the drought times was the highest (2.42-2.58 kg per square meter). Stevia plants, which were not irrigated were characterised with the lowest height and lateral width (47.61 and 25.35 cm). Leaves of un-irrigated stevia contained greatest dry mass content (30.47%) and highest concentration of phenolic compounds (337.88 mg per 100g of fresh stevia leaves). Stevia plants which were irrigated once or twice a week were characterised with lower concentration of chlorophylls or carotenoids at the time of the harvest (1.20-1.24 and 2.54-2.58 mg per gram of fresh stevia leaves), but stevia plants which were not irrigated contained greater amount of chlorophyll and carotenoids (1.58 and 3.17 mg per gram of fresh stevia leaves).

**Keywords:** water stress, yield, biometric measurements, elements

## 1. Introduction

*Stevia rebaudiana* Bertoni is a herbaceous plant originating from Paraguay, grown primarily for its high concentration of glycosides, which are up to 300 times sweeter than most commercially available sweetener - sugar [1]. Cultivation of this plant represents an increasing field of interest in agricultural research and sustainable food production. Remarkable sweetness of stevia is not its only advantage, as this plant is characterised with low calorie content and its consumption has a minimal influence on blood glucose levels [2]. Stevia is also a source of important antioxidants, such as polyphenolic metabolites including, flavons, flavonols, and chlorogenic acids [3].

Due to these properties, stevia plant is widely used in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries [4]. As the consumer preferences are changing towards low-calorie options, cultivation of this plant in diverse geographic regions, outside of South America become more interesting to researchers and farmers [5]. Additionally, growing this plant in the country in which it would be used offers several advantages over shipping them from distant locations. It can result in decreased carbon emissions due to reduced transport distance [6]. Locally grown plants can reduce the costs of the final product due to lower shipping costs. Additionally, plants grown locally can be sold fresh, without the need of extensive drying techniques, reducing costs, environmental impact, and increasing quality of the final product [7].

Cultivation of plants in the country in which they will be consumed or used to produce various other products supports the local economy and decreases the reliance on the imported goods. Local production also allows for better traceability and transparency in the supply chain, which can increase food safety and consumer trust [7-8]. Furthermore, local cultivation can enable farmers to use cultivation practices which are typical for local environmental conditions and to produce plant material which would be acceptable for consumers from that particular region or country ([7-9]. However, unfortunately, as stevia originated in South America, its physiology might not be suitable for cultivation in cooler climates.

Poland is a country with temperate seasonal climate, characterised with relatively cold winters and rather short summers. The cooler temperatures and varying precipitation patterns suggest a reevaluation of traditional cultivation practices to optimize Stevia's growth and yield in this region. One of the key factors in a successful cultivation of herbaceous plants is irrigation regime, because various plants benefit greatly from the proper water management and lack of water during cultivation of these plants can result in poor yield and unsatisfactory raw material quality [10-15]. Plants grown with inadequate amount of water are also often characterised with worse organoleptic properties, such as taste and aroma, which is important for potential consumers of these products [11-13]. Water stress during growth of the plants can also influence concentration of various elements or bioactive components, such as phenolic acids or vitamins, therefore it is an important factor in the cultivation of plants, which could potentially be used in the production of food products [10]. During this study four types of irrigation (or lack thereof) were investigated in *Stevia rebaudiana* plants grown in Polish climate: watering two times a week, watering one time a week, watering only during drought periods and no watering at all. The goal of this study was to determine, whether *Stevia rebaudiana* can be grown in Poland using different irrigation regimes and assessment of the yield of the stevia plants gathered through the study. Additionally, biometric characteristics of stevia plants and chemical composition of the raw material was analysed.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study site, Experimental Design, and Cultivation Conditions

Field experiments using *Stevia rebaudiana* plants were conducted in the Wrocław University of Environmental and Life Sciences: at the Research and Didactic Station in Psary (51°19'055913609418"N, 17°03'36781036313"E; 113 meters over the sea level). Stevia plants used in the experiment were planted on black degraded soil characterized with humus content of 1.8% in the years 2014, 2015, and 2016. Table 1 shows the temperature and amount of rainfall during the time of the experiment at the stevia planting area.

**Table 1.** Rainfall and temperature on site of the experiment during the time of the stevia growth

Month	Decade	2014		2015		2016	
		[°C]	[mm]	[°C]	[mm]	[°C]	[mm]
May	1st	11.4	30.3	13.3	12.3	15.4	14.0
	2nd	12.2	33.6	13.0	14.0	15.5	12.0
	3rd	17.3	42.8	14.0	0.5	20.9	0.0
	<b>Monthly average</b>	<b>13.8</b>	<b>106.7</b>	<b>13.4</b>	<b>26.8</b>	<b>17.3</b>	<b>26.0</b>
June	1st	18.4	8.2	18.1	11.0	21.1	9.4
	2nd	16.6	0.3	16.4	23.1	18.5	59.0
	3rd	15.7	15.4	15.8	32.2	23.8	0.8
	<b>Monthly average</b>	<b>16.9</b>	<b>23.9</b>	<b>16.8</b>	<b>66.3</b>	<b>21.1</b>	<b>69.2</b>
July	1st	20.5	20.0	20.5	11.0	20.5	39.5
	2nd	22.5	0.0	20.3	38.9	20.1	70.5
	3rd	22.6	26.1	19.9	3.3	23.8	24.5
	<b>Monthly average</b>	<b>21.9</b>	<b>46.1</b>	<b>20.2</b>	<b>53.2</b>	<b>21.5</b>	<b>134.5</b>
August	1st	21.7	17.5	27.2	0.0	20.4	5.8
	2nd	17.4	13.1	25.2	0.0	19.7	5.0
	3rd	15.9	35.0	23.1	2.1	21.3	13.3
	<b>Monthly average</b>	<b>18.3</b>	<b>65.6</b>	<b>25.2</b>	<b>2.1</b>	<b>20.5</b>	<b>24.1</b>
September	1st	17.2	24.1	17.1	16.4	21.2	11.5
	2nd	18.6	21.6	18.8	0.0	19.3	45.8

3rd	14.0	14.3	14.1	0.0	15.0	0.0
<b>Monthly average</b>	<b>16.6</b>	<b>60.0</b>	<b>16.7</b>	<b>16.4</b>	<b>18.5</b>	<b>57.3</b>

The experiment was performed in one-factor randomized block design in quadruple repetitions, on the plots with the area of 1m<sup>2</sup> with the total of sixteen plots. Total area of the experiment (experimental plots and uncultivated areas of the field used to divide the experimental plots) was equal to 33.25 m<sup>2</sup>. The variable factor of the experiment was different type of irrigation practice. Four plots were not irrigated at all (0W), four plots were irrigated once a week (1W), four plots were irrigated two times a week (2W) and four plots were irrigated only during the dry periods (no rainfall: NR) in the period from three weeks after planting the seedlings into the soil up to the harvest (phase of the intensive growth of stevia plants). Amount of water used during each of the watering (for the samples NR, 1W and 2W) was equal to 20mm. The seedlings were obtained from an own heated greenhouse, where seedlings were grown in the plastic boxes filled with peat substrate. Seeds of *Stevia rebaudiana* 'Sweet Herb' variety were sown in the first decade of April. Three weeks after sowing, stevia plants were transferred to 54-cell plastic trays filled with peat substrate. In second decade of May, plants with at least three pairs of foliage leaves were planted to the 10 cm pots filled with peat substrate. Stevia plants were planted during the first decade of June into the plots, which have been preplant fertilized with ammonium nitrate at 100 kg N·ha<sup>-1</sup> and mulched black agrotexile. In the third decade of July, plants were top-dressed fertilized with ammonium nitrate (50 kg N·ha<sup>-1</sup>). Concentration of phosphorus in the soil was equal to 45 mg·dm<sup>-3</sup>; concentration of potassium in the soil was equal to 310 mg·dm<sup>-3</sup>; concentration of calcium was equal to 2800 mg·dm<sup>-3</sup>; concentration of magnesium was equal to 34 mg·dm<sup>-3</sup>.

2.2. Evaluated Variables Plants were harvested in the second decade of September each year, before flowering stage (average of 102 after transplanting to the field). After the harvest, plants were weighed to assess the total yield of the herbs and leaves (kg·m<sup>-2</sup>) and these data were then used to calculate percentage of leaves in the yield. After weighing the single plants, leaves and shoots from single plant were also weighed to determine their percentage in the total yield. Additionally, once during June and once in September, after the harvest, healthy leaves gathered from the mid-plant height were used for chemical analyses. Amount of measurements per year was three in July and in September. Biometric measurements such as plant height (cm), lateral width (cm), number of shoots (of the first order), total number of leaves on the lowest lateral shoot were taken just before the harvest in September. Biometric measurements were performed for three plants from each field, to a total of twelve plants for one irrigation method. In leaves, dry mass content was measured by the gravimetric method (PN-90/A-75101/03) [16]. Subsequently, concentration of ascorbic acid (vitamin C) was measured using Tillman's method (PN-90/A-75101/11) [17]. Content of chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoids was measured spectrophotometrically in the fresh plant material using method by Bieniek (2012), while total concentration of reducing sugars was measured using method described previously by Godlewska et al., (2021) (PN-90/A-75101/07) [18-20]. Concentration of phenolic compounds in the stevia leaves was measured using Folin-Ciocalteu method modified by Godlewska et al. (2021) and content of nitrated, phosphorus, potassium, magnesium, and calcium was measured using universal method by Nowosielski (1971) [20-21].

### 2.3. Statistical Analysis

Results were subjected to statistical analysis in the Statistica program, using one-way ANOVA utilizing the Duncan's test at confidence level  $\alpha = 0.05$  to determine homogenous groups.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Yield of stevia

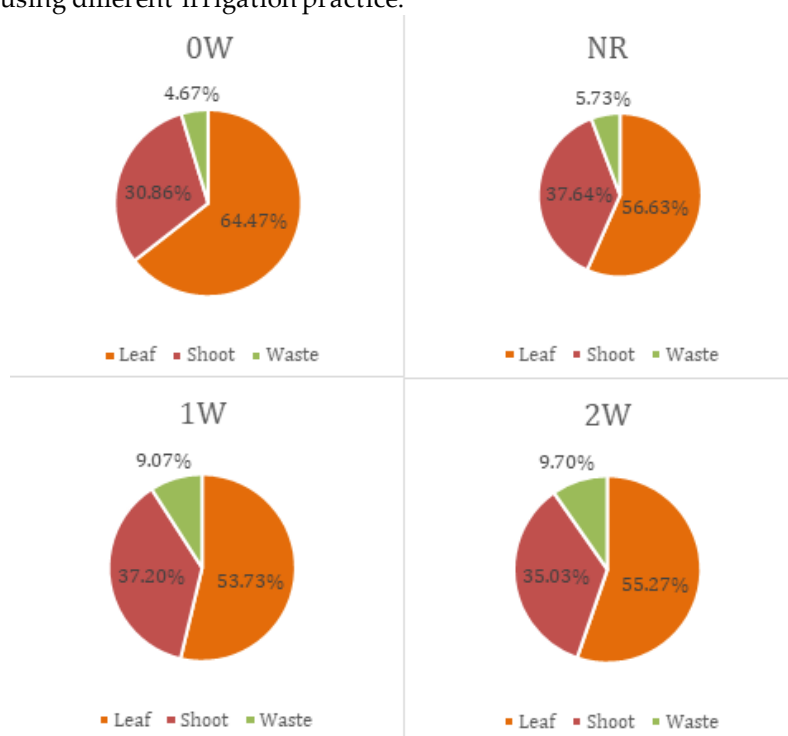
Table 2 presents yield of *Stevia rebaudiana* grown in Poland, while using different irrigation practice throughout the growth period.

**Table 2.** Influence of irrigation on the yield of stevia plants

Treatment	Year	Stevia plant <sup>1</sup>	Stevia leaves	Stevia shoots	Stevia plant waste
		[kg·m <sup>-2</sup> ]			
OW	2014	1.21±0.15 e	0.83±0.06 e	0.33±0.04 f	0.06±0.01 e
	2015	2.56±0.22 ab	1.64±0.09 ab	0.78±0.07 d	0.15±0.04 c
	2016	2.46±0.23 ab	1.50±0.08 ab	0.87±0.06 cd	0.09±0.03 cde
Average for OW in the years 2014-2016		2.08	1.32	0.66	0.10
NR	2014	2.08±0.18 c	1.14±0.03 d	0.79±0.06 d	0.12±0.03 cde
	2015	2.82±0.27 a	1.57±0.10 ab	1.02±0.05 bc	0.23±0.06 b
	2016	2.83±0.28 a	1.63±0.18 ab	1.10±0.05 ab	0.10±0.02 cde
Average for NR in the years 2014-2016		2.58	1.45	0.97	0.15
1W	2014	1.89±0.18 d	1.04±0.05 d	0.75±0.05 d	0.10±0.02 cde
	2015	2.33±0.21 bc	1.15±0.04 d	0.76±0.04 d	0.42±0.07 a
	2016	3.05±0.19 a	1.75±0.15 a	1.21±0.09 a	0.09±0.02 cde
Average for 1W in the years 2014-2016		2.42	1.31	0.91	0.20
2W	2014	1.70±0.16 d	1.07±0.05 d	0.55±0.06 e	0.08±0.01 de
	2015	2.24±0.20 bc	1.12±0.13 d	0.70±0.03 de	0.42±0.06 a
	2016	2.67±0.22ab	1.42±0.12 bc	1.12±0.08ab	0.14±0.02 cd
Average for 2W in the years 2014-2016		2.20	1.30	0.79	0.21

<sup>1</sup>Values are expressed as the mean (n=30) ± standard deviation. Mean values with different letters within the same column are significantly different ( $\alpha=0.05$ ) according to Duncan's test; OW - not irrigated, 1W - irrigated once a week, 2W - irrigated two times a week, NR - irrigated only during the dry periods (no rainfall).

Presented on the Figure 1 are percentages of particular components of stevia (a leaf, shoots or so-called plant waste, i. e. dried leaves or stems) in the total yield of stevia grown using different irrigation practice.



\*n=30; 0W- not irrigated, 1W- irrigated once a week, 2W- irrigated two times a week, NR- irrigated only during the dry periods (no rainfall).

**Figure 1.** Percentage of yields of various components of stevia in the total yield in stevia cultivated in different irrigation regimes

Total average yield of stevia plants in the three-year period of the experiment was in the range of 2.08 kg to 2.58 kg·m<sup>-2</sup>. Sample 0W was characterised with the lowest total yield, while the result of 2.58 kg·m<sup>-2</sup> was determined in the sample NR. Increasing the frequency of the irrigation of stevia plants had no significant impact on the total yield of the acquired biomass. Only 0W was characterised with different yield than other samples. These data suggest that optimisation of the type of watering of stevia is not as important as just simple use of watering procedures to avoid drought periods during stevia cultivation. However, all of the analysed samples were characterised with similar yield of stevia leaves, despite the differences in the total yield of the whole plants. Average yield of stevia shoots from the three-year period was greatest in the samples NR and 1W (0.95 and 0.90 kg·m<sup>-2</sup>) and smallest in 0W (0.66 kg·m<sup>-2</sup>). Yield of plant waste was similar for all analysed irrigation regimes and ranged from 0.10 to 0.22 kg·m<sup>-2</sup>.

Percentage of particular components in the total yield of stevia plants shows lesser homogeneity than yield of various stevia components. Samples 1W and 2W were characterised with lower percentage of the leaf weight (53.73% and 55.27%, respectively) in the total yield than sample 0W (64.47%). Typically, farmer growing *Stevia rebaudiana* plants wants to acquire the large amount of leaves and, with the similar yield of all the analysed samples, high percentage of the leaves from 0W would mean, that less total plant material from stevia plants which is not typically used by industry (such as shoots and dried/damaged leaves) would be acquired. This result can be either an advantage or a disadvantage: the higher amount of



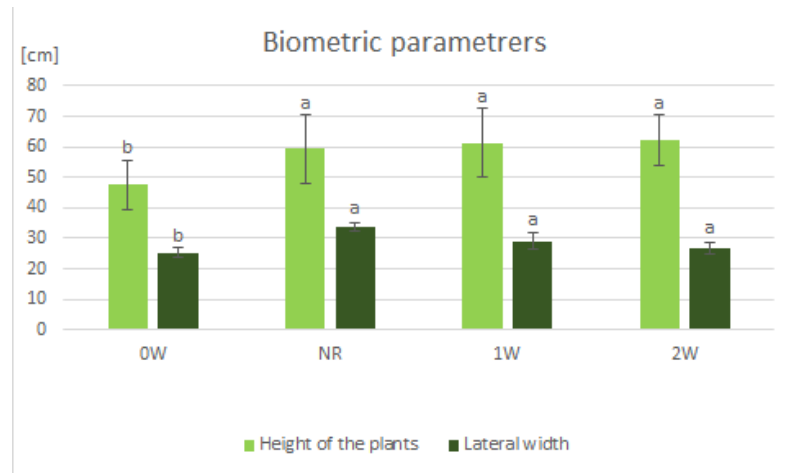
redundant biomass could result in the increase of costs of utilisation, but, from the other hand, redundant biomass could be used for composting, cattle feed or other practices and prove valuable.

The studies by various other researchers, however, have shown variety of the influence of stevia watering on the yield of the plants. In the study of Aladakatti et al. [22], where stevia plants were grown using different irrigation regime (0.8 IW/CPE – irrigation water per cumulative pan evaporation, 1.0 IW/CPE and 1.2 IW/CPE), stevia plants irrigated more frequently (1.0 and 1.2 IW/CPE) were characterised with greater total biomass yield than stevia plants irrigated less frequently, similarly as in the own study performed in Poland. However, difference in the total biomass yield had also a significant influence on the yield of fresh leaf yield, contrary to the results acquired in own study. On the other hand, the study by Lavini et al. [23] about growing stevia plants in Italy with adequate or deficit irrigation treatment (on the basis of soil water consumption) have shown, that deficit irrigation (33 and 66% of soil water consumption) can decrease plant weight by even 20-25%. Study by Lavini et al. [23] has also shown that, similarly to the study conducted in Poland, stevia plants grown with the lowest amount of water used were characterised with greatest harvest index (i. e. ratio of leaf weight to plant weight) [23]. Study about stevia grown in Morocco, conducted by Benhmimou et al. [24] have shown that stevia plants grown with the highest irrigation practice (100% evapotranspiration) yielded far greater amount of biomass than stevia plants grown with 80% or 50% evapotranspiration, but all the different watering regimes did not have an influence on the percentage of stevia leaves in the total plant weight. Analysis by Parris et al. [25] about stevia irrigation on the basis of soil water tension conducted in Ontario have shown, contrary to results acquired in stevia grown in Poland, that less frequent irrigation during stevia growth can reduce leaf yield of stevia by even 25%. Additionally, the different weather conditions in the years of the experiment also could have an influence on the stevia yield. However, the differences of the rainfall level in different years of the stevia cultivation during the experiment were effectively eliminated by irrigation of the plants. Therefore, the most probable weather factor influencing the yield of stevia was the temperature. Lower stevia yields in 2014 could be caused by lower temperature than was noted in the following years. On the other hand, the average temperature in the years 2015 and 2016 was similar, however, in 2015 more of temperature drops and increases could be noted, which could also negatively the yield of stevia in 2015.

Results acquired in this study, as well as the results presented by the other authors suggest, that it is possible that quantity of the rainfall in Poland can be acceptable for the cultivation of stevia in cooler conditions present in the Polish region, but the various particular aspects of stevia cultivation (amount of water available for stevia connected with the amount of sunlight and average temperature) need to be analysed in the consequent studies.

### *3.2. Biometric measurements of the stevia plants*

Various biometric parameters such as height of the plants, lateral width of the plant (measured at the 2/3 of the plant height), number of shoots and number of leaves on the lowest lateral shoot were measured in this study. The results are shown in Table 3 and on Figure 2



\*n=36; 0W- not irrigated, 1W- irrigated once a week, 2W- irrigated two times a week, NR- irrigated only during the dry periods (no rainfall). Different letters (a, b) within one parameter indicate significantly different values according to Duncan's test.

**Figure 2.** Influence of irrigation on biometric characteristics of stevia plants measured in the years 2014-2016

**Table 3.** Influence of irrigation on biometric characteristics of stevia plants measured in the years 2014-2016

Treatment	Number of shoots of the first order	Number of leaves on the lowest lateral shoot
0W	7.75±5.04a	38.61±12.24a
NR	7.72±4.88a	42.64±14.85a
1W	8.53±5.78a	43.25±12.68a
2W	8.39±4.37a	43.44±13.21a

<sup>1</sup>Values are expressed as the mean (n = 36) ± standard deviation. Mean values with different letters within the same column are significantly different ( $\alpha = 0.05$ ) according to Duncan's test; 0W- not irrigated, 1W- irrigated once a week, 2W- irrigated two times a week, NR- irrigated only during the dry periods (no rainfall).

Height of the stevia plants ranged from 47.61 to 62.31 cm and was the lowest for sample 0W. Lateral width of the plant was smallest in sample 0W (25.35 cm) and sample 2W (26.68 cm), while in sample 1W it was equal to 29.04 cm and in sample NR to 33.92 cm. Total number of shoots on one plant was similar in stevia plants grown in all the watering regimes and ranged from 7.72 to 8.52. Similarly, different watering regime did not have a significant influence on the number of leaves on the lowest lateral branches, which was in the range of 38.61-43.44. In the study of Aladakatti et al. [22], where stevia plants were grown using different irrigation regime stevia plants irrigated more frequently were characterised with greater height and greater amount of branches per plant than stevia plants irrigated with the lowest amount of water. However, in the study of Aladakatti [22], differences between the amounts of stevia leaves were also significant, which is contrary to the results of study in Poland. The fact that the study by Aladakatti [22] also consisted of different plant spacing connected to the different watering regime could have an

influence on that fact and these result show, that there is possibility of existence of various correlating factors between stevia plant spacing, stevia plant irrigation regime and amount of the leaves which the plant produces. These data can indicate an interesting research topic to be analysed in the future studies. In another study, by Lavini et al. [23], stevia plants grown with water deficiency in Italy were characterised with 5-10 cm lower height than plants grown with adequate water quantity. Similar results could be noted in the study by Benhmimou et al. [24], in which stevia plants grown with inadequate amount of water were characterised with plant height lower by 10-15 cm from the plants grown with the addition of greater amount of water. Study of Grad et al. [26] have shown, that stevia plants grown in greenhouse in Egypt which were grown with inadequate irrigation level (irrigation at 70 and 50% of the field capacity) were characterized with lower number of branches per plant and plant height lower by 16-20 cm.

### 3.3. Dry mass content and concentration of reducing sugars, phenolic compounds and ascorbic acid in stevia leaves

Chemical analyses of the stevia leaves were performed at two different times: in July and just after the harvest, in September. Results of these analyses are shown in Table 4.

**Table 4.** Influence of irrigation on dry mass content and concentration of reducing sugars, phenolic compounds and ascorbic acid in leaves of stevia measured in the years 2014-2016

Treatment	Dry mass		Reducing sugars		Phenolic compounds		Ascorbic acid	
	[%]							
	[mg·100g <sup>-1</sup> f.m.]		[mg·100g <sup>-1</sup> f.m.]		[mg·100g <sup>-1</sup> f.m.]		[mg·100g <sup>-1</sup> f.m.]	
	July <sup>1</sup>	September	July	September	July	September	July	September
0W	23.14 ± 2.59a	30.47 ± 2.99a	0.76 ± 0.62a	1.74 ± 0.60a	270.26 ± 15.83a	337.88 ± 31.88a	139.99 ± 7.79a	143.30 ± 7.21a
NR	24.75 ± 2.28a	27.87 ± 0.99bc	0.77 ± 0.46a	1.99 ± 0.80a	229.73 ± 33.01ab	241.03 ± 21.29b	133.14 ± 24.24b	124.66 ± 14.27c
1W	24.13 ± 2.51a	28.82 ± 1.99ab	0.82 ± 0.48a	2.27 ± 0.25a	185.62 ± 15.35b	260.57 ± 24.18b	121.02 ± 5.12b	132.38 ± 10.07bc
2W	23.73 ± 2.54a	26.52 ± 0.96c	0.93 ± 0.71a	1.95 ± 0.23a	216.80 ± 21.94b	246.46 ± 19.90b	128.62 ± 7.22ab	135.42 ± 6.15ab

<sup>1</sup>Values are expressed as the mean (n=9) ± standard deviation. Mean values with different letters within the same column are significantly different ( $\alpha=0.05$ ) according to Duncan's test; 0W - not irrigated, 1W - irrigated once a week, 2W - irrigated two times a week, NR - irrigated only during the dry periods (no rainfall)

Concentration of dry mass in the stevia leaves ranged from 23.14 (0W) to 24.75% (NR) in July and from 26.52 to 30.47%. Differences in the dry mass content in July were not significant, while at the same time, statistical analysis revealed 3 homogenous groups in the average dry mass content in stevia leaves in September. Sample 0W and 1W were characterised with highest concentration of dry mass in September and sample 2W was characterised with the lowest, so it is not easy to

determine, whether greater addition of water can always reduce dry mass content in the stevia leaves. Study of Badran et al. (2015) about drought stress on the *Stevia rebaudiana* properties have shown different results: stevia plants grown in worse drought conditions were characterised with lower dry weight content [27]. In the study by Aladakatti et al. [22] impact of different irrigation methods was more clear-cut. Stevia plants, which were irrigated more often were characterised with lower dry mass content in contrast to stevia plants which were irrigated less often. However, in the study of Benhmimou et al. [24] in which stevia plants were grown under water stress, leaves of plants which received smaller quantity of water were characterised with lower dry mass content than leaves of the stevia plants which acquired greater amount of water.

Different irrigation practice did not have influence on the concentration of reducing sugars in stevia leaves, which were, in July, in the range from 0.76 for 0W to 0.93% for 2W and, in September, in the range from 1.74 for 0W to 2.27% for 1W. In the study of Karimi et al. [28], stevia plants grown with inadequate water level (water deficiency) were characterised with higher concentration of glucose and saccharose in stevia leaves. Studies conducted in Iran showed, that irrigation of stevia cultivated in the fields as well as in the green houses can result in almost 20% increased concentration of sugars in the stevia plants [29]. These results suggest, that it is possible, that irrigation has more substantial role in the formation of sugars in stevia in the warmer climates.

Irrigation of stevia decreased concentration of phenolic compounds in stevia leaves. In July, the lowest concentration of phenolic compounds was detected in the sample 1W (185.62 mg·100g<sup>-1</sup>) and greatest in the sample 0W (270 mg·100g<sup>-1</sup>). Similar tendencies were noted in the samples gathered in September, but total concentration of phenolic compounds in all the samples was greater at that time. In September, sample 0W was characterised with highest concentration of phenolic compounds (337.88 mg·100g<sup>-1</sup>), while samples NR, 2W and 1W were characterised with lower, similar content of phenolic compounds in the range from 241.03 (for NR) to 260.57 mg·100g<sup>-1</sup> (for 1W). In the study by Mahajan et al. [30], stevia plants grown with deficit of water were also characterised with higher total concentration of phenolic compounds, which could possibly result in greater health benefits due to the consumption of these plants or products from these plants. The major phenolic compounds found in the stevia leaves are hydroxycinnamic acid and quinic acid, characterised with valuable therapeutic properties [31]. General studies about variety of different plants, mostly from *Asteraceae* family, have shown, that increases production of various phenolic compounds is a typical response of many of the plant species to the drought stress, therefore it is not surprising to see these results in the study about *Stevia rebaudiana* plants [32-34].

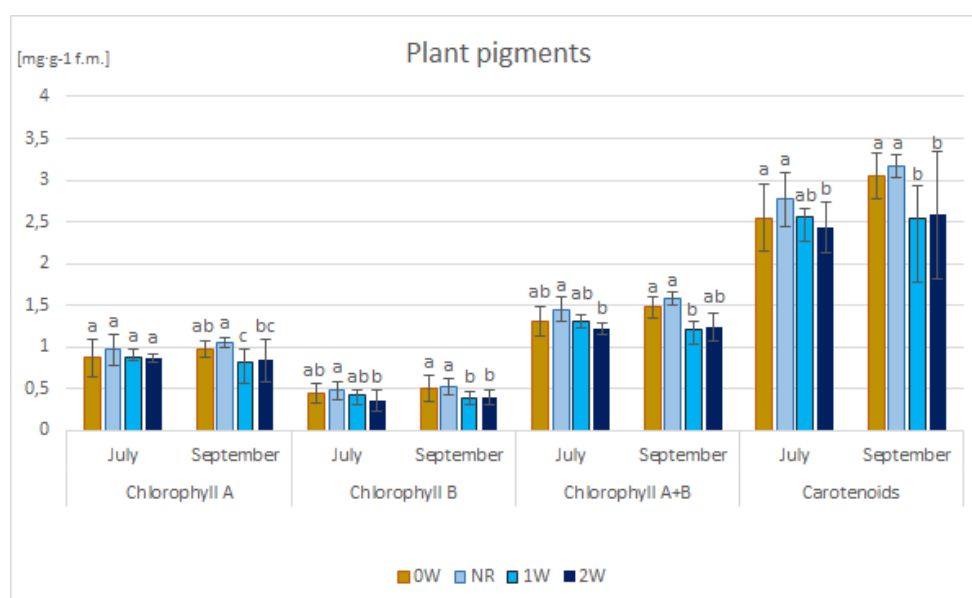
In July and September the highest concentration of ascorbic acid was determined in 0W, while lower content of was detected in 1W and NR. Concentration of ascorbic acid had not changed from July to September as much as content of phenolic compounds, but small changes in the range up to 5-6% could be noted. In July, highest concentration of ascorbic acid was determined in sample 0W (139.99 mg·100g<sup>-1</sup>) and lowest was detected in sample 1W (121.02 mg·100g<sup>-1</sup>). In September, sample 0W was still characterised with the greatest concentration of ascorbic acid (143.30 mg·100g<sup>-1</sup>) and NR had the lowest content of ascorbic acid (124.66 mg·100g<sup>-1</sup>). It is also important to note, that only in the sample NR concentration of ascorbic acid decreased from July to September. On the other hand study by Hajhashemi, & Sofo [35] has that drought stress can decrease total concentration of ascorbic acid in stevia leaves over two-fold, which is contrary to the results acquired in own study in Poland. These results might indicate that possibly stevia grown in Poland, even without additional irrigation, is not under sufficient

drought conditions which can induce loss of the ascorbic acid in the stevia leaves. High concentration of vitamin C in stevia could possibly show viability of utilising these plants as an animal fodder, which was proven by Xiong et al. [36] and Atteh and al. [37], who have shown, that stevia and production waste of stevia products can be consumed by pigs and poultry.

### 3.4. Concentration of chlorophyll A, chlorophyll B, chlorophyll A+B and carotenoids in stevia leaves.

Concentration of various pigments (chlorophyll A, chlorophyll B, chlorophyll A+B and carotenoids) in stevia leaves varied significantly between different types of irrigation as well as the time of the stevia leaf harvest (July and September) (Figure 3).

\*n=9; 0W- not irrigated, 1W- irrigated once a week, 2W- irrigated two times a week, NR- irrigated only during the dry periods (no rainfall). Different letters (a, b) within one parameter (concentration of chlorophyll A in July, concentration of chlorophyll A in September, ...) indicate significantly different values according to Duncan's test.



**Figure 3.** Influence of irrigation on concentration of chlorophyll A, chlorophyll B, chlorophyll A+B and carotenoids in leaves of stevia measured in the years 2014-2016

In July, all the analysed samples were characterised with similar concentration of chlorophyll A in the range of 0.86-0.97 mg·g<sup>-1</sup>. In September, however, sample NR was characterised with the greater concentration of chlorophyll A (1.06 mg·g<sup>-1</sup>), similar to the content in sample 0W (0.97 mg·g<sup>-1</sup>). Total concentration of this component has not increased in the samples 1W and 2W, in which it was even lower than in July, equal to 0.81 and 0.84 mg·g<sup>-1</sup> consecutively. Concentration of chlorophyll B varied in the analysed samples in July and September. The highest concentration of chlorophyll B in July was determined for the sample NR (0.48 mg·g<sup>-1</sup>), while the lowest was detected in sample 2W (0.36 mg·g<sup>-1</sup>). In September, sample NR and 0W were characterised with higher concentration of chlorophyll B (0.52 and 0.51 mg·g<sup>-1</sup> consecutively) than samples 1W and 2W (0.39 and 0.40 mg·g<sup>-1</sup>). The study of Mahajan et al. [30] have shown that crucial factor influencing the concentration of chlorophyll (chlorophyll A, chlorophyll B, as well as chlorophyll A+B) was year of the stevia plantation and amount of water used to irrigate stevia plants did not have significant effect on its concentration. However, drought induced by the polyethylene glycol in the cultivation of stevia in the study by Hajhishemi & Sofo

[35] has reduced total chlorophyll content in stevia plants almost two-fold. Study by Vasilakoglou et al. [38] on the other hand has shown, that chlorophyll content was almost at the same level in the stevia plants grown with adequate or deficit irrigation.

Concentration of carotenoids increased from July to September only for two of the analysed samples. In July, sample NR was characterised with the greatest concentration of carotenoids equal to 2.77 mg·g<sup>-1</sup>, while the lowest was determined in sample 2W (2.43 mg·g<sup>-1</sup>). In September, sample 2W was characterised with similar, lowest, concentration of carotenoids (2.58 mg·g<sup>-1</sup>), while content of carotenoids in the NR increased to 3.17 mg·g<sup>-1</sup>. In the before-mentioned study of Hajihishemi & Sofo [35], a different result was detected, because leaves of the drought-induced stevia plants were characterised with lower carotenoid content than leaves of stevia which acquired adequate amount of water [35]. Similarly, in the study of Muhealdin et al. [39], in leaves of stevia plants irrigated with lower amount of water smaller quantity of carotenoids were found than in the control sample. However, it is important to note, that these two studies were analysing stevia plants grown in warmer climate, therefore the results might not be easily transferred to the characteristics of stevia plants grown in cooler climate in Poland.

### 3.5. Concentration of various elements (calcium, magnesium, phosphorus and potassium) and nitrate ions in stevia leaves

Different irrigation practice had not have as significant influence on the concentration of calcium, magnesium, phosphorus and potassium (Table 5) as they had on the concentration of previously discussed compounds in the section 3.3. and 3.4.

**Table 5.** Influence of irrigation on the concentration of various elements and nitrates in leaves of stevia measured in the years 2014-2016

Treatment	Calcium		Potassium		Magnesium		Phosphorus		Nitrates (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	
	[mg·100g <sup>-1</sup> of d.m.]									
	July	September	July	September	July	September	July	September	July	September
<b>0W</b>	900.00 ± 180.28a	769.17 ± 207.22a	3316.67 ± 549.15a	2584.72 ± 358.70a	163.33 ± 50.31a	133.33 ± 29.79b	128.72 ± 14.09a	143.78 ± 53.08a	2742.93 ± 906.75a	1662.17 ± 553.03a
	<b>NR</b>	886.11 ± 138.13a	805.56 ± 199.42a	2813.89 ± 463.19a	2519.44 ± 163.35a	167.22 ± 42.51a	157.78 ± 37.84ab	135.30 ± 38.06a	116.54 ± 29.30a	1496.34 ± 612.32a
<b>1W</b>		897.22 ± 205.56a	825.00 ± 203.49a	2926.39 ± 475.91a	2700.00 ± 241.17a	159.44 ±39.64 a	150.56 ± 36.52ab	147.39 ± 32.13a	127.66 ± 35.02a	1548.66 ± 706.41a
	<b>2W</b>	936.11 ± 162.07a	894.44 ± 173.56a	2945.83 ± 516.65a	2737.50 ± 309.55a	173.33 ± 66.47a	170.00 ± 35.44a	130.03 ± 15.63a	129.19 ± 30.54a	1753.97 ± 565.51a

<sup>1</sup>Values are expressed as the mean (n=9) ± standard deviation. Mean values with different letters within the same column are significantly different ( $\alpha=0.05$ ) according to Duncan's test; 0W - not irrigated, 1W - irrigated once a week, 2W - irrigated two times a week, NR - irrigated only during the dry periods (no rainfall).

Concentration of calcium in all the analysed samples was similar and it ranged from 886.11 to 936.11 mg·100g<sup>-1</sup> in July and decreased to 769.17-894.44 mg·100g<sup>-1</sup> in September. The concentration of calcium in the leaves of stevia grown in Poland was lower than total content of calcium in the leaves of stevia grown in warmer climates,

in which it could range up to 1500 mg·100g<sup>-1</sup> [40-41]. Magnesium content ranged from 159.44 to 173.33 mg·100g<sup>-1</sup> in July and in September it was the lowest in sample 0W (133.33 mg·100g<sup>-1</sup>) and the greatest in sample 2W (170 mg·100g<sup>-1</sup>). In the study of Khiraoui et al. [42], stevia plants grown in selected, more humid regions of Morocco were characterised with greater concentration of magnesium than stevia plants grown in arid conditions. Concentration of phosphorus in samples NR and 1W decreased from July to September, increased in the sample 0W from July to the September and remained at almost the same level in the sample 2W. Total concentration of the phosphorus in all the samples gathered in July was statistically homogenous and it ranged from 128.72 (0W) to 147.39 mg·100g<sup>-1</sup> (1W). Similarly, concentration of phosphorus was homogenous in all the samples from September and the results ranged from 116.54 (NR) to 143.78 mg·100g<sup>-1</sup> (0W). In the study of Ucar et al. [40], similar concentration of phosphorus was determined in the stevia samples, albeit a significant increase of phosphorus content was noted between July and September. Potassium content decreased in all the samples from July to September by 10-30%, however, in each of the time periods during which the stevia leaves were analysed, potassium content remained on the similar level despite differences in the irrigation practice. Potassium content ranged from 2813.89 in NR to 3316.67 mg·100g<sup>-1</sup> in 0W in July, while it was in the range of 2519.44-2737.50 mg·100g<sup>-1</sup> in September. Greatest loss of potassium in the time period between two of the analyses was determined for the sample 0W. However, in comparison, stevia plants grown in various parts of Morocco with different annual rainfall levels have shown differences in the potassium content [42]. Stevia plants grown in the semi-arid regions were characterised with greatest concentration of potassium, while stevia plants grown in semi-humid conditions were characterised with lower content of this element. However, the stevia plants grown in arid conditions acquired lowest concentration of potassium, therefore it is difficult to determine, whether different water levels in the stevia cultivation plays a significant role in the potassium content in the stevia leaves [42]. Concentration of nitrates also changed between July and September, but differences between applications of different watering regime could be detected only in September. In July, concentration of nitrates was in the range of 1496.34-2742.93 mg·100g<sup>-1</sup>, while in September highest concentration of these ions was determined in sample 0W (1662.17 mg·100g<sup>-1</sup>) and the lowest in sample 2W (829.46 mg·100g<sup>-1</sup>). Similar results were acquired in the study by Mahajan & Pal [43], in which stevia plants grown in the soil with lower moisture content were characterised, at harvest, with lowest uptake of nitrogen and nitrates. Similar level of nitrates as detected in the samples NR, 1W and 2W could be noted in stevia leaves grown using different nitrogen fertilization treatment, using three different nitrogen fertilizers (urea, ammonium nitrate and ammonium sulphate) and three different doses (50 kg, 100 kg and 150kg per ha). These results suggest that lack of irrigation can disturb the nitrate utilisation in the stevia plants [44].

#### 4. Conclusions

Different irrigation regimes turned out to have a significant impact on the characteristics of stevia grown in Poland, which is cooler than the region where stevia originally comes from. These results have shown that different irrigation practice can be used in order to change selected properties of the stevia plants. Yield of stevia plants which were irrigated once a week or only during the drought times was the highest. Stevia plants, which were not irrigated were characterised with the lowest height and lateral width. Leaves of un-irrigated stevia contained greatest dry mass content and highest concentration of phenolic compounds. Stevia plants which were irrigated once or twice a week were characterised with lower concentration of

chlorophylls or carotenoids at the time of the harvest, but stevia plants which were not irrigated contained greater amount of carotenoids and chlorophyll. However, as no irrigation regime improves all of analysed the parameters, which could be of interest to the potential *Stevia rebaudiana* farmers, it is impossible to select one of the analysed irrigation regimes and determine is as the most optimal regime for the stevia cultivation.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.Ś. and A.B.; methodology, J.Ś. and A.B.; software, J.Ś. and A.G.; validation, J.Ś. and A.B.; formal analysis, J.Ś.; investigation, J.Ś.; resources, A.B.; data curation, J.Ś. and A.B.; writing—original draft preparation, J.Ś. and A.G.; writing—review and editing, J.Ś, A.B. and A.G.; visualization, A.G.; supervision, A.B.; project administration, A.B.; funding acquisition, A.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The article is part of a PhD dissertation titled ‘The effect of selected agronomic factors on growth, yielding and chemical composition of *Stevia rebaudiana* Bert.’, prepared during Doctoral Studies at the Wrocław University of Environmental and Life Sciences. The APC is financed by Wrocław University of Environmental and Life Sciences

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Peteliuk, V.; Rybchuk, L.; Bayliak, M.; Storey, K. B.; Lushchak, O. Natural sweetener *Stevia rebaudiana*: Functionalities, health benefits and potential risks. *EXCLI journal* **2021**, *20*, 1412.
2. Ray, J.; Kumar, S.; Laor, D.; Shereen, N.; Nwamaghinna, F.; Thomson, A.; Perez, J.P.; Soni, L.; McFarlane, S.I. Effects of *Stevia Rebaudiana* on Glucose Homeostasis, Blood Pressure and Inflammation: A Critical Review of Past and Current Research Evidence. *Int. J. Clin. Res. Trials* **2021**, *5*.
3. Myint, K. Z.; Wu, K.; Xia, Y.; Fan, Y.; Shen, J.; Zhang, P.; Gu, J. Polyphenols from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) leaves and their functional properties. *J. Food Sci.* **2020**, *85*(2), 240-248.
4. Samuel, J.; Khan, I.; Blundell, R.; Azzopardi, J.; Mahomoodally, M. F. *Stevia rebaudiana* Bertoni.: an updated review of its health benefits, industrial applications and safety. *Trends Food Sci Technol* **2020**, *100*, 177-189.
5. Samuel, P.; Ayooob, K.T.; Magnuson, B.A.; Wolwer-Rieck, U.; Jeppesen, P.B.; Rogers, P.J.; Rowland, I.; Matthews, R. *Stevia* leaf to stevia sweetener: Exploring its science, benefits, and future potential. *J. Nutr.* **2018**, *148*, 1186S–1205S.
6. Serra, P.; Fancello, G. Towards the IMO’s GHG Goals: A Critical Overview of the Perspectives and Challenges of the Main Options for Decarbonizing International Shipping. *Sustainability* **2020**, *12*, 3220. <https://doi.org/10.3390/su12083220>
7. Cappelli, L.; D’Ascenzo, F.; Ruggieri, R.; Gorelova, I. Is Buying Local Food a Sustainable Practice? A Scoping Review of Consumers’ Preference for Local Food. *Sustainability* **2022**, *14*, 772. <https://doi.org/10.3390/su14020772>
8. Enthoven, L.; Van den Broeck, G. Local food systems: Reviewing two decades of research. *Agric. Syst.* **2021**, *193*, 103226.
9. Brown, C. Consumers’ preferences for locally produced food: A study in southeast Missouri. *Am. J. Altern. Agric.* **2003**, *18*, 213–224.
10. Kumlay, A. M.; Kocak, M. Z.; Gohari, G.; Nouraein, M.; Celikcan, F.; Kaysim, M. G.; Kulak, M. Agronomic traits, secondary metabolites and element concentrations of leaves as a response to single or reiterated drought stress: How effective is the previously experienced stress? *Folia Horti.* **2022**, *34*(1), 1-16.
11. Bekhradi, F.; Luna, M.C.; Delshad, M.; Jordan, M.J.; Sotomayor, J.A.; Martínez-Conesa, C.; Gil, M.I. Effect of deficit irrigation on the postharvest quality of different genotypes of basil including purple and green Iranian cultivars and a Genovese variety. *Postharvest Biol. Technol.* **2015**, *100*, 127–135.
12. Alavi-Samani, S. M.; Ghase mi Pirbalouti, A.; Ataei Kachouei, M.; Hamed i, B. The influence of reduced irrigation on herbage, essential oil yield and quality of *Thymus vulgaris* and *Thymus daenensis*. *J. Med Herb* **2013**, *4*(3), 109-113.



13. Ekren, S.; Sönmez, Ç.; Özçakal, E.; Kurttaş, Y.S.K.; Bayram, E.; Gürgülü, H. The effect of different irrigation water levels on yield and quality characteristics of purple basil (*Ocimum basilicum* L.). *Agric. Water Manag.* **2012**, *109*, 155–161.
14. Hassan, F.A.S.; Ali, E.F.; Mahfouz, S.A. Comparison between different fertilization sources, irrigation frequency and their combinations on the growth and yield of coriander plant. *Aust. J. Basic. Appl. Sci.* **2012**, *6*, 600–615.
15. Said-Al Ahl, H.; Hussein, M. Effect of water stress and potassium humate on the productivity of oregano plant using saline and fresh water irrigation. *Ocean J. Appl. Sci.* **2010**, *3*, 125–141.
16. PN-90/A-75101/03. *Przetwory Owocowe i Warzywne Przygotowanie Próbek i Metody Badań Fizykochemicznych Oznaczenie Zawartości Suchej Masy Metodą Wagową*; Polish Committee for Standardisation: Warszawa, Poland, 1990.
17. PN-90/A-75101/11. *Fruit and Vegetable Products—Preparation of Samples and Testing Methods—Determination of Ascorbic Acid Content*; Polish Committee for Standardization: Warszawa, Poland, 1990.
18. Bieniek, A. Yield, Morphology and Biological Value of Fruits of *Actinidia arguta* and *Actinidia purpurea* and Some of Their Hybrid Cultivars Grown in North-Eastern Poland. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* **2012**, *11*, 117–130.
19. PN-90/A-75101/07. *Fruit and Vegetable Products- Preparation of Samples and Testing Methods. Determination of Sugars and Sugar-Free Extract*; Polish Committee for Standardisation: Warszawa, Poland, 1990.
20. Godlewska, K.; Biesiada, A.; Michalak, I.; Pacyga, P. The Effect of Botanical Extracts Obtained through Ultrasound-Assisted Extraction on White Head Cabbage (*Brassica Oleracea* L. Var. *Capitata* L.) Seedlings Grown under Controlled Conditions. *Sustainability* **2020**, *12*, 1871. <https://doi.org/10.3390/su12051871>
21. Nowosielski, O. *Principles of Preparation of Fertilizing Recommendations in Horticulture*; PWRiL: Warszawa, Poland, 1988; ISBN 8309013485.
22. Aladakatti, Y. R.; Palled, Y. B.; Chetti, M. B.; Halikatti, S. I.; Alagundagi, S. C.; Patil, P. L.; Patil V. C.; Janawade, A. D. Effect of irrigation schedule and planting geometry on growth and yield of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni.). *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, **2012**, *25*(1)
23. Lavini, A.; Riccardi, M.; Pulvento, C.; De Luca, S.; Scamosci, M.; D'Andria, R. Yield, Quality and Water Consumption of *Stevia rebaudiana* Bertoni Grown under Different Irrigation Regimes in Southern Italy. *Ital. J. Agron. Riv. Agron.* **2008**, *2*, 135–143.
24. Benhmimou, A.; Ibriz, M.; Al Faiz, C.; Douaik, A.; Khiraoui, A.; Amchra, F. Z.; Lage, M. Productivity of newsweet plant in Morocco (*Stevia rebaudiana* Bertoni) under water stress. *J. Med. Plants Stud.* **2017**, *5*(5), 126-131.
25. Parris, C.A.; Shock, C.C.; Qian, M. Soil water tension irrigation criteria affects *Stevia rebaudiana* leaf yield and leaf steviol glycoside composition. *Hortscience* **2017**, *52*, 154–161.
26. Grad, W.E.; Kandil, S.H.; Kenawy, E.; Massoud, M.I. The potential of sugarcane bagasse polymer composite for sustainable of *Stevia rebaudiana* productivity under deficit irrigation. *SVU-Int. J. Agric. Sci.* **2021**, *3*, 22–36.
27. Badran, A.E.; Alhady, M.R.A.A.; Hassan, W.A. In Vitro Evaluation of Some Traits in *Stevia rebaudiana* (Bertoni) under Drought Stress and Their Relationship on Stevioside Content. *American Journal of Plant Sciences* **2015**, *6*, 746–752.
28. Karimi, M.; Ahmadi, A.; Hashemi, J.; Abbasi, A.; Tavarini, S.; Guglielminetti, L.; Angelini, L.G. The effect of soil moisture depletion on *Stevia rebaudiana* Bertoni grown in greenhouse conditions: Growth, steviol glycosides content, soluble sugars and total antioxidant capacity. *Sci. Hortic.* **2015**, *183*, 93–99.
29. Ghamarnia, H.; Jalili, Z.; Sargordi, F. The effect of supplementary irrigation on yield and water use efficiency of *Stevia rebaudiana* Bertoni in greenhouse and farm investigation. *Advanced Technologies in Water Efficiency*, **2022**, *2*(1), 1-15.
30. Mahajan, M.; Thakur, B. K.; Pal, P. K. Moisture stress and nitrogen availability modulate the secondary metabolite profiles, enzymatic activity, and physiological and agronomic traits of *Stevia rebaudiana*. *Plant Physiol Biochem* **2021**, *162*, 56-68.
31. Myint, K. Z.; Wu, K.; Xia, Y.; Fan, Y.; Shen, J.; Zhang, P.; Gu, J. Polyphenols from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) leaves and their functional properties. *J. Food Sci.* **2020**, *85*(2), 240-248.
32. Bellache, M.; Torres-Pagan, N.; Verdeguer, M.; Llinares, J. V.; Benfekih, L.A.; Sestras, R.E.; Vicente, O.; Sestras, A.F.; Boscaiu, M. Comparative Analysis of Tolerance to Salt Stress and Water Deficit in Two Invasive Weeds of the Genus *Erigeron* (*Asteraceae*). *Plants* **2022**, *11*, 2059.
33. Albergaria, E.T.; Oliveira, A.F.M.; Albuquerque, U.P. The effect of water deficit stress on the composition of phenolic compounds in medicinal plants. *S. Afr. J. Bot.* **2020**, *131*, 12–17.
34. Cicevan, R.; Al Hassan, M.; Sestras, A.F.; Prohens, J.; Vicente, O.; Sestras, R.E.; Boscaiu, M. Screening for drought tolerance in cultivars of the ornamental genus *Tagetes* (*Asteraceae*). *PeerJ* **2016**, *4*, e2133.

35. Hajhashemi, S.; Sofo, A. The effect of polyethylene glycol-induced drought stress on photosynthesis, carbohydrates and cell membrane in *Stevia rebaudiana* grown in greenhouse. *Acta Physiol. Plant* **2018**, *40*(8), 142.
36. Xiong, Y.X.; Liu, S.; Xiao, H.; Wu, Q.W.; Chi, L.; Zhu, L.P.; Fang, L.; Li, Y.J.; Jiang, Z.Y.; Wang, L. Dietary stevia residue extract supplementation improves the performance and antioxidative capacity of growing-finishing pigs. *J. Sci. Food Agric.* **2022**, *102*, 4724–4735.
37. Atteh, J.; Onagbesan, O.; Tona, K.; Buyse, J.; Decuyper, E.; Geuns, J. Potential use of stevia rebaudiana in animal feeds. *Arch. Zootec.* **2011**, *60*, 133–136.
38. Vasilakoglou, I.; Kalfountzos, D.; Gougoulas, N.; & Reppas, C. Productivity of two stevia varieties under reduced irrigation and fertilization inputs. *Arch. Agron. Soil Sci.* **2016**, *62*(4), 457–472.
39. Muhealdin, B. S.; Hamarashid, S. H.; Ali, F. I.; Abdulla, N. O.; Qadir, S. A. Studying some morphological responses of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) to some elicitors under water deficiency. *Caryologia* **2022**, *75*(4).
40. Ucar, E.; Ozyigit, Y.; Eruygur, N.; Güven, D.; Yur, S.; Turgut, K.; Özek, T.; Kütük, N. The Effect of the Plant Age and Growth Period on the Nutritional Substance, Chlorophyll and Steviol Glycoside Rates in Stevia (*Stevia Rebaudiana* Bertoni) Leaves. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **2018**, *49*, 291–302.
41. Tadhani, M.B.; Subhash, R. Preliminary studies on *Stevia rebaudiana* leaves: Proximal composition, mineral analysis and phytochemicals screening. *Int. J. Med. Sci.* **2006**, *6*, 321–326.
42. Khiraoui, A.; Bakha, M.; Amchra, F.; Ourouadi, S.; Boulli, A.; Faiz, C.A.; Hasib, A. Nutritional and biochemical properties of natural sweeteners of six cultivars of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves grown in Morocco. *J. Materials Environment. Sci.* **2010**, *8*, 1015–1022.
43. Mahajan, M.; Pal, P.K. Yield response, accumulation of bioactive ingredient and ion uptake of *Stevia rebaudiana* to different soil-moisture and nitrogen levels. *Agric. Water Manag.* **2022**, *264*, 107511.
44. Śniegowska, J.; Biesiada, A.; Gasiński, A. Influence of the Nitrogen Fertilization on the Yield, Biometric Characteristics and Chemical Composition of *Stevia rebaudiana* Bertoni Grown in Poland. *Molecules* **2024**, *29*, 1865. <https://doi.org/10.3390/molecules29081865>

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.