SEP
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

Tecnológico Nacional de México

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CONKAL

PRODUCTIVIDAD DE *Stevia rebaudiana* Bertoni CON DIFERENTES LÁMINAS DE RIEGO E INOCULANTES MICROBIANOS

TESIS

Que presenta:

Rodrigo Armando Cauich Cauich

Como requisito parcial para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Horticultura Tropical

Director de tesis:

Dr. René Garruña Hernández

Conkal, Yucatán, México

Septiembre, 2017

SEP
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Conkal

Conkal, Yucatán, México, 27 de septiembre de 2017.

El comité de tesis del candidato a grado: Rodrigo Armando Cauich Cauich constituido por los CC. Dr. René Garruña Hernández, Dra. Mónica Guadalupe Lozano Contreras, MC. Alfonzo Pérez Gutiérrez y Dr. Esaú Ruiz Sánchez, habiéndose reunido con el fin de evaluar el contenido teórico-metodológico y de verificar la estructura y formato de la tesis titulada: **Productividad de *Stevia rebaudiana* Bertoni con diferentes láminas de riego e inoculantes microbianos,** que presenta como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Horticultura Tropical, según lo establece el Capítulo 2, inciso 2.13.3, de los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado en el Sistema Nacional de Institutos Tecnológicos, dictaminaron su aprobación para que pueda ser presentada en el examen de grado correspondiente.

ATENTAMENTE

Dr. René Garruña Hernández
Director de Tesis

Dra. Mónica Guadalupe Lozano Contreras
Co-director de Tesis

MC. Alfonzo Pérez Gutiérrez
Asesor de Tesis

Dr. Esaú Ruiz Sánchez
Asesor de Tesis

Conkal, Yucatán a 27 de septiembre de 2017

DECLARATORIA DE PROPIEDAD

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

Biol. Rodrigo Armando Cauich Cauich

AGRADECIMIENTOS

A Dios por brindarme su bendición y así tener salud y motivos para recorrer este camino, trabajando y superándome académica y personalmente.

A la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Conkal por haberme brindado la oportunidad de continuar preparándome en el programa de posgrado.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) C.E. Mocochá por abrirme las puertas de sus instalaciones y poner a mi disposición todo el material requerido, a través del proyecto Enraizadores biológicos para la producción de plantines de *Stevia rebaudiana* Bertoni (1440502495).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para mis estudios de Maestría (703497).

A la Dra. Mónica Guadalupe Lozano Contreras por el apoyo académico y personal brindado, por la confianza entregada, por ser mi guía en el camino de la ciencia, por su paciencia, respeto y comprensión. Muchas gracias.

A mis Directores, el MC. Alfonzo Pérez Gutiérrez y el Dr. René Garruña Hernández por todo el apoyo, sus valiosos consejos, toda la paciencia y atención brindada al trabajo de tesis.

A mi asesor el Dr. Esaú Ruíz Sánchez por su accesibilidad y valiosas aportaciones a este trabajo.

DEDICATORIA

A mi novia Yara Guadalupe Ruíz Peraza por brindarme apoyo incondicional en todo proceso, por ayudarme incluso en el experimento y acompañarme en todo momento.

A mis padres Graciano y Luisa, por su apoyo incondicional y la fe que tuvieron en mí y en este escalón de mi formación.

A mis hermanos David e Iliana y a las personas que en especial siempre estuvieron a mí alrededor dándome consejos.

A mis sobrinos, para servirle de ejemplo de lo que pueden lograr con dedicación.

ÍNDICE DE CONTENIDO

		Página
HOJA DE FIRMAS		ii
DECLARATORIA DE PROPIEDAD		iii
AGRADECIMIENTOS		iv
DEDICATORIA		v
ÍNDICE DE CONTENIDO		vi
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS		vii
RESUMEN GENERAL		ix
ABSTRACT		x
I.	CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1.	INTRODUCCIÓN	1
1.2.	ANTECEDENTES	3
1.2.1.	Origen y generalidades de Stevia rebaudiana Bertoni	3
1.2.2.	Importancia económica del cultivo	4
1.2.3.	Técnicas para estimar el requerimiento de riego para un cultivo	5
1.2.4.	Uso eficiente del agua con microorganismos benéficos	7
1.3.	HIPÓTESIS	9
1.4.	OBJETIVOS	10
1.4.1.	Objetivo general	10
1.4.2.	Objetivos específicos	10
1.5.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	11
1.6.	LITERATURA CITADA	12

II.	**CAPITULO 2. PRODUCTIVIDAD DE *Stevia rebaudiana* Bertoni CON DIFERENTES LÁMINAS DE RIEGO E INOCULANTES MICROBIANOS**	**15**
2.1.	**RESUMEN Y ABSTRACT**	**15**
2.2.	**INTRODUCCIÓN**	**17**
2.3.	**MATERIALES Y MÉTODOS**	**19**
2.3.1.	**Material vegetal e inoculantes microbianos**	**19**
2.3.2.	**Establecimiento**	**19**
2.3.3.	**Estimación del riego**	**20**
2.3.4.	**Evapotranspiración de referencia**	**20**
2.3.5.	**Manejo del cultivo**	**20**
2.3.6.	**Diseño experimental y variables de respuesta**	**21**
2.3.7.	**Análisis estadístico**	**22**
2.4.	**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**	**23**
2.4.1.	**Crecimiento de la planta**	**23**
2.4.2.	**Producción y distribución de biomasa seca**	**26**
2.4.3.	**Intercambio de gases**	**28**
2.4.4.	**Colonización micorrícica**	**30**
2.5.	**CONCLUSIONES**	**32**
2.6.	**LITERATURA CITADA**	**33**

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CAPITULO 1.

		Página
Cuadro 1.1	Métodos para estimar la evapotranspiración de referencia (Jensen *et al.,* 1990).	6
Figura 1.1	Esquema general del diseño metodológico.	11

CAPITULO 2.

Cuadro 2.1	Biomasa seca por órgano 120 ddt de plantas de *Stevia rebaudiana* Bert., sometidas a cuatro láminas de riego con base en la evapotranspiración de referencia (ET_o) en interacción con inoculantes microbianos.	28
Cuadro 2.2	Intercambio de gases registrado 120 ddt entre las 12:00 y las 13:00 horas del día en plantas de *Stevia rebaudiana* Bert., sometidas a cuatro láminas de riego con base en la evapotranspiración de referencia (ET_o) en interacción con inoculantes microbianos.	30
Cuadro 2.3	Colonización micorrícica por *Rhizophagus intraradices* en plantas inoculadas de *Stevia rebaudiana* Bert. sometidas a diferentes láminas de riego.	31
Figura 2.1	A) altura, B) área foliar, C) diámetro de tallo, D) rendimiento de plantas de *Stevia rebaudiana* Bert. regadas con 60, 80, 100 y 120% de la evapotranspiración de referencia (ET_o). Medias (n= 48) ± EE. Letras diferentes indican diferencias estadísticas (Tukey, $P \leq 0.05$).	25
Figura 2.2	A) longitud de raíz, B) volumen de raíz, C) índice MSV/MSR, D) rendimiento de plantas de *Stevia rebaudiana* Bert. inoculadas con *Bacillus spp.* + *Azospirillum brasilense* en consorcio y *Rhizophagus intraradices*. Medias (n= 48) ± EE. Letras diferentes indican diferencias estadísticas (Tukey, $P \leq 0.05$).	26
Figura 2.3	Vesículas e hifas de *Rhizophagus intraradices* en raíces de *Stevia rebaudiana*.	31

RESUMEN GENERAL

Para producir la mayor cantidad de hojas en el cultivo de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) se requiere un nivel de humedad óptimo en el suelo e inducir a la mayor cantidad de raíces, los inoculantes microbianos incluyen bacterias y hongos que se asocian a las raíces de las plantas favoreciendo dichos factores. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de cuatro láminas de riego con interacción de inoculantes microbianos en plantas de estevia. Los tratamientos consistieron en inocular las plantas con una mezcla de *Bacillus* spp. y *Azospirillum brasilense*, *Rhizophagus intraradices* y un testigo (plantas sin inocular) y regarlas con el 60, 80, 100 y 120 % de la evapotranspiración de referencia (ET_o). Las variables de respuesta fueron altura, diámetro del tallo, área foliar, biomasa seca por órganos, rendimiento, longitud y volumen radicular e intercambio de gases. La altura final de la planta, área foliar, diámetro del tallo, rendimiento, longitud y volumen radicular no se afectaron por la interacción de los factores estudiados (riego por inoculante) pero si se mostraron diferencias ($P \leq 0.05$) por factores separados, el tratamiento con 100 Y 120% ET_o mostraron mayor altura de la planta con 40.5 y 42.8 cm respectivamente. Se obtuvo mayor área foliar y rendimiento con 120% ET_o. La longitud, volumen de la raíz e incluso el rendimiento se afectaron por el factor inoculante, en estas variables fue evidente el efecto de *R. intraradices* superando al testigo en todos los casos, por su parte, el consorcio bacteriano no fue diferente al testigo ($P \leq 0.05$) en ninguna de las variables antes mencionadas. El tratamiento con 100% de la ET_o + *R. intraradices* favoreció con la mayor producción de biomasa seca de raíz y de hoja en comparación al resto de los tratamientos, sin embargo, el tratamiento con 80% de la ET_o + *R. intraradices* registró la mayor asimilación de CO_2 y mayor uso eficiente del agua, pero no favoreció el rendimiento de hoja seca.

Palabras clave: riego, biofertilizantes, transpiración, uso eficiente del agua.

ABSTRACT

To produce the highest number of leaves in the stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) crop requires an optimal level of moisture in the soil and induce the highest amount of roots, microbial inoculants include bacteria and fungi that are associated with the roots of the plants favoring said factors. The objective of this work was to evaluate the effect of four irrigation films with interaction of microbial inoculants in stevia plants. The treatments consisted in inoculating the plants with a mixture of *Bacillus* spp. and *Azospirillum brasilense, Rhizophagus intraradices* and a control (uninoculated plants) and irrigated with 60, 80, 100 and 120% of the reference evapotranspiration (ET_o). The response variables were height, stem diameter, leaf area, dry organ biomass, yield, root length and volume and gas exchange. The final height of the plant, leaf area, stem diameter, yield, root length and volume were not affected by the interaction of the factors studied (irrigation per inoculant) but if differences ($P \leq 0.05$) were shown by separate factors, treatment with 100 and 120% ET_o showed higher plant height with 40.5 and 42.8 cm respectively. Greater leaf area and yield were obtained with 120% ET_o. The length, root volume and even yield were affected by the inoculating factor, in these variables the effect of *R. intraradices* was evident, surpassing the control in all cases, the bacterial consortium was not different from the control ($P \leq 0.05$) in any of the aforementioned variables. The treatment with 100% of the ET_o + *R. intraradices* favored with the greater production of dry biomass of root and leaf in comparison to the rest of the treatments, however, the treatment with 80% of the ET_o + *R. intraradices* registered the greater assimilation of CO_2 and greater efficient use of water, but did not favor dry leaf yield.

Key words: irrigation, biofertilizers, transpiration, efficient use of water.

I. CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. INTRODUCCIÓN

La *Stevia rebaudiana,* también llamada hierba dulce o Ka´a-He´e es una planta herbácea perenne de la familia Asteraceae, es nativa de la región tropical de Paraguay (Jarma *et al.,* 2006). Sus hojas son más dulces que el azúcar de caña, esta propiedad edulcorante es debido a su contenido de glucósidos de esteviol en sus hojas, el estevióside y el rebaudiósido A, los principios activos de mayor importancia y que se encuentran en mayor contenido.

Por su propiedad edulcorante es usada por la industria alimenticia y farmacéutica de varios países para atender la creciente necesidad de usar sustitutos de azúcar sin calorías y que además no sean edulcorantes sintéticos perjudiciales como el aspartame (Kim *et al.,* 2010). Según Brandle (1999). Existen variedades de *Stevia* cuya concentración de estevióside y rebaudiósidos es distinta a las variedades generalmente cultivadas, como es el caso de una variedad donde el principal componente es estevióside y otra denominada morita que fue mejorada para tener 2.5 veces más rebaudiósido que estevióside, pues es la que se utiliza principalmente como edulcorante (Morita, 2000).

El cultivo de *Stevia* es una alternativa innovadora y muy rentable, aunque, actualmente este cultivo se encuentra en una fase incipiente de desarrollo, los rendimientos promedios obtenidos no son factibles económicamente para los agricultores (Ramírez *et al.,* 2011). Según Ramírez *et al.* (2013) en el 2010 la investigación agronómica de la especie era prácticamente nula, por lo que es necesario generar información para su aplicación.

El rendimiento de los cultivos depende de una serie de factores como el genotipo, el tipo de suelo, el riego, la disponibilidad de nutrientes, el estado fitosanitario del cultivo y la oferta ambiental entre otros. De todos ellos, el agua es tal vez uno de los más limitantes, ya que de esta depende la absorción de nutrientes y su buen manejo es fundamental para el éxito de la producción agrícola (Valverde, 2007). Por lo tanto, es necesario conocer las necesidades hídricas requeridas por la planta para cubrir lo necesario y evitar estrés por déficit hídrico o en otro caso inundaciones por tiempos de riego excesivos.

Bajo el mismo contexto, es necesario obtener el mejor uso eficiente del agua (UEA) con alternativas viables, en este sentido, el uso de microorganismos benéficos que se

asocian con las plantas e incrementan su tolerancia al estrés hídrico al modificar la tasa fotosintética y la transpiración.

Según Rillig y Mummey (2006), los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) tienen un efecto en las relaciones hídricas de la planta y del suelo en condiciones de estrés que modifican la conductividad estomática, la tasa fotosintética y la transpiración en las plantas, mientras que los exudados fúngicos promueven la cohesión de las partículas del suelo e incrementan la retención de agua en el sustrato, es decir, el uso del agua se aprovecha de manera más eficiente con la interacción de microorganismos como bacterias y HMA. Por todo lo anterior, el siguiente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de láminas de riego con la interacción de inoculantes microbianos en plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

1.2. ANTECEDENTES

1.2.1. Origen y generalidades de *Stevia rebaudiana* Bertoni

La *Stevia rebaudiana* es una planta originaria de la región de Amambay en el Noreste de Paraguay y sus colindancias con Brasil y Argentina, entre las latitudes 23º y 24º Sur, donde era conocida y usada por las tribus Guaranís desde hace cientos de años para endulzar los tés de yerba mate y medicinales y alimentos (Brandle y Telmer, 2007).

En 1943 se exportaron las primeras semillas al Reino Unido, pero éstas no pudieron ser cultivadas; en 1968 fueron exportadas a Japón, donde fue cultivada y se dio a conocer y se distribuyó por el mundo; su cultivo se ha introducido a varios países de los diferentes continentes (Lemus-Mondaca *et al.,* 2012).

En Japón, China, Corea del Sur, Países del Sudeste Asiático, Europa, Norteamérica y Sudamérica y otros, se cultivan actualmente, para la materia prima de la extracción del edulcorante natural (González-Moralejo, 2011).

Identificación taxonómica de la *Stevia rebaudiana*.

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Asterales*

Familia: *Asteraceae*

Tribu: *Eupatorieae*

Género: *Stevia*

Especie: *S. rebaudiana*

Stevia rebaudiana Bertoni

(Daciw y Wagner, 2006)

1.2.2. Importancia económica del cultivo

La importancia de la *Stevia* se debe a sus bondades naturales y los beneficios que brinda su consumo para el mejoramiento de la calidad de vida, observándose resultados sorprendentes en la reducción de la obesidad, diabetes y previene varias otras dolencias. Los glucósidos de esteviol son los principios activos que le brindan esas propiedades benéficas y edulcorantes, y han sido de gran interés científico y comercial por su intensa dulzura y su alto poder edulcorante desde que se dieron a conocer en 1899 en Europa, en la actualidad son ampliamente usados en productos alimenticios y suplementos dietéticos en muchos países alrededor del mundo (Brandle y Telmer, 2007).

El mercado de la estevia se enfoca principalmente en el área de alimentos (edulcorantes no calóricos y saborizantes), aunque recientemente se han desarrollado otros usos en el campo terapéutico y agropecuario. Como edulcorante, la estevia se emplea como endulzante de mesa y la industria la utiliza en la composición de sus productos como bebidas, panadería, confitería y lácteos.

La Organización Mundial de la Salud ha reconocido que no es genotóxico y asignó una ingesta diaria admisible temporal de glucósidos de esteviol de 0-2 mg kg^{-1} de peso corporal (Beneford *et al.,* 2006).

Se declaró que la estevia es un producto seguro para el consumo humano en junio del 2004. Los principales compradores a nivel internacional son Japón, China, Corea, Canadá, Australia, Unión Europea, USA, Brasil y Paraguay. En Japón, el consumo de la estevia se realiza desde hace 40 años y actualmente cubre el 40% de su mercado nacional de edulcorantes (Zubiate, 2007).

En 1909 se aisló el endulzante principal conocido como estevíósido, y hasta 1952 se determinó su estructura química como un glucósido diterpeno. En la década de los 70´s se aislaron otros componentes, entre ellos el rebaudiósido A, el cual tiene un poder edulcorante mayor que el estevíósido. Los glucósidos diterpenos presentes en las hojas de *Stevia* son los responsables del sabor dulce de sus tejidos. Los glucósidos son estevíósido, esteviolbiósido, rebaudiósido A, B, C, D, E y dulcósido A y B (Lemus-Mondaca *et al.,* 2012).

La dulzura de cualquiera de los compuestos de estevia es mayor que la de la sacarosa, éstos son para el estevíósido de 250 a 300 veces más dulce que la sacarosa, el

rebaudiósido A (250-450 veces), rebaudiósido B (300-350 veces), rebaudiósido C (50-120 veces), rebaudiósido D (250-450 veces), rebaudiósido E (150-300 veces), dulcósido A (50-120 veces) y esteviolbiósido (100-125 veces). En promedio, los endulzantes de los glucósidos de esteviol son 250-300 veces más que la sacarosa, con baja solubilidad en agua y alto punto de fusión (Villa y Chifa, 2006).

El estevíósido es el más abundante de los glucósidos de la estevia con el 4-13% g/g de hoja seca encontrado en la planta; seguido del rebaudiósido A (2-4% g/g), rebaudiósido C (1-2%) y Dulcósido A (0.4-0.7% g/g); mientras que el esteviolbiósido, rebaudiósido B, D, E y F también identificados en los extractos de las hojas, son constituyentes menores. El contenido de estos puede variar dependiendo de la variedad y factores ambientales como son las condiciones del suelo, métodos de irrigación, luz solar, pureza del aire, prácticas agrícolas, sanidad, procesamiento y cosecha (Lemus-Mondaca *et al.,* 2012).

1.2.3. Técnicas para estimar el requerimiento de riego para un cultivo

La planta de estevia no soporta periodos largos de sequía, por lo que es necesario aplicar riegos por goteo, y no riegos por aspersión, éstos últimos favorecen problemas fitosanitarios en campo (Casaccia y Álvarez, 2006).

Con el riego se debe aplicar la cantidad justa para cubrir el consumo de agua del cultivo. Un exceso de agua de riego supone el lavado de fertilizantes lo que puede acarrear problemas medioambientales por la contaminación de las aguas subterráneas. Además, en suelos pesados es normal la aparición de problemas de encharcamiento y asfixia radicular. Ciertos cultivos como el pimiento, son muy sensibles al exceso de agua y en algunos casos puede llegar a producir la muerte de la planta. Una aportación de agua inferior a la evaporada por la planta y el suelo puede llegar a provocar déficit hídrico y por tanto una reducción de la producción (Fernández, 2000).

La escasez generalizada de agua para la agricultura ha generado una fuerte necesidad de crear estrategias orientadas a mejorar la eficiencia de su uso. Una de ellas es la de conocer las necesidades de agua de cualquier cultivo, lo que se define como la cantidad de agua que debe tener el suelo para que la planta pueda satisfacer sus procesos fisiológicos y poder tener un desarrollo óptimo (Romero *et al.,* 2009). Dichas necesidades se miden en mm día^{-1} y depende de diversos factores como clima (condiciones

meteorológicas), características del suelo (propiedades físicas) y el propio cultivo (especie, genotipos y estados fenológicos).

El clima es uno de los factores más importantes que determinan las exigencias de agua del cultivo necesarias para el crecimiento y un rendimiento óptimo (Ojeda y Bustamante, 2000). Se ha demostrado que la evapotranspiración de un cultivo está relacionado con la demanda evaporativa del ambiente y se expresa como la evapotranspiración de referencia (ET_o), según la FAO es la tasa evapotranspirativa de una superficie con una cobertura completa de gramíneas (comúnmente pastos) con una altura uniforme entre 8 y 15 cm y sin limitaciones de agua. La ET_o puede determinarse mediante medidas directas con lisímetros y estimaciones indirectas con ecuaciones semiempíricas y empíricas, utilizando diversos métodos como se muestra en el siguiente cuadro.

Cuadro 1.1. Métodos para estimar la evapotranspiración de referencia (Jensen *et al.,* 1990).

Métodos combinatorios	Métodos radiactivos	Métodos de temperatura	Métodos del tanque evaporímetro
Penman-Montieth	Priestley Taylor	Jensen-Haise	Tanque tipo A
FAO-24 Penman (corregido)	FAO-Radiación	Hargreaves	Christiansen
FAO-PPP-17 Penman		Turc	FAO-Tanque tipo A
1982 Kimberley-Penman		SCS Blaney-Criddle	
Businger-Montiehth		FAO-Blaney-Criddle	
		Thornwaite	

Los métodos que más destacan para la estimación de la evapotranspiración potencial son los métodos adoptados por la FAO de Doorembos y Pruitt (1977), estos son: Blaney-Criddle, Radiación, Penman y el tanque evaporímetro.

El método del tanque evaporímetro ha tenido resultados satisfactorios para estimar la ET_o, esta técnica es bien conocida dado que es el método más simple y económico para estimar la evapotranspiración; consiste en medir la cantidad de agua evaporada durante un período (mm día^{-1}) correspondiendo a la disminución de la altura del agua en el tanque

evaporímetro en este periodo. La evaporación del tanque está relacionada con la evapotranspiración potencial, por un coeficiente empírico derivado del mismo tanque (Tijerina, 1999; González y Hernández, 2000):

$$ET_o = E_o * K_t$$

Donde:

ET_o = Evapotranspiración de referencia (mm·día^{-1}).
E_o = Evaporación registrada en el tanque tipo A. (mm·día^{-1}).
K_t = Coeficiente de tanque (Se obtiene de a partir de los datos de HR, VV Y RC).

Estudios realizados por Godoy *et al.* (2003) menciona que modificando el porcentaje de la evapotranspiración de referencia (ET_o) se puede estimar el volumen de agua para un cultivo en particular.

1.2.4. Uso eficiente del agua con microorganismos benéficos

El principal beneficio que aportan los microorganismos, es incrementar la adquisición de nutrimentos que no están disponibles para las plantas, principalmente P y N. Asimismo, los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) del género *Glomus* y las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (RPCV) del género *Bacillus* y *Azospirillum*, son de los microorganismos benéficos más estudiados (Rillig y Mummey, 2006), ya que tienen influencia sustancial en la fisiología y las relaciones hídricas de la planta en condiciones de estrés. Los beneficios en el estado hídrico y nutricional del hospedero son específicos de las circunstancias ambientales y de las especies asociadas (Augé *et al*., 2003). Al respecto, las hifas de los hongos aumentan el acceso a un mayor volumen del suelo y pueden penetrar poros reducidos inaccesibles para las raíces.

Un beneficio adicional es la exudación fúngica de mucílagos, que lubrican las raíces para facilitar su movimiento en el sustrato y absorber minerales y agua (Morgan *et al*., 2005). En ecosistemas áridos y semiáridos, el grado de retención de agua es un factor primordial que determina el tipo de vegetación a establecerse. Los HMA producen exudados proteicos (denominados “glomalinas”) que están correlacionados positivamente

con la estabilidad de los agregados de agua en el suelo, ya que tienen una degradación relativamente lenta en comparación con los exudados del sistema radical (Rillig, 2004).

La RPCV *Azospirillum brasilense*, ha incrementado la productividad de diversos cultivos en condiciones de temporal y posee la capacidad de fijar N_2, producir fitohormonas, sideróforos, solubilizar el fósforo y promover la síntesis de enzimas que a la vez regulan los niveles de fitohormonas (Mendoza *et al.,* 2004).

1.3. HIPÓTESIS

Aplicar el riego con menores volúmenes de agua en interacción con inoculantes microbianos mejora el crecimiento, rendimiento y el uso eficiente del agua en plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de láminas de riego en interacción con inoculantes microbianos en plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

1.4.2. Objetivos específicos

Evaluar el crecimiento y la producción de biomasa seca en plantas de *S. rebaudiana* Bert. sometidas a cuatro láminas de riego con interacción de inoculantes microbianos.

Evaluar el comportamiento de las raíces en plantas de *S. rebaudiana* Bert. tratadas con diferentes niveles de riego e inoculadas con una mezcla de *Bacillus* spp. más *Azospirillum brasilense* y *Rhizophagus intraradices.*

Evaluar el intercambio de gases, así como el uso eficiente del agua a nivel fisiológico en plantas de *S. rebaudiana* Bert. con láminas de riego e inoculantes microbianos.

1.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El diseño metodológico de este estudio se sintetiza en el siguiente diagrama (Figura 1):

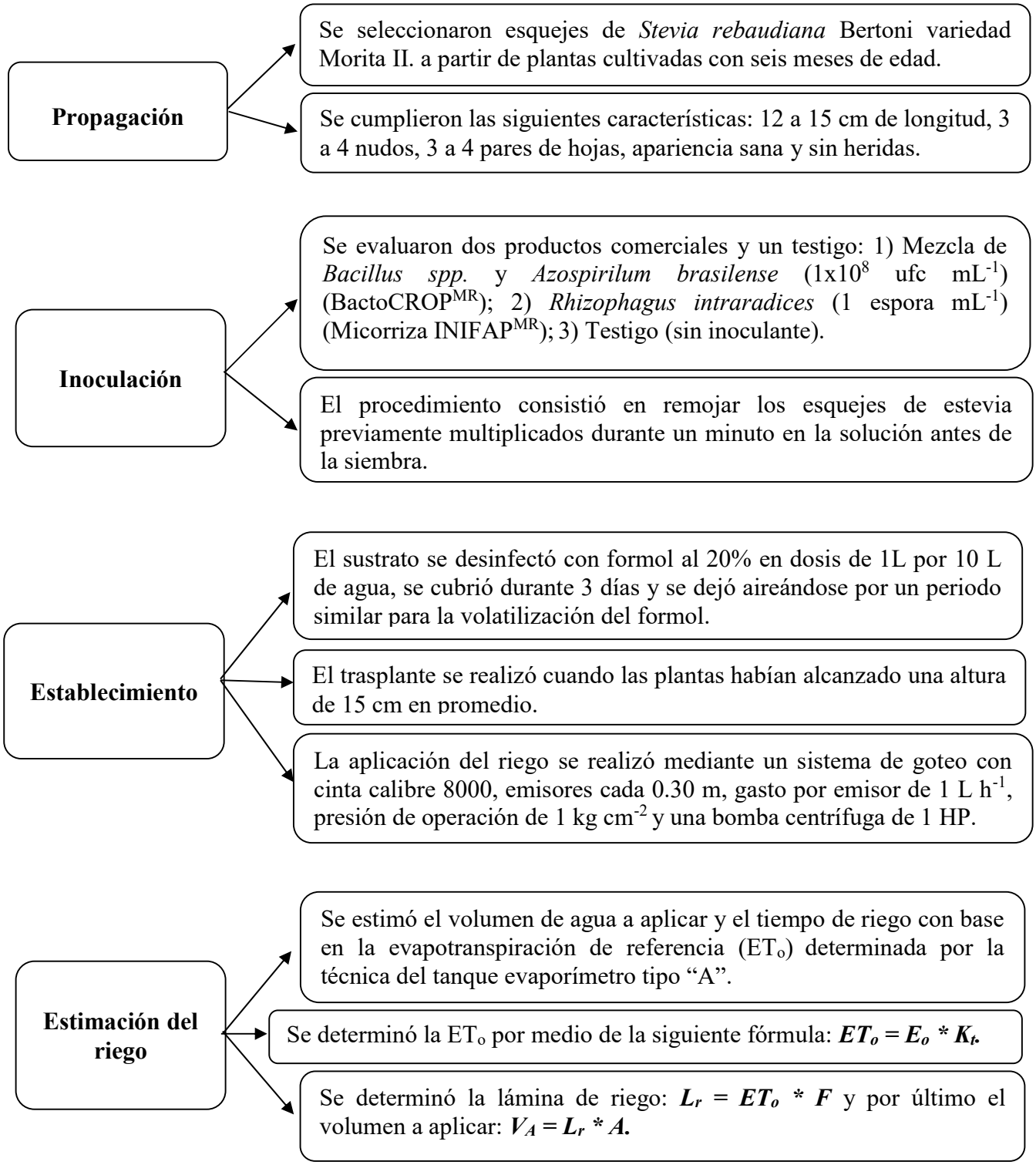

Figura 1. 1. Esquema general del diseño metodológico.

1.6. LITERATURA CITADA

Augé, R. M., Moore, J. L., Cho, K., Stutz, J. C., Sylvia, D. M., Al-Agely, A. K., Saxton, A. M. (2003). Relating foliar dehydration tolerance of mycorrhizal Phaseolus vulgaris to soil and root colonization by hyphae. Journal of plant physiology, 160(10), 1147-1156.

Beneford, D. J., DiNovi, M., Schlatter, J. (2006). Steviol glycosides. Safety evaluation of certain food additives. WHO Food Additive Series. WHO, Geneva, 117-143.

Brandle, J. (1999). Genetic control of rebaudioside A and C concentration in leaves of the sweet herb, *Stevia rebaudiana*. Canadian journal of plant science, 79(1), 85-91.

Brandle, J. E., Telmer, P. G. (2007). Steviol glycoside biosynthesis. Phytochemistry, 68 (14), 1855-1863.

Casaccia, J., Álvarez, E. (2006). Recomendaciones técnicas para una producción sustentable del ka'ahe'e [*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni] en el Paraguay.

Daciw, M. G., Wagner, J. (2006). *Stevia rebaudiana* bertoni, Kaá-heé. Fundación Antorchas Programa de Becas para Jóvenes Destacados del Polimodal, 52.

Doorembos, S., W. O. Pruitt. (1977). Crop water requeriments. Irrigation and drainage. Paper No. 24. FAO. Roma, Italia.

Fernández, M. D. (2000). Necesidades hídricas y programación de riegos en los cultivos hortícolas en invernadero y suelo enarenado de Almería. PhD diss. Almería, Universidad Almería, Spain (spanish).

González Meza, A., Hernández Leos, B. A. (2000). Estimación de las necesidades hídricas del tomate. Terra Latinoamericana, 18(1).

González-Moralejo, S. A. (2011). Aproximación a la comprensión de un endulzante natural alternativo, la *Stevia rebaudiana* Bertoni: producción, consumo y demanda potencial. Agroalimentaria, 17(32), 57-69.

Godoy Ávila, C., Pérez Gutiérrez, A., Torres, C. A., Hermosillo, L. J., Reyes, I. (2003). Uso de agua, producción de forraje y relaciones hídricas en alfalfa con riego por goteo subsuperficial. Agrociencia, 37(2). 107-115.

Jarma, A., Rengifo, T., Araméndiz-Tatis, H. (2006). Fisiología de estevia (*Stevia rebaudiana*) en función de la radiación en el Caribe colombiano. II. Análisis de crecimiento. Agronomía Colombiana, 24(1). 38-47.

Jensen, M. E., Burman, R. D., Allen, R. G. (1990). Evapotranspiration and irrigation water requirements. ASCE. Manuals and Reports on Engineering Practice N$_o$ 70. 332.

Kim, J. H., Sung, N. Y., Kwon, S. K., Jung, P. M., Choi, J. I., Yoon, Y. H., Lee, J. W. (2010). Antioxidant activity of stevia leaf extracts prepared by various extraction methods. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 39(2), 313-318.

Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., Ah-Hen, K. (2012). *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Food Chemistry, 132(3), 1121-1132.

Mendoza, H. A., M. A. Cruz, J. C. Hernández. (2004). Aislamiento, selección, producción, y evaluación de un inoculante basado en cepas nativas de *Azospirillum* en el norte de Tamaulipas. Memoria Simposio de Biofertilización. 87.

Morita, T., Bu, Y. (2000). Variety of *Stevia rebaudiana* Bertoni. U.S. Patent No. 6,031,157. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Morgan, A. W., G. D. Bending, P. J. White. (2005). Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. J. Exp. Bot. 56:1729-1739.

Ojeda, Bustamante, W., Bustamante, W. O. (2000). Pronóstico del riego en tiempo real (No. Sirsi) a416479.

Ramírez, J. G., Avilés, B. W., Moguel, O. Y., Góngora, G. S., May, L. C. (2011). Estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) un cultivo con potencial productivo en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Sureste. Publicación especial. (4), 84.

Ramírez, J. G., O. Y. Moguel, L. C. May. (2013). Evaluación de la tecnología de estevia *Stevia rebaudiana* (Bertoni), en Yucatán, Mexico bajo condiciones de riego. Centro de cooperación para el desarrollo de los trópicos (CECODET) CIRSE-INIFAP. Memorias del VII Simposio internacional de estevia. Mérida, Yucatán, México.

Rillig, M. C. (2004). Arbuscular mycorrhizae, glomalin and soil aggregation. Can. J. Soil Sci. 84:355-363.

Rillig, M. C., D. L. Mummey. (2006). Mycorrhizas and soil structure. New Phytol. 171:41-53.

Romero, E., Rodríguez, A., Rázuri, L. R., Suniaga, J., Montilla, E. (2009). Estimación de las necesidades hídricas del cultivo de pepino (*Cucumis Sativus* L.) Durante las diferentes etapas fenológicas, mediante la tina de evaporación. Agricultura andina, 16, 56-69.

Tijerina, Chávez, L. (1999). Requerimientos hídricos de cultivos bajo sistemas de fertirrigación. Terra 17: 237-245.

Valverde, J. (2007). Riego y Drenaje. Universidad Estatal a Distancia San José. segunda reimpresión. San José. Costa Rica.

Villa, M. P., Chifa, C. (2006). Contribución al comportamiento de la "Yerba dulce" *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Asteraceae) en el Chaco argentino. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Cátedra de Farmacobotánica, Carrera de Farmacia, Facultad de Agroindustrias, Universidad Nacional del Nordeste. Resumen: A-056. Chaco, Argentina.

Zubiate, F. (2007). Manual del cultivo de la *stevia* (yerba dulce). Disponible desde Internet en: http://www. engormix. com/s_articles_view. asp.

II. CAPITULO 2. PRODUCTIVIDAD DE *Stevia rebaudiana* Bertoni CON DIFERENTES LÁMINAS DE RIEGO E INOCULANTES MICROBIANOS.

2.1. RESUMEN Y ABSTRACT

Se evaluó la respuesta de plantas de *Stevia rebaudiana* Bert. con diferentes láminas de riego en interacción con inoculantes microbianos. Los tratamientos consistieron en regar con el 60, 80, 100 y 120% de la ET_o estimada con un tanque evaporímetro tipo "A" en plantas inoculadas con una mezcla de *Bacillus spp.* y *Azospirillum brasilense*, *Rhizophagus intraradices* y un testigo (sin inocular). Se evaluaron parámetros de crecimiento, producción y distribución de biomasa seca, intercambio de gases, uso eficiente del agua y colonización micorrícica. Se encontraron diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) tanto en el factor riego como en la inoculación. Las plantas más altas ($P \leq 0.05$) fueron con 120% (42.86 cm) y 100% (40.58cm) de la ET_o, así mismo las plantas con 120% de ET_o tuvieron mayor área foliar. El tratamiento con *R. intraradices* tuvo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en la longitud de raíz en comparación con el testigo, pero no contra la mezcla de rizobacterias. De igual forma *R. intraradices* mejoró el volumen de raíz (2.49 cm^3) con respecto al testigo (1.61 cm^3), y redujo 20% la aplicación de la ET_o para obtener la mayor producción de biomasa seca de hoja y raíz. La interacción *R. intraradices* + 80% ET_o incrementó la asimilación del CO_2 (5.41 µmol m^{-2} s^{-1}) y la transpiración (2.89 mmol m^{-2} s^{-1}) (apertura estomática) y con mayor uso eficiente del agua (1.87 µmol CO_2 $mmol^{-1}$ H_20). El riego tuvo efecto positivo en la altura, área foliar, diámetro del tallo y rendimiento de hoja seca, mientras que el factor inoculante mejoró la longitud de raíz, volumen de raíz, relación MSV/MSR y rendimiento. El riego con el 80 y 100% de la ET_o permitió el mayor porcentaje de colonización micorrícica. El hongo *R. intraradices* y las bacterias *Bacillus* spp. y *Azospirillum brasilense* pueden ser una opción viable para asociarse simbióticamente con *S. rebaudiana* Bert.

Palabras Clave: biofertilizantes, esteviósidos, hierba dulce, transpiración, uso eficiente del agua.

The response of *Stevia rebaudiana* Bert plants was evaluated with different irrigation sheets in interaction with microbial inoculants. The treatments consisted of watering with 60, 80, 100 and 120% of the estimated ET_o with an "A" type evaporimeter tank in plants inoculated with a mixture of *Bacillus* spp. and *Azospirillum brasilense*, *Rhizophagus intraradices* and a control (uninoculated). Growth, production and distribution parameters of dry biomass, gas exchange, water efficiency and mycorrhizal colonization were evaluated. Statistical differences ($P \leq 0.05$) were found in both the irrigation factor and the inoculation. The highest plants ($P \leq 0.05$) were with 120% (42.86 cm) and 100% (40.58 cm) of the ET_o, also the plants with 120% of ET_o had greater leaf area. Treatment with *R. intraradices* had significant differences ($P \leq 0.05$) in the root length compared to the control, but not against the mixture of rhizobacteria. In the same way *R. intraradices* improved the root volume (2.49 cm^3) with respect to the control (1.61 cm^3), and reduced the application of ET_o by 20% to obtain the highest dry leaf and root biomass production. The interaction *R. intraradices* + 80% ET_o increased CO_2 assimilation (5.41 µmol m^{-2} s^{-1}) and transpiration (2.89 mmol m^{-2} s^{-1}) (stomatal opening) and increased water efficiency (mmol CO_2 $mmol^{-1}$ H_2O). Irrigation had a positive effect on height, leaf area, stem diameter and dry leaf yield, while inoculant factor improved root length, root volume, MSV/MSR ratio and yield. Irrigation with 80 and 100% of ET_o allowed the highest percentage of mycorrhizal colonization. The fungus *R. intraradices* and the bacteria *Bacillus* spp. and *A. brasilense* may be a viable option to associate symbiotically with *S. rebaudiana* Bert.

Key words: biofertilizers, steviosides, sweet grass, transpiration, efficient use of water.

2.2. INTRODUCCIÓN

La estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) o hierba dulce es una planta herbácea perenne de la familia Asteraceae, considerada de alto potencial por ser la principal productora de un edulcorante natural no calórico llamado esteviósido, se distingue de los edulcorantes sintéticos por no tener sabor metálico y no ser cancerígeno (Brandle *et al.,* 1998). La estevia llama la atención de amplios sectores por sus propiedades benéficas, es utilizada como endulzante natural y en la industria farmacéutica para el tratamiento de la diabetes, hipertensión, trastornos digestivos, depresión, adicciones, entre otros padecimientos (Lubbe y Verpoorte, 2011).

La producción de estevia promete ser una actividad rentable, una hectárea de estevia produce en edulcorante lo equivalente a 36 hectáreas de caña de azúcar (Mohamed *et al.,* 2012), la parte más importante en la planta es la hoja, ya que es la que se procesa e industrializa por ser el órgano donde se encuentra la mayor cantidad de edulcorante o glucósidos, por tanto, es de gran importancia incrementar el número de hojas en la planta (Martínez, 2015). La producción de hojas o biomasa en cualquier cultivo está determinada por la cantidad de agua disponible en el suelo. Medrano *et al.* (2007) afirman que la producción de biomasa sin agua es imposible para las plantas, la razón está en que el proceso base de la producción de biomasa (fotosíntesis) y del gasto de agua (transpiración) son co-dependientes, la entrada del bióxido de carbono y la salida del agua utilizan la misma vía (los estomas de las hojas), cuando más abiertos están más CO_2 entra, pero también más rápidamente se escapa el agua. Se ha demostrado que la producción de estevia requiere de un riego frecuente para mantener la humedad del suelo por encima del punto de marchitez permanente hasta el 80% de su capacidad de campo, ya que el estrés por humedad reduce la producción de hojas (Lavini *et al.,* 2008).

La programación eficiente del riego junto a un mayor uso eficiente del agua por las plantas es fundamental para el éxito de la producción. Cuando se modifica el porcentaje de la evapotranspiración de referencia (ET_o) se puede estimar el volumen de agua para un cultivo en particular (Godoy *et al.,* 2003). En un estudio realizado por Pérez-Gutiérrez *et al.* (2008) encontraron que cuando se recupera la humedad del suelo con el 80% de la ET_o en el cultivo de *Capsicum chinense* Jacq. se mejora el rendimiento y el uso eficiente del agua, sin embargo, una alternativa ecológicamente aceptable para aumentar el uso eficiente del agua

es la inoculación de microorganismos benéficos o también llamados inoculantes microbianos, se pueden utilizar como inoculantes microbianos las bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azotobacter*, *Anabaena*, *Frankia*, *Bacillus* y *Pseudomonas*, así como los hongos *Rhizophagus intraradices* y *Trichoderma* spp. (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

Estos microorganismos además de ser capaces de mejorar la fertilidad del suelo y mejorar el crecimiento vegetal mediante la síntesis de reguladores de crecimiento, también pueden mejorar la asimilación de CO_2 y modificar la apertura estomática y la transpiración en la planta (Compant *et al.,* 2010), lo que permite un mejor uso eficiente del agua. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la respuesta de plantas de *S. rebaudiana* Bert. con diferentes láminas de riego en interacción con inoculantes microbianos.

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. Material vegetal e inoculantes microbianos

Los esquejes fueron seleccionados a partir de plantas cultivadas con seis meses de edad, el material vegetativo utilizado fue *Stevia rebaudiana* Bertoni variedad Morita II. Se evaluaron dos productos comerciales y un testigo. La inoculación se llevó a cabo después de esquejar en las instalaciones del campo experimental Uxmal. Los tratamientos fueron: 1) Mezcla de *Bacillus spp.* y *Azospirillum brasilense* ($1x10^8$ ufc g^{-1}) (BactoCROP^{MR}); 2) *Rhizophagus intraradices* (60 esporas g^{-1}) (Micorriza INIFAP^{MR}); 3) Testigo (sin inoculante). Los inoculantes estaban en forma sólida, se diluyeron en agua corriente 70 g L^{-1} y se agitaron para mantener la solución homogénea. La inoculación se realizó según la metodología propuesta por Lozano y Ramírez (2015), la cual consistió en remojar los esquejes de *S. rebaudiana* Bert. previamente multiplicados durante un minuto en la solución antes de la siembra.

2.3.2. Establecimiento

La investigación se realizó dentro de una estructura protegida en el área de investigación del Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán, ubicado en Av. Tecnológico s/n Conkal, Yucatán, al noreste de Mérida a 21º 04’ N y 89º 31’ O, a una altitud de 8 m, el clima predominante es Aw_o (x´) (i´) g (Márdero *et al.,* 2012).

Cuando las plántulas habían alcanzado una altura de 15 cm se realizó el trasplante en bolsas de polietileno con capacidad de 7 L, se utilizó un sustrato compuesto de tierra negra y bagazo de henequén, en proporción 2:1 v/v. El sustrato se desinfectó con formol al 20% en dosis de 1 L por cada 10 L de agua, se cubrió con un plástico de polietileno calibre 800 color negro durante tres días, después se destapó por un periodo similar para la volatilización del formol. Se llenaron las bolsas y se distribuyeron a una distancia de 0.30 y 1.0 m entre plantas e hileras respectivamente. El riego se aplicó con sistema de goteo con cinta calibre 8000, emisores cada 0.30 m, gasto por emisor de 1 L h^{-1}, presión de operación de 1 kg cm^{-2} y una bomba centrífuga de 1 HP.

2.3.3. Estimación del riego

Al inicio del estudio se aplicó un riego para recuperar la humedad del suelo a su capacidad de campo con la finalidad de homogenizar el nivel de humedad en el sustrato. Se estimó la lámina de riego que comprende la humedad aprovechable por medio de la fórmula: $L_r = (\theta_{CC} - \theta_{PMP}) * P_r$, donde L_r = Lámina de riego (cm), θ_{CC} = Capacidad de campo (%), θ_{PMP} = Punto de marchitez permanente (%) y P_r = Profundidad de humedecimiento (m) (Quintal *et al.,* 2012). Los parámetros del suelo como capacidad de campo y punto de marchitez permanente se determinaron por medio de un análisis en laboratorio.

2.3.4. Evapotranspiración de referencia

El volumen de agua para los riegos posteriores se estimó en función de los tratamientos que consistieron en regar con el 60, 80, 100 y 120% de la evapotranspiración de referencia (ET_o) en las plantas de *S. rebaudiana* Bert. previamente inoculadas, estas proporciones se estimaron con base en la evaporación medida en el tanque tipo "A". Para ello se utilizaron los registros diarios de la evaporación de un tanque instalado dentro del área experimental. Para calcular la ET_o se utilizó la ecuación: $ET_o = E_o * K_t$, donde ET_o= Evapotranspiración de referencia (mm día^{-1}), E_o = Evaporación registrada en el tanque tipo "A" (mm día^{-1}) y K_t = Coeficiente del tanque, en función de la velocidad del viento y humedad relativa. Una vez obtenidos los resultados de la ET_o, se calculó la lámina de riego a aplicar mediante la ecuación: $L_r = ET_o * F$, donde L_r = Lámina de riego (mm dia^{-1}), ET_o = Evapotranspiración de referencia (mm dia^{-1}), F = Fracción de la evapotranspiración de referencia (0.6, 0.8, 1.0 y 1.2) (Doorenbos y Pruitt, 1977) y se determinó el volumen de agua a aplicar por la fórmula $V_A = L_r * A$, donde V_A = Volumen de agua (cm^3), L_r = Lámina de riego (cm), A = Área de la bolsa (cm^2).

2.3.5. Manejo del cultivo

Se realizaron dos podas al cultivo, la primera se realizó a los 10 días después del trasplante (ddt) con finalidad de eliminar la dominancia apical e inducir brotes y en la segunda se eliminó la floración del cultivo, ya que no es recomendable por que disminuye

el tamaño de la hoja. Se realizaron dos cosechas de hoja, la primera a los 60 ddt y la segunda a los 120 ddt al final de la evaluación.

La fertilización se aplicó de forma manual cada 2 días el 50% de la dosis recomendada (Ramírez *et al.,* 2011) y se realizaron aplicaciones de productos orgánicos para el control preventivo de plagas y enfermedades.

2.3.6. Diseño experimental y variables de respuesta

Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con arreglo bi-factorial: lámina de riego (factor A), inoculante microbiano (factor B), con cuatro repeticiones por tratamiento, la unidad experimental fue de seis plantas.

A los 120 días después del trasplante (ddt) se evaluó el crecimiento de la planta mediante los siguientes parámetros: altura de la planta: medida con un flexómetro desde la base del tallo hasta el último ápice foliar; diámetro del tallo: medido con un vernier digital colocado a 3 cm de la superficie del suelo; área foliar: con la fórmula $AF= W\ hojas/\ \delta$, donde; W hojas= peso del conjunto de hojas muestra y δ= densidad superficial (Pire y Valenzuela, 1995); longitud de la raíz: se evaluó con un flexómetro; volumen de raíces: con la técnica de desplazamiento con una probeta de vidrio de 500 mL. Adicionalmente se calculó el índice morfológico: materia seca del vástago entre materia seca radicular (MSV/MSR), según Arizaleta y Pire (2008) este coeficiente es uno de los indicadores de la calidad de la planta, se evaluó la producción y distribución de biomasa seca, para lo cual se realizó una separación de los órganos de la planta (raíz, tallo, hojas), se depositaron en bolsas de papel, se secaron en una estufa de aire forzado a 65 ºC hasta peso constante, se pesaron en una balanza analítica. Se determinó el rendimiento de hoja seca total obtenida de los cortes realizados a los 60 ddt (cosecha 1) y a los 120 ddt (cosecha 2).

La tasa de asimilación neta de CO_2 (fotosíntesis), concentración del carbono intercelular, conductancia estomática, transpiración y el uso eficiente del agua instantáneo se midieron con un analizador de gases en infrarrojo (LICOR LI-6400, Nebraska, Estados Unidos). Las mediciones se realizaron a los 120 ddt por la mañana. Se realizaron 9 lecturas por unidad experimental en hojas jóvenes totalmente expandidas ubicadas en el estrato alto (Garruña-Hernández *et al*., 2014).

La colonización micorrícica se evaluó a los 120 ddt. Se tomaron fragmentos de raíces de 1 a 1.5 cm de plantas inoculadas con *Rhizophagus intraradices* y se lavaron con agua de la llave. Se utilizó la técnica de clareo con solución KOH al 10% y se trasfirieron a una solución de HCl al 1%. Finalmente, se tiñeron con solución de tinta Parker Quink azul según la metodología descrita por Phillips y Hayman (1970), modificada por Rodríguez (2015). Para estimar el porcentaje de colonización, las raíces teñidas se cortaron en segmentos de aproximadamente 1 cm y se colocaron sobre láminas portaobjetos previamente trazadas con líneas paralelas. Se evaluaron las intersecciones de las líneas con 100 segmentos de raíz por muestra y se consideró colonización al observar vesículas, hifas, esporas y/o arbúsculos presentes usando un microscopio Leica DM500 (Giovanetti y Mosse, 1980).

2.3.7. Análisis estadístico

Con los datos de las variables respuestas indicadas se hizo un análisis de varianza y comparación de medias (Tukey, $P \leq 0.05$) en el paquete estadístico InfoStat versión 2014 (Universidad Nacional de Córdova, Argentina).

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1. Crecimiento de la planta

El análisis de varianza ($P \leq 0.05$) indicó que la altura final de la planta, área foliar y diámetro del tallo no presentaron diferencia estadística por efecto de la interacción riego e inoculante a los 120 días después del trasplante (ddt), los factores estudiados actuaron de forma independiente en estas variables donde solo los niveles de riego tuvieron diferencia estadística ($P \leq 0.05$). Las plantas más altas fueron las del tratamiento con 120% de la ET_o, aunque fue estadísticamente igual ($P \leq 0.05$) a 100% ET_o (42.86 y 40.58 cm respectivamente), estos niveles de riego superaron al tratamiento 60% ET_o (37.93 cm) (Figura 2.1A). Pérez *et al*. (2008) al trabajar con plantas de *Capsicum chinense* Jacq. obtuvieron un comportamiento cuadrático, donde con 120% ET_o no se generó incremento en la altura, siendo en este caso un comportamiento descendente, la mejor altura la obtuvieron al aplicar el 80% ET_o.

El riego con 120% ET_o generó mayor área foliar en las plantas de *Stevia rebaudiana* Bert., 45.8% más que las plantas que crecieron con el tratamiento 60% ET_o (Figura 2.1B). Al respecto, (Valladares *et al.,* 2004) indicaron que en una planta ante un déficit de agua se restringe el crecimiento celular, las hojas se desarrollan menos, lo que provoca menor expansión foliar. Balaguera *et al*. (2008) observaron que, con menor presión de turgencia debido a un déficit hídrico, hay menos área foliar y mayor cierre estomático. El diámetro del tallo incrementó 4.35, 4.40 y 4.62 mm al regar con 80, 100 y 120% ET_o, respectivamente, en comparación con el tratamiento 60% ET_o (3.87 mm) que fue estadísticamente diferente ($P \leq 0.05$) (Figura 2.1C).

En la longitud y volumen radicular, así como en el índice morfológico MSV/MSR, tampoco hubo diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) por efecto de la interacción riego-inoculante a los 120 días después del trasplante (ddt), estas variables solo tuvieron diferencias estadísticas por efecto de los inoculantes microbianos, lo cual pone en evidencia la influencia de los microorganismos sobre en el comportamiento de la raíz en las plantas. Con relación a la longitud de raíz, las raíces de plantas inoculadas con *Rhizophagus intraradices* tuvieron 11.14 cm de longitud y solo tuvo diferencia estadística ($P \leq 0.05$) con el tratamiento testigo (9.79 cm) (Figura 2.2A). El volumen de raíz de las plantas testigo fue

de 1.61 cm^3, mientras que el tratamiento con *R. intraradices* aumento 35% el volumen de raíz (Figura 2.2B). Gil, (2007 13) afirma que la inducción a la mayor cantidad de raíces es fundamental para las plantas, ya que de estas depende la adecuada absorción de agua y nutrientes para su continuo desarrollo.

Para el índice morfológico materia seca del vástago entre materia seca de la raíz (MSV/MSR) hubo diferencia estadística ($P \leq 0.05$) entre el testigo y el tratamiento con *R. intraradices* con 14.52 y 11.33 g $planta^{-1}$ respectivamente, este índice indica que las plantas testigo tuvieron más parte aerea que radicular y las plantas con *R. intraradices* tuvieron mayor parte radicular que aérea, en este sentido, la distribución de los fotoasimilados pudo haber favorecido más a la parte radicular que a la parte aérea (Figura 2.2C). Según Casierra y Rodríguez (2006), la distribución de fotoasimilados en la planta incide directamente sobre la relación raíz-vástago, distribución que es modificada por las condiciones del ambiente y por la capacidad genética y fisiológica de la planta.

El análisis de varianza para el rendimiento de hoja seca no mostró diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) por la interacción riego e inoculante a los 120 ddt, pero si hubo diferencias al analizar los factores por separado. Al regar con 120% ET_o se obtuvo 11.73 g $planta^{-1}$ de hoja seca, hubo diferencia estadística ($P \leq 0.05$) con 60 y 80% ET_o en los cuales se aplicó un menor volumen de agua. Al respecto, Fabeiro *et al.* (2002) mencionan que el rendimiento de las plantas tiene un comportamiento lineal cuando se incrementa la humedad del suelo, pero llega a un nivel en donde un mayor contenido de humedad no se traduce en mayor rendimiento. Este comportamiento fue similar a lo observado en la altura de la planta, probablemente se debió a que aumentando la humedad en el suelo hubo disponibilidad de oxígeno, y así se favoreció el crecimiento de la planta (Figura 2.1D). Con respecto a los inoculantes microbianos, hubo diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) entre la micorriza *R. intraradices* (10.58 g $planta^{-1}$ de hoja seca) y el testigo (9.25 g $planta^{-1}$ de hoja seca) (Figura 2.2D). Navi *et al.* (2006) obtuvieron mayor rendimiento de hoja seca en plantas de Albahaca (*Ocimum basilicum*) inoculadas con la micorriza *Glomus fasciculatum*. El tratamiento con *Bacillus* spp. + *Azospirillum brasilense* fue igual estadísticamente ($P \leq 0.05$) a los demás tratamientos.

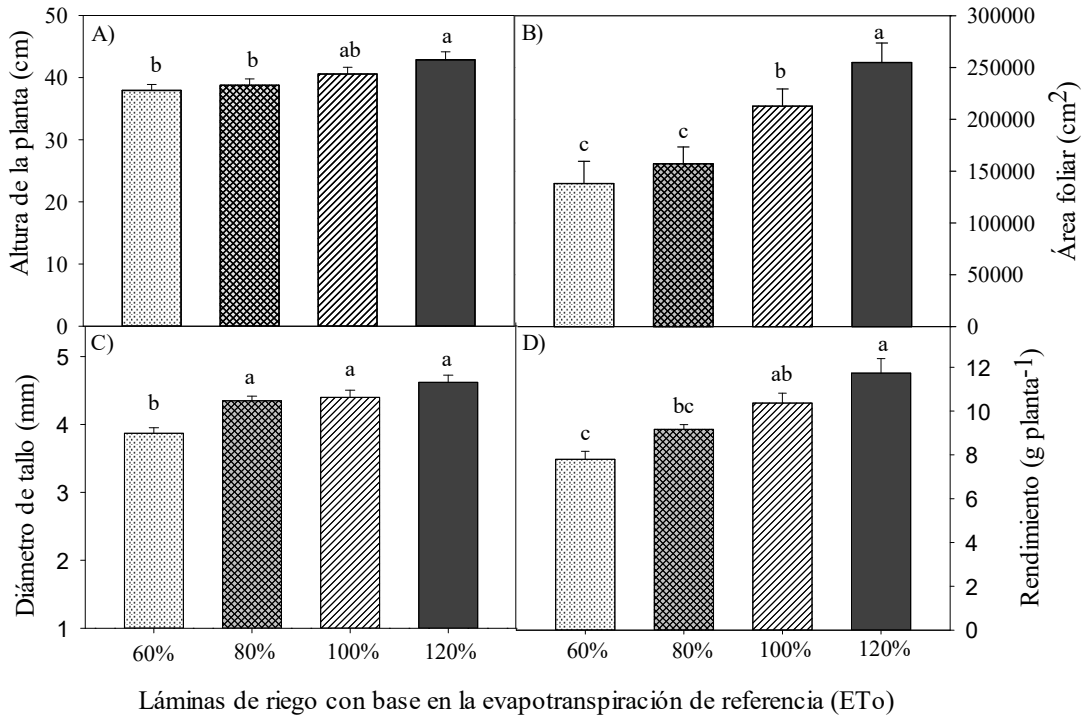

Figura 2.1. A) altura, B) área foliar, C) diámetro de tallo, D) rendimiento de plantas de *Stevia rebaudiana* Bert. regadas con 60, 80, 100 y 120% de la evapotranspiración de referencia (ET_o). Medias (n= 48) ± EE. Letras diferentes indican diferencias estadísticas (Tukey, $P \leq 0.05$).

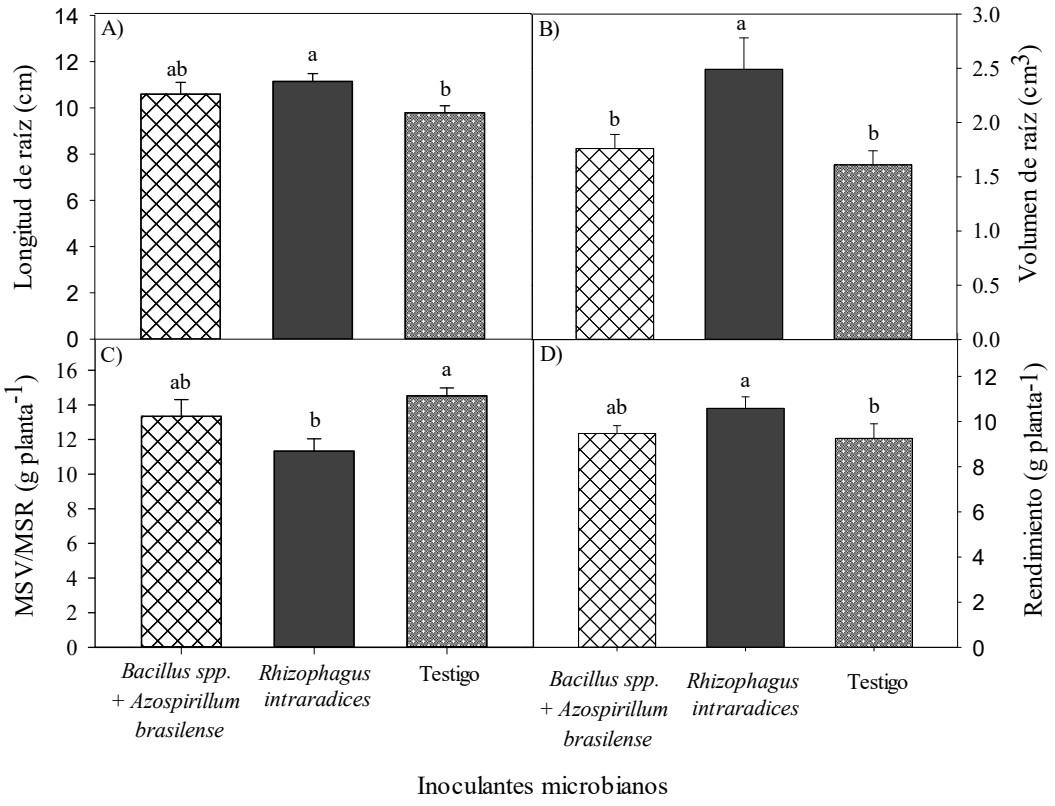

Figura 2.2. A) longitud de raíz, B) volumen de raíz, C) índice MSV/MSR, D) rendimiento de plantas de *Stevia rebaudiana* Bert. inoculadas con *Bacillus spp.* + *Azospirillum brasilense* en consorcio y *Rhizophagus intraradices*. Medias (n= 48) ± EE. Letras diferentes indican diferencias estadísticas (Tukey, P≤0.05).

2.4.2. Producción y distribución de biomasa seca

En el cuadro 2.1 se observa que las plantas inoculadas con *Rhizophagus intraradices* obtuvieron el mayor peso seco de raíz, en este mismo tratamiento hubo diferencias significativas (P≤0.05) entre las regadas con 100% ET_o (1.66 g planta^{-1}) y los demás tratamientos de riego. En los dos tratamientos con inoculantes microbianos se presentó una relación directa entre la lámina de riego aplicada y el peso seco del tallo, aumentando mientras mayor era el volumen de agua aplicado, la menor lámina (60% ET_o) tuvo el peso seco de tallo más bajo. Es indispensable la presencia de agua en la rizosfera

para que la planta la pueda tomar a través de su sistema radical y almacenarla en todas sus células, cuando el suministro de agua es demasiado bajo, la planta almacena contenidos mínimos y, a pesar del proceso de osmorregulación efectuado para evitar pérdidas por transpiración, su peso fresco y seco se ven afectados (Balaguera *et al.,* 2008).

El mayor peso seco de las hojas se presentó en plantas inoculadas con *R. intraradices* y regadas con 100% ET_o (10.14 g planta^{-1} de hoja seca), en esta variable hubo diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) con el resto de los tratamientos, así mismo, el efecto de la misma interacción (*R. intraradices* con 100% ET_o) mostró los resultados más altos en la biomasa seca total (16.86 g planta^{-1}). Las plantas no inoculadas requirieron el riego con 120% ET_o para producir como máximo 15.88 g planta^{-1} de biomasa seca total, en este sentido, la inoculación de la micorriza *R. intraradices* permite reducir un 20% la ET_o para obtener mayor producción de biomasa seca total.

Por el contrario, el 60% ET_o en interacción con los inoculantes microbianos no favoreció el peso seco en ninguno de los casos. Estos resultados concuerdan con los de García *et al*. (2015) quienes reportan que los tratamientos que más afectaron la biomasa de hoja en plantas de *Stevia rebaudiana* fueron los de 40 y 60 % de la ET_o.

Cuadro 2.1. Biomasa seca por órgano 120 ddt de plantas de *Stevia rebaudiana* Bert., sometidas a cuatro láminas de riego con base en la evapotranspiración de referencia (ET_o) en interacción con inoculantes microbianos.

Biomasa seca	Fracción de la ET_o (%)	*Bacillus* spp + *Azospirillum brasilense*	*Rhizophagus intraradices*	Testigo
		(g planta^{-1})		
Raíz	60	0.81 ±0.10^a	0.96±0.15^b	0.56±0.05^c
	80	0.94±0.13^a	1.03±0.11^b	0.69±0.08^b
	100	0.83±0.05^a	1.66±0.25^a	0.94±0.08^a
	120	0.98±0.16^a	1.19±0.10^b	1.10±0.22^a
Tallo	60	3.14±0.18^d	3.84±0.32^c	3.17±0.18^d
	80	4.19±0.11^c	4.26±0.29^c	3.86±0.20^c
	100	4.60±0.27^b	5.23±0.22^b	4.63±0.32^b
	120	5.54±0.29^a	6.39±0.33^a	6.04±0.50^a
Hoja	60	5.49±0.33^c	6.30±0.49^c	5.32±0.32^c
	80	6.79±0.28^b	6.86±0.45^c	6.33±0.44^b
	100	7.12±0.52^b	10.14±0.62^a	7.87±0.56^a
	120	8.60±0.57^a	8.61±0.51^b	9.29±0.95^a
Total	60	9.04±0.50^c	10.62±0.83^b	8.78±0.46^d
	80	11.46±0.32^b	11.63±0.73^b	10.53±0.57^c
	100	12.14±0.77^b	16.86±0.58^a	12.97±0.80^b
	120	14.63±0.79^a	16.12±0.87^a	15.88±1.43^a

Medias (n=8) ± EE. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey, P≤0.05).

2.4.3. Intercambio de gases

En la fotosíntesis (tasa de asimilación neta de CO_2), las plantas inoculadas con *R. intraradices* y regadas con 80 y 100% de la ET_o tuvieron 5.41 y 5.26 µmol m^{-2} s^{-1} respectivamente, con diferencias estadísticas (P≤0.05) entre plantas inoculadas con la mezcla de *Bacillus spp.* + *Azospirillum brasilense* (2.64 y 2.23 µmol m^{-2} s^{-1} respectivamente), y plantas testigo (0.14 y 4.62 µmol m^{-2} s^{-1} respectivamente) con las mismas láminas de riego (80 y 100% ET_o). El tratamiento 120% ET_o disminuyó la fotosíntesis 42.8% (Cuadro 2). La concentración de carbono intercelular más alta la tuvieron las plantas inoculadas con *R. intraradices* y regadas con 60 y 120% ET_o (323.23 y 342.32 mmol mol^{-1}, respectivamente), mientras que el tratamiento 80% ET_o tuvo 304.91

mmol mol^{-1}, en el tratamiento con la mezcla de *Bacillus spp.* + *A. brasilense* hubo mayor concentración de carbono intercelular cuando se regó con 120% ET_o (372.95 mmol mol^{-1}), incluso el testigo registró altas concentraciones, al respecto, Sekhar *et al.* (2014), mencionan que el CO_2 que se encuentra en los espacios subestomáticos se encuentra en espera de ser asimilado, es decir, el carbono se encuentra acumulado y no ha sido utilizado por la planta en el proceso fotosintético, por lo tanto, una tasa de asimilación elevada junto con una baja concentración del carbono intercelular mantiene un mecanismo fotosintético saludable y más eficiente.

Por otra parte, según Jarma *et al.* (2005) la conductancia estomática es directamente proporcional a la transpiración. *R. intraradices* + 100% de ET_o y *R. intraradices* + 80% de ET_o son los tratamientos que tuvieron los valores más altos en conductancia estomática (0.14 y 0.12 µmol m^{-2} s^{-1} respectivamente) y en transpiración (3.59 y 2.89 mmol m^{-2} s^{-1} respectivamente). La baja conductancia estomática probablemente se debió al cierre de la cámara estomática como consecuencia de una menor necesidad de enfriamiento. El comportamiento de la transpiración estuvo relacionado con las cantidades de agua aplicadas, los tratamientos con 60 y 120% de ET_o transpiraron menos que el 80 y 100% de ET_o. En este caso se puede mencionar que el tratamiento con mayor cantidad de agua (120% ET_o) pudo haber saturado el espacio poroso del suelo y, por lo tanto, generarse inactividad radical y en el tratamiento con menor cantidad de agua (60% ET_o) es posible que las raíces invirtieran mayor esfuerzo en vencer la tensión de humedad del suelo.

El uso eficiente del agua (UEA) instantáneo que se registró es el fisiológico, se calculó mediante el cociente; fotosíntesis (µmol CO_2) / transpiración (mmol H_20). Los tratamientos de riego con 60 y 80% de la ET_o tuvieron el mayor UEA en plantas inoculadas con *R. intraradices* (1.74 y 1.87 µmol CO_2 $mmol^{-1}$ H_20 respectivamente). Las plantas inoculadas con *Bacillus spp.* + *A. brasilense* y plantas testigo regadas con 100% de la ET_o tuvieron el mayor UEA (2.30 y 2.19 µmol CO_2 $mmol^{-1}$ H_20), sin embargo, en estos tratamientos no se vio favorecida la asimilación de CO_2 (fotosíntesis).

Cuadro 2.2. Intercambio de gases registrado 120 ddt entre las 12:00 y las 13:00 horas del día en plantas de *Stevia rebaudiana* Bert., sometidas a cuatro láminas de riego con base en la evapotranspiración de referencia (ET_o) en interacción con inoculantes microbianos.

Variables	Fracción de la ET_o (%)	*Bacillus* spp + *Azospirillum brasilense*	*Rhizophagus intraradices*	Testigo
		($\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)		
Fotosíntesis	60	1.61 ±0.40^{b}	2.25±0.62^{b}	1.30±0.57^{b}
	80	2.64±0.60^{a}	5.41±1.11^{a}	0.14±0.13^{c}
	100	2.23±0.80^{a}	5.26±1.16^{a}	4.72±0.81^{a}
	120	2.05±0.92^{a}	3.01±1.17^{ab}	1.73±0.95^{b}
		($mmol\ mol^{-1}$)		
Carbono intercelular	60	314.91±10.97^{b}	323.23±21.88^{a}	347.32±16.60^{a}
	80	320.83±22.77^{b}	304.91±9.79^{ab}	372.64±9.38^{a}
	100	309.56±12.35^{b}	281.78±5.72^{b}	281.38±6.81^{b}
	120	372.95±27.75^{a}	342.32±13.05^{a}	382.58±25.19^{a}
		($\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)		
Conductancia estomática	60	0.03±0.00^{a}	0.04±0.01^{c}	0.03±0.01^{b}
	80	0.05±0.01^{a}	0.12±0.02^{a}	0.02±0.00^{b}
	100	0.03±0.00^{a}	0.14±0.03^{a}	0.08±0.02^{a}
	120	0.05±0.01^{a}	0.07±0.02^{b}	0.04±0.01^{b}
		($mmol\ m^{-2}\ s^{-1}$)		
Transpiración	60	1.00±0.15^{b}	1.29±0.28^{b}	0.97±0.14^{b}
	80	1.44±0.22^{a}	2.89±0.53^{a}	0.73±0.04^{c}
	100	0.97±0.12^{ab}	3.59±0.69^{a}	2.16±0.43^{a}
	120	1.36±0.32^{a}	1.87±0.50^{ab}	1.11±0.28^{b}
		($\mu mol\ CO_2\ mmol^{-1}\ H_20$)		
Uso eficiente del agua	60	1.61±0.23^{a}	1.74±0.45^{a}	1.34±0.38^{b}
	80	1.83±0.45^{a}	1.87±0.22^{a}	0.19±0.20^{c}
	100	2.30±0.24^{a}	1.47±0.08^{b}	2.19±0.05^{a}
	120	1.51±0.55^{b}	1.61±0.30^{b}	1.56±0.52^{b}

Medias (n=8) ± EE. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas (Tukey, $P \leq 0.05$).

2.4.4. Colonización micorrícica

La colonización por *Rhizophagus intraradices* 120 ddt en las raíces de plantas inoculadas de estevia oscilaron entre 90-100%. Obteniéndose los mejores resultados cuando se aplicó el riego con 80 y 100% de la ET_o que permitieron una colonización del

100 y 97.5% respectivamente. Éstos valores son superiores a los reportados por Herrera-Parra *et al.* (2014) en plantas de *Carica papaya* L. cv. Maradol al inocularlas con *R. intraradices* y *Funneliformis mosseae* cuyos porcentajes de colonización se estimaron en 24 y 39%, respectivamente. Aun cuando *C. papaya*, es una planta altamente colonizada por HMA, se sabe que existen factores como; pH, contenido de fósforo, aireación, textura, contenido de materia orgánica, intensidad y duración de la luz, temperatura, humedad y variedad de hospedante, que pueden afectar el establecimiento de las micorrizas (Pérez y Vertel, 2010). Schüßler *et al*. (2001) mencionan que el mejoramiento de las condiciones físicas y químicas del sustrato, promueve un incremento en el desarrollo y actividad de los microorganismos benéficos en especial de hongos micorrícicos arbusculares pertenecientes a la división Glomeromicota, los cuales forman simbiosis con las raíces de la mayoría de las plantas de interés agrícola. Los tratamientos testigo (sin inoculante) con 80 y 100% de la ET_o registraron 2.5 y 7.7% de colonización respectivamente, este resultado es debido probablemente a una posible contaminación del sustrato al momento de la inoculación (Cuadro 2.3). Se observaron estructuras como vesículas e hifas del hongo colonizando las raíces de las plantas de estevia evaluadas (Figura 2.3). Según Hayman (1978) la micorriza arbuscular se caracteriza por presentar una extensa red de micelio en el suelo donde está presente, unida al sistema radical de las plantas hospedantes.

Cuadro 2.3. Colonización micorrícica total por *Rhizophagus intraradices* en plantas inoculadas de *Stevia rebaudiana* Bert. sometidas a diferentes láminas de riego.

Fracción de la ET_o (%)	Inoculadas	Testigo
	CMT (%)	
60	95.0	0
80	100.0	2.5
100	97.5	7.5
120	90.0	0

CMT= Colonización micorrícica total.

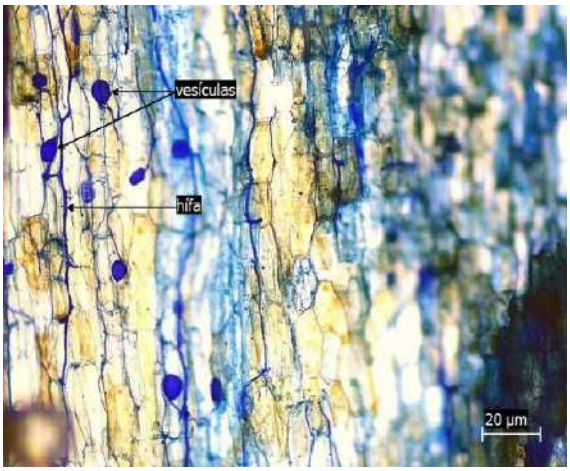

Figura 2.3. Vesículas e hifas de *Rhizophagus intraradices* en raíces de *Stevia rebaudiana*.

2.5. CONCLUSIÓNES

La lámina de riego de 120% de la evapotranspiración de referencia con base en el tanque evaporímetro tipo "A" incrementa el área foliar y el rendimiento en plantas de *Stevia rebaudiana* Bert. La inoculación de *Rhizophagus intraradices,* así como de la mezcla *Bacillus* spp. y *Azospirillum brasilense* estimula la longitud de raíz y mejora el rendimiento. El uso de *R. intraradices* en una lámina de riego del 100% ET_o mejora la fotosíntesis y promueve la acumulación de biomasa seca de hoja y raíz. Sin embargo, el uso eficiente del agua mejoró con el riego de 80% ET_o en interacción con *R. intraradices,* pero a este nivel de humedad no hay efecto positivo en la producción de biomasa aérea. Tanto el hongo *R. intraradices* como el consorcio de bacterias *Bacillus* spp. y *Azospirillum brasilense* pueden ser una opción viable para asociarse simbióticamente con *S. rebaudiana* Bert.

2.6. LITERATURA CITADA

Aguirre, J., Irizar, M., Durán, A., Grajeda, O., Peña, M., Loredo, C., Gutiérrez, B. A. (2009). Los biofertilizantes microbianos: Alternativa para la agricultura en México. INIFAP. Folleto técnico (5), 78.

Arizaleta, M., Pire, R. (2008). Respuesta de plántulas de cafeto al tamaño de la bolsa y fertilización con nitrógeno y fosforo en vivero. Agrociencia. 42(1), 47-55.

Balaguera, H. E., Herrera, J. G. Á., Rodríguez, J. D. (2008). Efecto del déficit de agua en el trasplante de plántulas de tomate (*Lycopersicum esculentum* L.). Agronomía Colombiana 26(2), 246-255.

Brandle, J. E., Starratt, A. N., Gijzen, M. (1998). *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. Canadian Journal of plant science. 78(4), 527-536.

Casierra-Posada, F. E., Rodríguez, S. Y. (2006). Tolerancia de plantas de feijoa (*Accasellowiana* [Berg] Burret) a la salinidad por NaCl. Agronomía colombiana. 24(2), 258-265.

Compant, S., Clément, C., Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospect for utilization. Soil Biology and Biochemmistry. 42(5), 669-678.

Doorenbos, J., W. O. Pruitt. (1977). Guidelines for predicting crop water requirements. Irrigation and drainage paper 24. FAO. Rome, Italy. 24, 1-144.

Fabeiro, C., de Santa Olalla, F. M., De Juan, J. A. (2002). Production of muskmelon (*Cucumis melo* L.) under controlled deficit irrigation in a semi-arid climate. Agricultural Water Management. 54(2), 93-105.

García, E., Villafañe, R., Basso, C., Florentino, A. (2015). Dinámica de la humedad del suelo y su efecto sobre el rendimiento de la estevia. Venesuelos 23, 5-10.

Garruña-Hernández, R., Orellana, R., Larque-Saavedra, A., Canto, A. (2014). Understanding the physiological responses of a tropical crop (*Capsicum chinense* Jacq.) at high temperature. PLoS ONE, 9(11) p. 9.

Giovannetti, M., B. Mosse. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytologist 84:489-500.

Gil, R. (2007). Información técnica de trigo y otros cultivos de invierno. Publicación miscelánea. 107, 12-16.

Godoy Ávila, C., Pérez Gutiérrez, A., Torres, C. A., Hermosillo, L. J., Reyes, I. (2003). Uso de agua, producción de forraje y relaciones hídricas en alfalfa con riego por goteo subsuperficial. Agrociencia 37(2), 107-115.

Hayman, D. S. (1978). Endomycorrhizae. Interaction between nonpathogenic soil microorganisms and plants. Elsevier Scientific Publishing. Amsterdam, The Netherlands. 401-442.

Herrera-Parra, E., Lozano-Contreras, M. G., Santamaria-Basulto, F., Cristobal-Alejo, J., Cabrera-Hidalgo, A. J., Marban-Mendoza, N. (2014). Inoculantes micorrícicos para el control de *Rotylenchulus reniformis* (TYLENCHIDA: HOPLOLAIMIDAE) en *Carica papaya* CV. Maradol. Nematropica, 44(2), 218-227.

Lavini, 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. Italian journal of agronomy. 3(2), 135-143.

Lozano Contreras, M. G., Ramírez Jaramillo, G. (2015). Enraizamiento de esquejes de estevia con biofertilizantes. Centro de investigación regional sureste. Campo experimental Mocochá. Mérida, Yucatán. Desplegable para productores No. 6.

Lubbe, A., Verpoorte, R. (2011). Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. Industrial crops and products. 34 (1), 785-801.

Lugtenberg, B., Kamilova, F. (2009). Plant growth promoting rhizobacteria. Annual Review Microbiology 63, 541-556.

Martínez Cruz, M. (2015). *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Una revisión. Cultivos Tropicales. 36(1), 5-15.

Márdero, S., Nickl, E., Schmook, B., Schneider, L., Rogan, J., Christman, Z., Lawrence, D. (2012). Sequías en el sur de la península de Yucatán: análisis de la variabilidad anual y estacional de la precipitación. Investigaciones geográficas, Boletín del Instituto de Geografía-Unam 78, 19-33.

Medrano, H., Bota, J., Cifre, J., Flexas, J., Ribas-Carbó, M., Gulías, J. (2007). Eficiencia en el uso del agua por las plantas. Investigaciones geográficas. Universidad de Alicate. 43, 63-84.

Mohamed, S. M., El-Ghait, E. A., Youssef, A. S. M., Khalil, A. M. M., Attia, K. E. (2012). Effect of irrigation rate and some fertilization treatments on vegetative growth and chemical composition of *Stevia rebaudiana*. Annals of Agric. Sci., Moshtohor, 50(4), 435-446.

Navi, V., Shivakumar, B. S., Suresh, C. K., Earanna, N. (2010). Effect of Glomus fasciculatum and plant growth promoting rhizobacteria on growth and yield of Ocimum basilicum. Karnataka Journal of Agricultural Sciences. 19(1), 17-20.

Pérez, C. A., M. M. Vertel. (2010). Evaluación de la colonización de micorrizas arbusculares en pasto *Bothriochloa pertusa* (L) A. Camus. Revista MVZ Córdoba 3:2165-2174.

Pérez-Gutiérrez, A., Pineda-Doporto, A., Latournerie-Moreno, L., Pam-Pech, W., Godoy-Ávila, C. (2008). Niveles de evapotranspiración potencial en la producción de chile habanero. Terra Latinoamericana. 26(1), 53-59.

Pire, R., Valenzuela, I. (1995). Estimación del área foliar en *Vitis vinifera* L. French Colombard a partir de mediciones lineales en las hojas. Agronomía tropical. 45(1), 143-154.

Phillips, G. M, D. S. Hayman. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions British Mycological Society 55:158-161.

Quintal Ortiz, W. C., Pérez-Gutiérrez, A., Latournerie Moreno, L., May-Lara, C., Ruiz Sánchez, E., Martínez Chacón, A. J. (2012). Water Use, Water Potential and Yield of Habanero Pepper (*Capsicum Chinense* Jacq.). Revista Fitotecnia Mexicana. 35(2), 155-160.

Ramírez, J. G., Avilés, B. W., Moguel, O. Y., Góngora, G. S., May, L. C. (2011). Estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) un cultivo con potencial productivo en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Sureste. Publicación especial. (4), 84.

Sekhar, K. M., Rachapudi, V. S., Mudalkar, S., Reddy, A. R. (2014). Persistent stimulation of photosynthesis in short rotation coppice mulberry under elevated CO2 atmosphere. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 137, 21-30.

Schüßler, A., D. Schwarzott, C. Walter. (2001). A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. Mycol. Res. 105: 1413-1421.

Valladares, F., Vilagrosa, A., Peñuelas, J., Ogaya, R., Camarero, J. J., Corcuera, L., Gil-Pelegrín, E. (2004). Estrés hídrico: ecofisiología y escalas de la sequía. Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante. 2, 165-192.