

## **Productividad de *Stevia rebaudiana* Bertoni con diferentes láminas de riego e inoculantes microbianos**

### **Productivity of *Stevia rebaudiana* Bertoni with different irrigation slides and microbial inoculants**

R. Cauich Cauich<sup>1</sup>, A. Pérez Gutiérrez<sup>1</sup>, M. G. Lozano Contreras<sup>2</sup>, R. Garruña<sup>3</sup> y E. Ruíz Sánchez<sup>1</sup>

**Palabras clave:** hierba dulce; uso eficiente del agua; biofertilizantes; transpiración  
**Keywords:** sweet grass; efficient use of water; biofertilizers; transpiration

Recepción: 18-09-2017 / Aceptación: 21-12-2017

#### **Resumen**

**Introducción:** Las hojas son el órgano más importante en la planta de *Stevia rebaudiana* Bertoni, debido a que en ellas se encuentra la mayor cantidad de edulcorante. La formación de hojas está determinada por el adecuado crecimiento de raíces y la cantidad de agua disponible en el suelo. El objetivo del presente estudio fue evaluar la respuesta de plantas de *S.rebaudiana* Bert. a cuatro láminas de riego calculadas a partir de la evapotranspiración de referencia ( $ET_0$ ) en interacción con inoculantes microbianos.

**Método:** Se aplicaron tratamientos de riego con 60, 80, 100 y 120% de la  $ET_0$  estimada con un tanque evaporímetro tipo “A” en plantas previamente inoculadas. Se evaluaron como inoculantes una mezcla de *Bacillus spp.* y *Azospirillum brasilense*, *Rhizophagus intraradices* y un testigo (sin inocular). Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con arreglo bi-factorial y cuatro repeticiones. Se evaluaron parámetros de crecimiento, producción y distribución de biomasa seca, intercambio de gases y uso eficiente del agua.

**Resultados:** Se encontró diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ ) causada por los factores separados. La mayor altura se obtuvo con 120%  $ET_0$ , aunque fue estadísticamente igual a 100%  $ET_0$  ( $p \leq 0.05$ ), alcanzando 42.86 y 40.58 cm, respectivamente; la mayor área foliar se obtuvo con 120%  $ET_0$ . El tratamiento con *Rhizophagus intraradices* mostró diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en la longitud de raíz contra el testigo, pero fue estadísticamente similar a la mezcla de rizobacterias. De igual forma, *R. intraradices* mejoró el volumen de raíz registrando 2.49 cm<sup>3</sup> con respecto al testigo y redujo en 20% la aplicación de la  $ET_0$  para obtener la mayor producción de biomasa seca de hoja y raíz. La interacción *R. intraradices* + 80%  $ET_0$  favoreció la asimilación del CO<sub>2</sub>

<sup>1</sup>División de estudios de posgrado e investigación, Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán

<sup>2</sup>Instituto Nacional Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo experimental Mochochá. E-mail: lozano.monica@inifap.gob.mx

<sup>3</sup>Catedrático CONACYT-Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán

con  $5.41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , de esta manera se proporcionó mejores condiciones para la transpiración y el uso eficiente del agua ( $1.87 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ ).

**Conclusión:** Los tratamientos de riego mostraron efectos en la altura, área foliar, diámetro del tallo y rendimiento de hoja seca, mientras que el factor inoculante sólo afectó la longitud de raíz, volumen de raíz, relación MSV/MSR y rendimiento. Por último, la interacción de ambos factores solo fue significativa para la producción de biomasa seca e intercambio de gases.

## Abstract

**Introduction:** Leaves are the most important organ in the plant of *Stevia rebaudiana* Bertoni, because in them is the greater amount of sweetener. Leaf emission is determined by adequate root growth and the amount of water available in the soil. The objective of the present study was to evaluate the respond of *S. rebaudiana* Bert plants to four irrigation sheets calculated from reference evapotranspiration ( $\text{ET}_0$ ) in interaction with microbial inoculants.

**Method:** Treatments were irrigation with 60, 80, 100 and 120% of the estimated  $\text{ET}_0$  with an "A" type evaporimeter tank in previously inoculated plants. A mixture of *Bacillus* spp. and *Azospirillum brasilense*, *Rhizophagus intraradices* and a control (uninoculated). A randomized complete block design with bi-factorial arrangement and four replicates was applied. Growth, production and distribution parameters of dry biomass, gas exchange and water efficiency were evaluated.

**Results:** Statistical difference ( $P \leq 0.05$ ) was found by separate factors. The best height was obtained with 120%  $\text{ET}_0$ , although it was statistically equal ( $P \leq 0.05$ ) to 100%  $\text{ET}_0$  registering 42.86 and 40.58 cm respectively, 120%  $\text{ET}_0$  was recorded greater leaf area. Treatment with *Rhizophagus intraradices* showed significant differences ( $P \leq 0.05$ ) in the root length against the control, but not against the mixture of rhizobacteria. In the same way *R. intraradices* improved the root volume by registering  $2.49 \text{ cm}^3$  with respect to the control, and allowed to reduce the application of  $\text{ET}_0$  by 20% to obtain the highest production of dry leaf and root biomass. The interaction *R. intraradices* + 80%  $\text{ET}_0$  favored the assimilation of  $\text{CO}_2$  with  $5.41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , thus providing better conditions for transpiration and efficient water use ( $1.87 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ ).

**Conclusion:** The irrigation factor showed effect on leaf height, leaf area, stem diameter and dry leaf yield, while inoculating factor only affected root length, root volume, MSV / MSR ratio and

yield. Finally, the interaction of both factors was only significant in the parameters of dry biomass production and gas exchange.

---

## **Introducción**

La estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) o hierba dulce es una planta herbácea perenne de la familia Asteraceae, considerada como la principal productora de un edulcorante natural no calórico llamado esteviósido, el cual se distingue de los edulcorantes sintéticos por no tener sabor metálico y no ser cancerígeno (Brandle *et al.*, 1998, 527). 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, 796).

La producción de estevia promete ser una actividad rentable, toda vez que una hectárea de estevia produce en edulcorante lo equivalente a 36 ha de caña de azúcar (Mohamed *et al.*, 2012, 436); la parte importante de la planta es la hoja, la cual se procesa e industrializa por ser el órgano donde se encuentra la mayor cantidad de edulcorante o glucósidos, por lo que es de suma importancia incrementar el número de hojas en la planta (Martínez, 2015, 5). La producción de hojas de un cultivo está estrechamente asociada a la humedad disponible en el suelo. Medrano *et al.* (2007, 66) afirmaron que la producción de biomasa sin agua es imposible para las plantas, lo cual obedece a que el proceso base de la producción de biomasa (fotosíntesis) y del gasto de agua (transpiración) son codependientes. En este contexto, la entrada de CO<sub>2</sub> y la salida del agua utilizan la misma vía (los estomas de las hojas), es decir, cuanto más abiertos más fácilmente ingresa el CO<sub>2</sub> pero también más rápidamente se escapa el agua. Se ha demostrado que la producción de estevia requiere de riegos frecuentes para mantener la humedad del suelo arriba del PMP hasta el 80% de su CC, toda vez que el estrés hídrico reduce la producción foliar (Lavini *et al.*, 2008, 136).

La programación eficiente del riego aunada a un mayor uso eficiente del agua por las plantas es fundamental para el éxito de la producción. El volumen de agua para riego de un cultivo se puede estimar a partir de un porcentaje de la evapotranspiración de referencia (ET<sub>o</sub>) mediante un coeficiente de ajuste o de uso consumptivo (Godoy *et al.*, 2003, 108). Pérez-Gutiérrez *et al.* (2008, 56) encontraron que al regar con el 80% de la ET<sub>o</sub> 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, también llamados inoculantes microbianos. Entre ellos se utilizan como inoculantes microbianos las bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azotobacter*, *Anabaena*, *Frankia*, *Bacillus* y *Pseudomonas*, asimismo, los hongos *Rhizophagus intraradices* y *Trichoderma* spp. (Lugtenberg y Kamilova, 2009, 544). Dichos microorganismos, además de mejorar la fertilidad del suelo y el crecimiento vegetal mediante la síntesis de reguladores de crecimiento, también pueden mejorar la asimilación de CO<sub>2</sub>, asimismo, modificar la apertura estomática y la transpiración en la planta (Compant *et al.*, 2010, 673), lo que permite un mejor uso eficiente del agua. Borda-Molina *et al.* (2009, 75) obtuvieron un aumento del 15% en la producción de biomasa fresca y un efecto positivo en la concentración de glucósidos en plantas de *S. rebaudiana* Bert., inoculadas con *Azotobacter nigricans* en comparación a plantas no inoculadas. Por lo antes expuesto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la respuesta de plantas de *Stevia rebaudiana* Bert. a cuatro láminas de riego calculadas con la ET<sub>o</sub> e inoculadas con una mezcla de *Bacillus* spp. más *Azospirillum brasilense* y *Rhizophagus intraradices*.

## **Métodos**

### **Sitio experimental**

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 21° 04' N y 89° 31' O, a una altitud de 8 m, con clima predominante tipo Aw<sub>o</sub> (x') (i') g (Márdero *et al.*, 2012, 21).

### **Material vegetal e Inoculantes microbianos**

Se seleccionaron esquejes a partir de plantas cultivadas con seis meses de edad de *Stevia rebaudiana* Bertoni variedad Morita II, para ser inoculados con dos productos comerciales y un testigo. La inoculación se llevó a cabo el 11 de febrero de 2016 inmediatamente después de obtener los esquejes. Los tratamientos fueron, (1) Mezcla de *Bacillus* spp. y *Azospirillum brasilense* (1x10<sup>8</sup> ufc mL<sup>-1</sup>) (BactoCROP<sup>MR</sup>), (2) *Rhizophagus intraradices* (1 espora mL<sup>-1</sup>) (Micorriza INIFAP<sup>MR</sup>) y (3) Testigo (sin inoculante). Los inoculantes se obtuvieron en forma sólida y se diluyeron en agua corriente 70 g L<sup>-1</sup>, con pH de 6.5, agitando por 2 minutos para

mantener la solución homogénea. La inoculación se realizó según la metodología propuesta por Lozano y Ramírez (2015, 2), la cual consistió en remojar los esquejes de *S. rebaudiana* Bert., previamente multiplicados durante un minuto en la solución antes de la siembra.

### **Establecimiento de plantas y aplicación del riego**

El trasplante se realizó el 18 de marzo de 2016, cuando las plántulas alcanzaron una altura de 15 cm en promedio en bolsas de polietileno con capacidad de 7 L con 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, posteriormente se cubrió con un plástico de polietileno calibre 800 color negro durante tres días y se permitió aireación 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. Para la aplicación del riego se utilizó el sistema de goteo con cinta calibre 8000, con emisores cada 0.30 m; el gasto por emisor fue de 1 L h<sup>-1</sup>, presión de operación de 1 kg cm<sup>-2</sup> y una bomba centrífuga de 1 HP. Al inicio del estudio se aplicó un riego para recuperar la humedad del sustrato a su capacidad de campo con la finalidad de homogenizar el nivel de humedad en el sustrato. La lámina de riego que comprende la fracción de humedad aprovechable en el sustrato se calculó por medio de la ecuación:  $L_r = (\theta_{CC} - \theta_{PMP}) * P_r$ , donde;  $L_r$  = Lámina de riego (cm),  $\theta_{CC}$  = Capacidad de campo (%),  $\theta_{PMP}$  = Punto de marchitez permanente (%) y  $P_r$  = Profundidad de humedecimiento (m) (Quintal *et al.*, 2012, 156). Los parámetros del suelo; CC y PMP se determinaron por medio de un análisis en laboratorio de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000, MÉTODO AS-06.

### **Evapotranspiración de referencia**

Después del riego inicial mencionado, se aplicaron tratamientos de riego en función del 60, 80, 100 y 120% de la  $ET_o$  en las plantas de *S. rebaudiana* Bert., previamente inoculadas; dichas 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<sup>-1</sup>),  $E_o$ : Evaporación registrada en el tanque tipo “A” (mm día<sup>-1</sup>) y  $K_t$ : Coeficiente del tanque, en función de la velocidad del viento y humedad relativa (Cuadro 1). Una vez obtenidos los resultados de la  $ET_o$ , la lámina de riego se calculó mediante la

ecuación:  $L_r = ET_o * F$ , donde  $L_r$ : Lámina de riego (mm día<sup>-1</sup>),  $ET_o$ : Evapotranspiración de referencia (mm día<sup>-1</sup>),  $F$ : Fracción de la  $ET_o$  (0.6, 0.8, 1.0 y 1.2) (Doorenbos y Pruitt, 1977 30). A su vez, el volumen de agua a aplicar se calculó mediante la ecuación  $V_A = L_r * A$ , donde;  $V_A$  = Volumen de agua (cm<sup>3</sup>),  $L_r$  = Lámina de riego (cm),  $A$  = Área de la bolsa (cm<sup>2</sup>). El volumen total de agua aplicado en cada porcentaje de  $ET_o$  se muestra en el Cuadro 2.

**Cuadro 1.** Evapotranspiración de referencia ( $ET_o$ ) en plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni a partir del coeficiente del tanque ( $K_t$ ) y la evaporación diaria ( $E_o$ ) en un periodo de 120 días experimentales, del 26 de marzo al 23 de julio de 2016.

Ciclo de cultivo	Días	* $K_t$	$E_o$ (mm día <sup>-1</sup> )	$ET_o$ (mm día <sup>-1</sup> )
Marzo	6	0.75	57.0	42.75
Abril	30	0.75	96.0	72.00
Mayo	31	0.75	132.5	99.37
Junio	30	0.75	128.0	96.00
Julio	23	0.75	79.0	59.25
Total	120		492.5	369.37

\*Coeficiente del tanque ( $K_t$ ) tipo A: Vientos moderados de 175-425 km día<sup>-1</sup>; humedad relativa media de 40-70%.

**Cuadro 2.** Volumen de agua aplicado en *Stevia rebaudiana* Bert., bajo diferentes fracciones de la evapotranspiración de referencia en un periodo de 120 días experimentales, del 26 de marzo al 23 de julio de 2016.

$ET_o$ (%)	Fracción de la $ET_o$	*Lámina total de riego (mm planta <sup>-1</sup> )	Vol. total de agua de riego (L planta <sup>-1</sup> )
60	0.6	262.80	72.81
80	0.8	350.40	97.09
100	1.0	438.00	121.36
120	1.2	525.60	145.63

\*La lámina total de riego es igual a la suma del riego aplicado por día; calculado en base a la fracción de la evapotranspiración de referencia diaria.

### Manejo del cultivo

Se realizaron dos podas al cultivo; la primera a los 10 días después del trasplante (ddt) con la finalidad de eliminar la dominancia apical e inducir brotes y la segunda se realizó a los 20 ddt para eliminar la floración del cultivo, la cual no es recomendable por que disminuye el tamaño de la hoja. Se realizaron dos cortes de hoja, el primero a los 60 ddt, momento en que se consideró para la primera cosecha y el segundo corte a los 120 ddt, al final del experimento. Según Aguirre (2009, 57), se pueden obtener resultados favorables aplicando fertilizantes químicos en dosis aproximadas al 50% de la recomendada más los inoculantes microbianos, en este sentido, la

fertilización se aplicó de forma manual cada 2 días el 50% de la dosis recomendada por Ramírez *et al.* (2011, 28) y se realizaron aplicaciones de productos orgánicos para el control preventivo de plagas y enfermedades.

### **Diseño experimental y variables respuesta**

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

A los 120 ddt se evaluó el crecimiento de la planta mediante las variables, altura final de la planta medida con un flexómetro desde la base del tallo hasta el último ápice foliar, el diámetro del tallo, medido con un vernier digital colocado a 3 cm de la superficie del suelo, área foliar por medio de la ecuación  $AF = W \text{ hojas} / \delta$ , donde; W hojas= peso del conjunto de hojas muestra y  $\delta$ = densidad superficial (Pire y Valenzuela, 1995, 2), la longitud de la raíz con un flexómetro y el volumen de raíces por la técnica de desplazamiento con una probeta de vidrio de 500 mL. De manera adicional, se calculó el índice morfológico considerando la materia seca del vástago entre materia seca radicular (MSV/MSR). Según Arizaleta y Pire (2008, 49), dicho coeficiente es un indicador de la calidad de la planta, en este sentido, se evaluó la producción y distribución de biomasa seca, para ello se separaron los órganos de la planta (raíz, tallo, hojas), los cuales se depositaron en bolsas de papel y se secaron en una estufa de aire forzado a 65 °C hasta peso constante; posteriormente se pesaron en una balanza analítica. El rendimiento de hoja seca total se determinó a partir de los cortes realizados a los 60 y 120 ddt (cosechas 1 y 2).

La tasa de asimilación neta de CO<sub>2</sub> (fotosíntesis), concentración del carbono intercelular, conductancia estomática, transpiración y uso eficiente del agua a escala foliar se midieron con un analizador de gases en infrarrojo (LICOR LI-6400, Nebraska, Estados Unidos). Las mediciones se realizaron a los 120 ddt entre las 12:00 y las 13:00 horas cuando ocurría la mayor densidad de flujo de fotones (1000  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Se realizaron 9 lecturas por unidad experimental en hojas jóvenes del estrato alto totalmente expandidas (Garruña-Hernández *et al.*, 2014, 2). Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias (Tukey,  $p \leq 0.05$ ) con el paquete estadístico InfoStat versión 2014 (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

## **Resultados y discusión**

### **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 ddt, al respecto, se infiere que los factores estudiados actuaron de forma independiente en dichas variables donde solo los niveles de riego reflejaron diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ ). La mayor altura se obtuvo con el tratamiento de 120% de la  $ET_0$ , aunque fue estadísticamente igual ( $p \leq 0.05$ ) a 100%  $ET_0$ , registrando 42.86 y 40.58 cm respectivamente; dichos niveles de riego superaron al tratamiento 60% de la  $ET_0$  que tuvo 37.93 cm. Pérez-Gutiérrez *et al.* (2008) al aplicar 120% de la  $ET_0$  en plantas de *Capsicum chinense* Jacq., aunque observaron un comportamiento cuadrático, la tendencia fue descendente y no detectaron incremento significativo en la altura, en tanto que la mayor altura la obtuvieron al aplicar el 80% de la  $ET_0$  (Figura 1A).

El riego de plantas de *S. rebaudiana* Bert. con 120% de la  $ET_0$  generó 45.8% más área foliar que en las plantas que se irrigaron con 60%  $ET_0$  (Figura 1B). Al respecto, Valladares *et al.* (2004, 172) indicaron que en una planta ante déficit de agua se restringe el crecimiento celular ocasionando un escaso desarrollo de las hojas, lo que provoca menor expansión foliar. Balaguera *et al.* (2008, 250) observaron que, con menor presión de turgencia debido a un déficit hídrico, se produce menos área foliar y mayor cierre estomático. El diámetro del tallo alcanzó valores de 4.35, 4.40 y 4.62 mm al regar con 80, 100 y 120% de la  $ET_0$ , respectivamente, comparados con el tratamiento 60%  $ET_0$  que registró 3.87 mm, estadísticamente diferente ( $p \leq 0.05$ ) a los anteriores (Figura 1C).

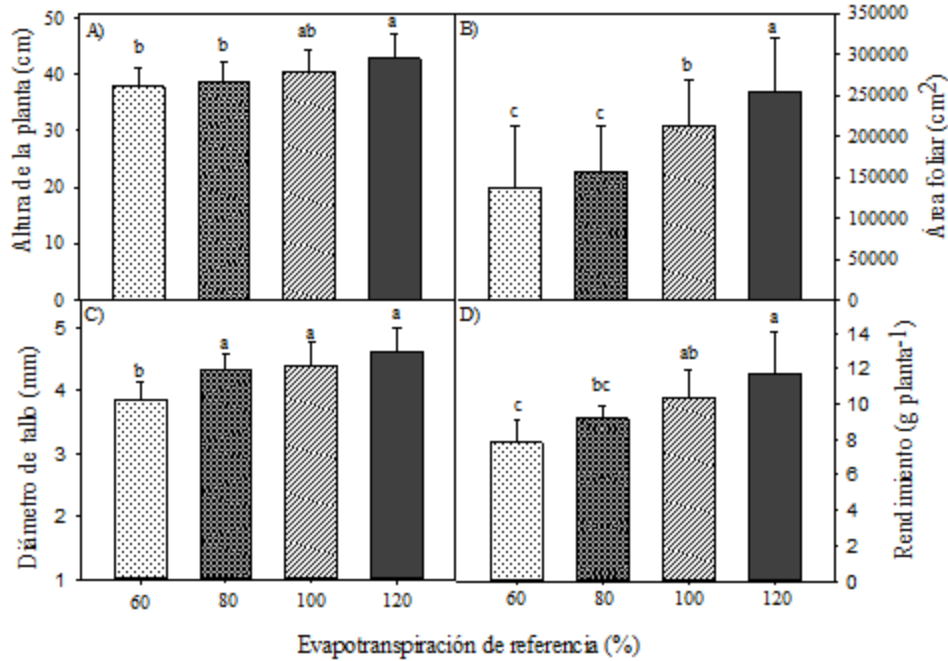
La longitud, volumen radicular y el índice morfológico MSV/MSR, tampoco mostraron diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ ) por efecto de la interacción riego e inoculante a los 120 ddt; dichas variables solo reflejaron diferencia estadística por efecto de los inoculantes microbianos, lo cual sugiere la influencia de los microorganismos sobre los atributos estudiados de la raíz en las plantas. Con relación a la longitud de raíz, las raíces de plantas inoculadas con *Rhizophagus intraradices* alcanzaron 11.14 cm de longitud, detectando diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ ) solo con el tratamiento testigo que registró 9.79 cm (Figura 2A). El volumen de raíz de las plantas testigo fue 1.61 cm<sup>3</sup>, mientras que el tratamiento con *R. intraradices* aumentó 35% el volumen de raíz mostrando diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ ) con los demás tratamientos (Figura 2B). Al



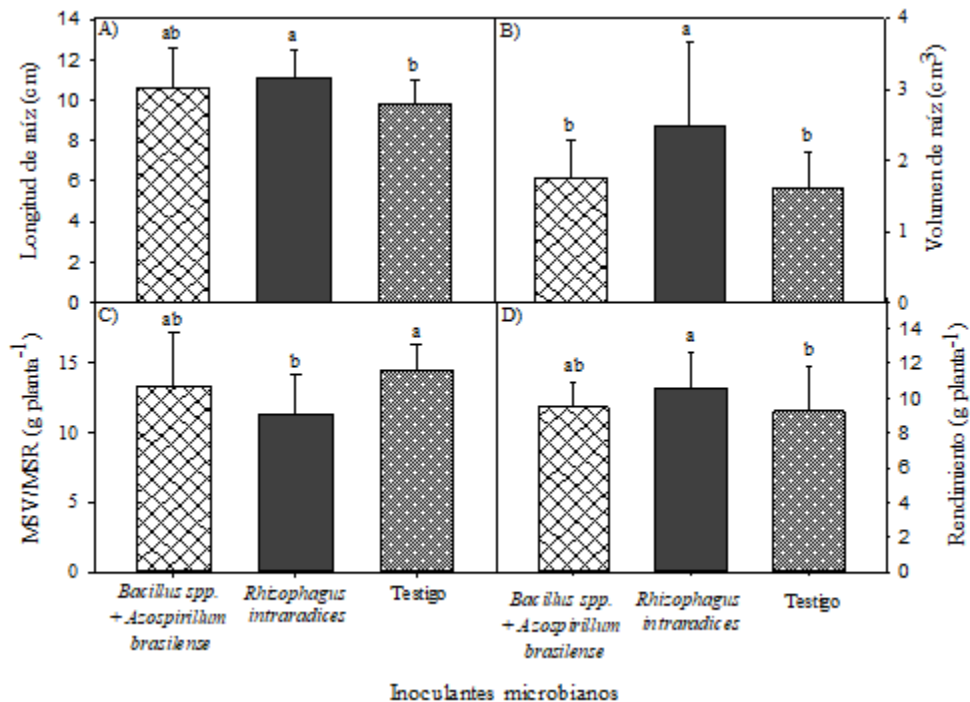
respecto, Gil (2007, 13) afirmó que la inducción a la mayor cantidad de raíces es de suma relevancia para las plantas, ya que de ellas depende la adecuada absorción de agua y nutrientes para su continuo desarrollo.

Para el índice morfológico *materia seca del vástago entre materia seca de la raíz* (MSV/MSR) también se encontró diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ ) entre el tratamiento testigo y el tratamiento con *R. intraradices* con 14.52 y 11.33 g planta<sup>-1</sup> respectivamente. Dicho índice sugiere que las plantas testigo mostraron mayor biomasa aérea que radicular, en tanto que las plantas con *R. intraradices* reflejaron mayor parte radicular que aérea, en este sentido, la distribución de los fotoasimilados favoreció más a la parte radicular que a la parte aérea (Figura 2C). Según Casierra y Rodríguez (2006, 260), la distribución de fotoasimilados en la planta incide directamente sobre la relación raíz-vástago, la cual 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 detectó diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) por la interacción riego e inoculante a los 120 ddt, pero sí por separado. En la figura 1D se observa una tendencia lineal; al regar con 120% de la ET<sub>o</sub> se obtuvo 11.73 g planta<sup>-1</sup> de hoja seca mostrando diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ ) con 60 y 80% ET<sub>o</sub> en los cuales se aplicó un menor volumen de agua. Al respecto, Fabeiro *et al.* (2002, 98) mencionaron que el rendimiento de las plantas refleja una tendencia 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. Tal respuesta fue similar a lo observado en la altura de la planta, lo cual al parecer se debió a que aún aumentando la humedad en el suelo se contó con disponibilidad de oxígeno, favoreciendo el crecimiento de la planta. Con respecto a los inoculantes microbianos, solo se observó efecto de la micorriza *R. intraradices* en el rendimiento de hoja seca con 10.58 g planta<sup>-1</sup>, manifestando diferencia estadística ( $p \leq 0.05$ ) con el testigo (Figura 2D). Navi *et al.* (2006, 18) 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 estadísticamente similar ( $p \leq 0.05$ ) a los demás tratamientos.



**Figura 1.** A) Altura, B) Área foliar, C) Diámetro de tallo y D) rendimiento de dos cortes de hoja seca de plantas de *Stevia rebaudiana* Bert., regadas con el 60, 80, 100 y 120% de la ET<sub>0</sub> en un periodo de 120 días experimentales. Medias (n= 48) ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, p≤0.05).



**Figura 2.** A) Longitud de raíz, B) Volumen de raíz, C) Índice morfológico materia seca del vástago entre materia seca de la raíz (MSV/MSR) y D) rendimiento de dos cortes de hoja seca de plantas de *Stevia rebaudiana* Bert., a 120 ddt., inoculadas con *Bacillus spp.* + *Azospirillum brasiliense* en consorcio y *Rhizophagus intraradices*. Medias (n= 48) ± desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, p≤0.05).

### Producción y distribución de biomasa seca

Las plantas inoculadas con la micorriza *R. intraradices* produjeron el mayor peso seco de raíz, inoculante que generó diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre las regadas con 100%  $ET_0$  (1.66 g planta<sup>-1</sup>) y los demás tratamientos de riego. Este resultado es similar al observado por Zare-Hoseini *et al.* (2015, 696) quienes obtuvieron mayor peso seco de raíz en plantas de *S. rebaudiana* Bert., inoculadas con la micorriza *Glomus mosseae*. En los dos tratamientos con inoculantes microbianos se presentó una relación directa entre la lámina de riego aplicada y el peso seco de tallo, aumentando mientras mayor era el volumen de agua aplicado, siendo la menor lámina (60% de la  $ET_0$ ) la que produjo 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, 248).

El mayor peso seco de las hojas de 10.14 g planta<sup>-1</sup> fue producido por plantas inoculadas con *R. intraradices* y regadas con 100% de la  $ET_0$ , cuya variación fue suficiente para generar diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) con el resto de los tratamientos de riego. A su vez, el efecto de la misma interacción (*R. intraradices* y 100%  $ET_0$ ) mostró la mayor biomasa seca total, en este sentido, la inoculación de la micorriza *R. intraradices* permite reducir un 20% la  $ET_0$  para obtener la mayor producción de biomasa seca total (Cuadro 3).

Por el contrario, el riego con 60% de la  $ET_0$  en interacción con los inoculantes microbianos no favoreció el peso seco en ninguno de los casos. Los resultados obtenidos concuerdan con los de García *et al.* (2015, 7) quienes reportaron que los tratamientos que más afectaron la biomasa de hoja en plantas de *Stevia rebaudiana* fueron los de 40 y 60 % de la evapotranspiración del cultivo ( $ET_c$ ).

**Cuadro 3.** Biomasa seca por órgano a 120 ddt de plantas de *Stevia rebaudiana* Bert., sometidas a cuatro láminas de riego con base en la  $ET_0$  en interacción con inoculantes microbianos.

Biomasa seca	$ET_0$ (%)	<i>Bacillus spp +</i>	<i>Rhizophagus</i>	Testigo
		<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>intraradices</i>	
(g planta <sup>-1</sup> )				
Raíz	60	0.81 ± 0.29 <sup>a</sup>	0.96 ± 0.43 <sup>b</sup>	0.56 ± 0.14 <sup>c</sup>
	80	0.94 ± 0.37 <sup>a</sup>	1.03 ± 0.32 <sup>b</sup>	0.69 ± 0.22 <sup>b</sup>
	100	0.83 ± 0.13 <sup>a</sup>	1.66 ± 0.72 <sup>a</sup>	0.94 ± 0.23 <sup>a</sup>

	120	0.98±0.46 <sup>a</sup>	1.19±0.28 <sup>b</sup>	1.10±0.63 <sup>a</sup>
Tallo	60	3.14±0.73 <sup>d</sup>	3.84±1.28 <sup>c</sup>	3.17±0.72 <sup>d</sup>
	80	4.19±0.45 <sup>c</sup>	4.26±1.16 <sup>c</sup>	3.86±0.80 <sup>c</sup>
	100	4.60±1.09 <sup>b</sup>	5.23±0.88 <sup>b</sup>	4.63±1.26 <sup>b</sup>
	120	5.54±1.18 <sup>a</sup>	6.39±1.30 <sup>a</sup>	6.04±2.00 <sup>a</sup>
Hoja	60	5.49±1.32 <sup>c</sup>	6.30±1.97 <sup>c</sup>	5.32±1.27 <sup>c</sup>
	80	6.79±1.12 <sup>b</sup>	6.86±1.80 <sup>c</sup>	6.33±1.75 <sup>b</sup>
	100	7.12±2.07 <sup>b</sup>	10.14±2.04 <sup>a</sup>	7.87±2.25 <sup>a</sup>
	120	8.60±2.27 <sup>a</sup>	8.61±2.47 <sup>b</sup>	9.29±3.78 <sup>a</sup>
Total	60	9.04±2.00 <sup>c</sup>	10.62±3.30 <sup>b</sup>	8.78±1.85 <sup>d</sup>
	80	11.46±1.27 <sup>b</sup>	11.63±2.93 <sup>b</sup>	10.53±2.30 <sup>c</sup>
	100	12.14±3.10 <sup>b</sup>	16.86±2.32 <sup>a</sup>	12.97±3.20 <sup>b</sup>
	120	14.63±3.16 <sup>a</sup>	16.12±3.48 <sup>a</sup>	15.88±5.70 <sup>a</sup>

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

### Intercambio de gases

La fotosíntesis o tasa de asimilación neta de CO<sub>2</sub> mostró diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos. Las plantas inoculadas con *R. intraradices* y regadas con 80% de la ET<sub>0</sub> presentaron 5.41  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  superando en 51.2% a las plantas inoculadas con *Bacillus spp.* + *A. brasilense* (2.64  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y en 97.4% a las plantas testigo (0.14  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) con la misma lámina de riego (80% ET<sub>0</sub>). El tratamiento 120% de la ET<sub>0</sub> disminuyó la variable en 42.8% (Cuadro 4). Por el contrario, la concentración del carbono intercelular se registró en las plantas inoculadas con *R. intraradices* y sometidas al 60 y 120% de la ET<sub>0</sub> con 323.23 y 342.32 mmol mol<sup>-1</sup>, respectivamente, las cuales no favorecieron la asimilación de CO<sub>2</sub>, mientras que en el tratamiento 80% de la ET<sub>0</sub>, el cual favoreció la asimilación de CO<sub>2</sub>, alcanzó una media de 304.91  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Así mismo, el tratamiento con la mezcla de *Bacillus spp.* + *A. brasilense* registró de igual forma la mayor concentración de carbono intercelular en interacción con 120% de la ET<sub>0</sub> (372.95 mmol mol<sup>-1</sup>), incluso el testigo registró altas concentraciones, en este sentido, es probable que el CO<sub>2</sub> 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.

En virtud de que la conductancia estomática es directamente proporcional a la transpiración (Jarma *et al.* 2005, 211), se corroboró el paralelismo observado entre la

conductancia estomática y la transpiración. El tratamiento *R. intraradices* + 100% ET<sub>o</sub> con 0.14 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y *R. intraradices* + 80% ET<sub>o</sub> con 0.12 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> reflejaron los valores mayores de conductancia estomática y también en transpiración con 3.59 y 2.89 mmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, respectivamente. La baja conductancia estomática al parecer se debió a la baja salida de vapor de agua de la cámara estomática como consecuencia de una menor necesidad de enfriamiento al momento de la medición, en este caso, fue evidente que la transpiración estuvo relacionada con las cantidades de agua aplicadas. Se observó que los tratamientos 60 y 120% de la ET<sub>o</sub> fueron los menos favorecidos, sobresaliendo los de 80 y 100% ET<sub>o</sub>. Los resultados sugieren que el tratamiento con mayor cantidad de agua (120% ET<sub>o</sub>) 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<sub>o</sub>) es posible que las raíces invirtieran mayor esfuerzo en vencer la tensión de humedad del suelo. También la transpiración tuvo correlación con la biomasa seca de las hojas, debido posiblemente a mayor asimilación de CO<sub>2</sub> en las hojas.

El uso eficiente del agua (UEA) instantáneo a escala foliar, se calculó mediante el cociente μmol CO<sub>2</sub>/mmol H<sub>2</sub>O. Los tratamientos con 60 y 80% de la ET<sub>o</sub> reflejaron el mejor UEA en plantas tratadas con *R. intraradices* con 1.74 y 1.87 μmol CO<sub>2</sub> mmol<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O respectivamente. Este resultado es similar al obtenido por Vasilakoglou *et al.* (2015, 13) quienes observaron mayor UEA a nivel productivo en plantas de *S. rebaudiana* Bert., cv Morita crecidas con el 75% de la ET<sub>c</sub>. Se observó que las plantas inoculadas con *Bacillus spp.* + *A. brasilense* y el testigo en interacción con 100% de la ET<sub>o</sub> registraron un elevado UEA (2.30 y 2.19 μmol CO<sub>2</sub> mmol<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O), sin embargo, dichos tratamientos no favorecieron la asimilación de CO<sub>2</sub> en las plantas.

**Cuadro 4.** 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 ET<sub>o</sub> en interacción con inoculantes microbianos.

Variables	ET <sub>o</sub> (%)	<i>Bacillus spp</i> +	<i>Rhizophagus</i>	Testigo
		<i>Azospirillum brasilense</i>	<i>intraradices</i>	
(μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )				
Fotosíntesis	60	1.61 ±1.37 <sup>b</sup>	2.25±2.16 <sup>b</sup>	1.30±1.96 <sup>b</sup>
	80	2.64±2.09 <sup>a</sup>	5.41±3.83 <sup>a</sup>	0.14±0.47 <sup>c</sup>
	100	2.23±2.78 <sup>a</sup>	5.26±4.00 <sup>a</sup>	4.72±2.80 <sup>a</sup>
	120	2.05±3.19 <sup>a</sup>	3.01±4.06 <sup>ab</sup>	1.73±3.28 <sup>b</sup>
(mmol mol <sup>-1</sup> )				
Carbono intercelular	60	314.91±37.99 <sup>b</sup>	323.23±75.57 <sup>a</sup>	347.32±57.49 <sup>a</sup>
	80	320.83±78.88 <sup>b</sup>	304.91±33.90 <sup>ab</sup>	372.64±32.50 <sup>a</sup>
	100	309.56±42.78 <sup>b</sup>	281.78±19.82 <sup>b</sup>	281.38±23.60 <sup>b</sup>

	120	372.95±96.12 <sup>a</sup>	342.32±45.20 <sup>a</sup>	382.58±87.27 <sup>a</sup>
		(μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )		
Conductancia estomática	60	0.03±0.02 <sup>a</sup>	0.04±0.03 <sup>c</sup>	0.03±0.02 <sup>b</sup>
	80	0.05±0.03 <sup>a</sup>	0.12±0.09 <sup>a</sup>	0.02±0.00 <sup>b</sup>
	100	0.03±0.01 <sup>a</sup>	0.14±0.11 <sup>a</sup>	0.08±0.08 <sup>a</sup>
	120	0.05±0.05 <sup>a</sup>	0.07±0.08 <sup>b</sup>	0.04±0.04 <sup>b</sup>
		(mmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )		
Transpiración	60	1.00±0.51 <sup>b</sup>	1.29±0.98 <sup>b</sup>	0.97±0.47 <sup>b</sup>
	80	1.44±0.75 <sup>a</sup>	2.89±1.82 <sup>a</sup>	0.73±0.14 <sup>c</sup>
	100	0.97±0.40 <sup>ab</sup>	3.59±2.38 <sup>a</sup>	2.16±1.50 <sup>a</sup>
	120	1.36±1.10 <sup>a</sup>	1.87±1.71 <sup>ab</sup>	1.11±0.99 <sup>b</sup>
		(μmol CO <sub>2</sub> mmol <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O)		
Uso eficiente del agua	60	1.61±0.79 <sup>a</sup>	1.74±1.57 <sup>a</sup>	1.34±1.33 <sup>b</sup>
	80	1.83±1.56 <sup>a</sup>	1.87±0.75 <sup>a</sup>	0.19±0.69 <sup>c</sup>
	100	2.30±3.97 <sup>a</sup>	1.47±0.73 <sup>b</sup>	2.19±4.30 <sup>a</sup>
	120	1.51±1.92 <sup>b</sup>	1.61±1.05 <sup>b</sup>	1.56±1.81 <sup>b</sup>

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

### **Conclusiones**

La aplicación de riego con 120% de la evapotranspiración de referencia en base al tanque evaporímetro tipo “A” incrementa el área foliar y el rendimiento en plantas de *Stevia rebaudiana* Bert. Con la aplicación de *Rizophagus intraradices* el riego con 100% de la ET<sub>o</sub> es suficiente para promover la acumulación de biomasa seca de hoja y raíz, sin embargo, la transpiración, conductancia estomática de la hoja y el uso del agua se favoreció con el riego al 80% de la ET<sub>o</sub> en interacción con *R. intraradices*, aunque con dicho nivel de humedad no se obtiene efecto positivo en la producción de biomasa aérea.

### **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México por el apoyo recibido mediante la beca número 703497.

### **Referencias**

Aguirre, J., Irizar, M., Durán, A., Grajeda, O., Peña, M., Loredó, C., & Gutiérrez, B. A. (2009). Los biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México. INIFAP. Campo Experimental Rosario Izapa, Tuxtla Chico, Chiapas, México. Folleto técnico (5), 78.

- Arizaleta, M., y 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 (*Solanum lycopersicum* L.). *Agronomía Colombiana* 26(2), 246-255.
- Borda-Molina, D., Pardo-García, J. M., Martínez-Salgado, M. M., Montaña-Lara, J. S. (2009). Producción de un biofertilizante a partir de un aislamiento de *Azotobacter nigricans* obtenido en un cultivo de *Stevia rebaudiana* Bert. *Universitas Scientiarum*, 14(1): 71-78.
- 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 (*Acca sellowiana* [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 & Biochemistry*. 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 Stevia. *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), 1-9.
- Gil, R. (2007). El ambiente del suelo y el crecimiento de las raíces. INTA, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Información técnica de trigo y otros cultivos de invierno. Publicación miscelánea. 107, 12-16.

- Godoy Avila, C., Pérez Gutiérrez, A., Torres, E., C. A., Hermosillo, L. J., Reyes, J., 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. (2005). Aspectos fisiológicos de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en el Caribe colombiano: I. Efecto de la radiación incidente sobre el área foliar y la distribución de biomasa. *Agronomía Colombiana*, 23(2), 207-216.
- 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. *Ital. J. Agron. / Riv. Agron.* 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 Mocochoá. 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 (Esp).* 43, 63-84.
- Mohamed, S. M., El-Ghait, E. M., 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.



Norma Oficial Mexicana, NOM-021-SEMARNAT-2000, MÉTODO AS-06.

Pérez-Gutiérrez, A., Pineda-Doportó, 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.

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.

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. Ministerio de Medio Ambiente, EGRAF, S.A., Madrid.

Vasilakoglou, I., Kalfountzos, D., Gougoulas, N., Reppas, C. (2016). Productivity of two stevia varieties under reduced irrigation and fertilization inputs. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 62(4), 457-472.

Zare Hoseini, R., Mohammadi, E., Kalatejari, S. (2015). Effect of bio-fertilizer on growth, development and nutrient content (leaf and soil) of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Crop Protection*, 4, 691-704.