



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS VERACRUZ**

**POSGRADO EN AGROECOSISTEMAS TROPICALES**

**EFECTO DE *Glomus intraradices* PARA  
MEJORAR EL DESARROLLO DE PLÁNTULAS  
EX VITRO DE ESTEVIA (*Stevia rebaudiana*  
Bertoni) DURANTE LA ACLIMATIZACIÓN**

**TANIA DEL CARMEN VILLALBAZO GARCÍA**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**Tepetates, Manlio Fabio Altamirano, Veracruz, México.**

**2022**



## COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: "Efecto de *Glomus intraradices* para mejorar el desarrollo de plántulas *ex vitro* de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) durante la aclimatización", realizada por la alumna: "Tania del Carmen Villalbazo García", bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
AGROECOSISTEMAS TROPICALES

### CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA

DRA. GALDY HERNÁNDEZ ZÁRATE

CO-DIRECTOR

DR. JERICÓ JABÍN BELLO BELLO

ASESOR

DR. ARTURO PÉREZ VÁZQUEZ

ASESOR

DR. PABLO DÍAZ RIVERA

ASESORA

DRA. MARÍA DEL REFUGIO CASTAÑEDA CHÁVEZ

Tepetates, Manlio Fabio Altamirano, Veracruz, México, diciembre de 2022

# **Efecto de *Glomus intraradices* para mejorar el desarrollo de plántulas *ex vitro* de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) durante la aclimatización**

Tania del Carmen Villalbazo García, M. en C.  
Colegio de Postgraduados, 2022

## **RESUMEN**

Los Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) establecen asociaciones simbióticas con las plantas y mejoran la productividad de los cultivos agrícolas. Este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de diferentes dosis del hongo (*Glomus intraradices*) sobre el desarrollo de plántulas de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) durante la etapa de aclimatización. Se inocularon plántulas de estevia obtenidas *in vitro* con dosis (0 (control), 50, 150, 300 y 450 esporas por plántula) de *G. intraradices*. Después de 60 días de aclimatización, se midieron los porcentajes de colonización y supervivencia, el desarrollo de las plántulas (altura de la plántula, número de hojas, número de raíces por plántula, longitud de la raíz y porcentaje de materia fresca), los contenidos de materia seca, clorofila, carotenoides y macro y micronutrientes. Además, las micorrizas se caracterizaron mediante microscopía de campo claro. Se encontró un efecto de las micorrizas sobre las diferentes variables registradas. La dosis de 150 esporas por plántula, con un 34% de colonización, logró una interacción simbiótica eficiente, mientras que las dosis de 0 y 450 esporas por plántula, con 0 y 44% de colonización, fueron las de menor porcentaje de supervivencia y escaso el desarrollo. La asociación simbiótica entre *G. intraradices* y *S. rebaudiana* se confirmó por microscopía. Se concluye, que la aplicación temprana (60 días) de dosis adecuadas de *G. intraradices* en plántulas de estevia favorece la supervivencia y el desarrollo vegetal; así mismo la simbiosis hongo-plántula representa una ventaja de acondicionamiento previo al trasplante para el establecimiento del cultivo de estevia en campo.

**Palabras clave:** colonización; clorofila; *Glomus intraradices*; microscopía; nutrientes.

## **Effect of *Glomus intraradices* to improves the development *ex vitro* plantlets of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) during acclimatization**

Tania del Carmen Villalbazo García, M. en C.  
Colegio de Postgraduados, 2021

### **ABSTRACT**

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) establish symbiotic associations with plants and improve the productivity of agricultural crops. This study aimed to assess the effect of different doses of *Glomus intraradices* on the development of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) plantlets during the acclimatization stage. Stevia plantlets obtained *in vitro* were inoculated with doses (0 (control), 50, 150, 300 and 450 spores per plantlet) of *G. intraradices*. After 60 days of acclimatization, the colonization and survival percentages, plant development (plantlet height, number of leaves, roots per plantlet, root length, fresh weight), dry matter, chlorophyll, carotenoid, and macro- and micronutrient contents were analyzed. In addition, mycorrhizae were characterized by bright field microscopy. The effect of mycorrhizae on the different variables was determined. The dose of 150 spores per plantlet, with 34% colonization, achieved an efficient symbiotic interaction, whereas, at a dose of 0 and 450 spores per plantlet, with 0 and 44% colonization, the percentage was lower survival rate and poor plant development. The symbiotic association between *G. intraradices* and *S. rebaudiana* was demonstrated by microscopy. It is concluded, that the early application of adequate doses of *G. intraradices* on stevia plantlets favors survival and plant development; so, fungus-plant symbiosis could represent a pre-transplant conditioning advantage for stevia crop establishment in the field.

**Key words:** colonization; chlorophyll; *Glomus intraradices*; microscopy; nutrients.

## **DEDICATORIA**

A mi familia quienes me han brindado su apoyo y dado su amor incondicional día a día, sin ellos el camino hubiera sido más difícil: Margarita García Barradas, Javier Villalbaz Hernández, Lady Villalbaz García, Jazmín Villalbaz García, Fernando Villalbaz Hernández, Vega Canseco Villalbaz y Santiago Llanos Villalbaz.

A mis amigos de toda la vida por sus consejos, buenos deseos y la confianza: Raquel, Ayleen, Sarahí, Raúl, Yadira, Derek y Jesús.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Colegio de Postgraduados Campus Veracruz por brindarme la oportunidad y aceptarme como estudiante de la Maestría en Agroecosistemas Tropicales y a los doctores que me impartieron clases durante mi estancia en el Campus Veracruz, ya que contribuyeron en mi formación académica de manera favorable.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por otorgarme la beca que me permitió realizar mis estudios.

A mi co-director, Dr. Jericó Jabín Bello Bello por la enseñanza, la disciplina y el apoyo brindado en mi experimento y artículo.

A mi consejera, Dra. Galdy Hernández Zárate por la confianza, enseñanza, amabilidad y el apoyo, mejora y redacción de mi documento de tesis y revisión y sugerencias de mejora del artículo.

A mis asesores, al Dr. Arturo Pérez Vázquez por el apoyo, enseñanza y aportes que realizó a mi documento de tesis para su mejora. Al Dr. Pablo Díaz Rivera y la Dra. María Refugio Castañeda Chávez por su apoyo.

Al Dr. Eucario Mancilla y al Dr. José Luis Spinoso por su apoyo y aportes en mi escritura del artículo.

A la Dra. Libia Trejo Téllez por el apoyo de análisis de nutrimentos foliares en su laboratorio.

A mis compañeros de Campus Córdoba por el apoyo y la convivencia: Rosario, Sandra, Cristina, Bruno, Jeanette y Monserrat.

A mis compañeros de Campus Veracruz con los que compartí cursos, experiencias enriquecedoras y conocimiento: Sheila, Paloma, Gilda y Leydy.

## CONTENIDO

|   |     |
|---|-----|
| RESUMEN .....   | iii |
| ABSTRACT .....  | iv  |
| LISTA DE CUADROS.....   | x   |
| LISTA DE FIGURAS.....   | xi  |
| I. INTRODUCCIÓN .....   | 1   |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA .....  | 4   |
| 2.1 Teoría General de Sistemas (TGS) .....                                | 6   |
| 2.2 Concepto de Agroecosistema y su relación con la TGS .....             | 7   |
| 2.2.1 Conceptualización del agroecosistema estevia .....                  | 8   |
| 2.3 Relación con los Objetivos de Desarrollo Sustentable (ODS) .....      | 9   |
| 2.4 Relación con los PRONACES .....                                       | 14  |
| 2.5 Origen y producción de estevia a nivel mundial y nacional.....        | 16  |
| 2.5.1 Producción mundial .....  | 16  |
| 2.5.2 Producción en México.....   | 17  |
| 2.6 Principales usos de la estevia .....                                  | 19  |
| 2.7 Descripción y clasificación taxonómica de <i>S. rebaudiana</i> .....  | 20  |
| 2.8 Manejo del cultivo de estevia y requerimientos edafoclimáticos .....  | 22  |
| 2.9 Estevia criollo (nativo) y variedad Morita II.....                    | 23  |
| 2.10 Tipos de propagación de estevia.....                                 | 24  |
| 2.11 El calentamiento global y el cambio climático .....                  | 25  |
| 2.11.1 El cambio climático y la producción agrícola.....                  | 25  |
| 2.11.2 Condiciones ambientales y su efecto sobre los hongos micorrízicos. | 27  |
| 2.12 Micorrizas: interacciones simbióticas .....                          | 27  |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 2.12.1 | Clasificación de las micorrizas .....  | 29 |
| 2.12.2 | Micorrizas arbusculares .....  | 31 |
| 2.13   | Importancia de los HMA en las plantas.....   | 31 |
| 2.14   | Uso HMA en plántulas <i>ex vitro</i> .....   | 33 |
| 2.15   | Efecto de los HMA en la biomasa y nutrimentos de las plantas.....                    | 34 |
| 2.16   | Efectos benéficos de la simbiosis micorrízica-arbuscular en plantas de estevia ..... | 35 |
| 2.17   | El suelo y su fertilidad .....   | 36 |
| 2.18   | Macronutrimentos .....   | 37 |
| 2.18.1 | Nitrógeno .....  | 37 |
| 2.18.2 | Fósforo (P).....   | 38 |
| 2.18.3 | Potasio .....  | 39 |
| 2.19   | Biotecnología Vegetal.....   | 40 |
| 2.19.1 | Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) y sus aplicaciones.....                           | 41 |
| 2.19.2 | Micropropagación .....   | 41 |
| III    | OBJETIVOS .....  | 43 |
| 3.1    | Objetivo general.....  | 43 |
| 3.2    | Objetivos específicos.....   | 44 |
| IV     | HIPÓTESIS .....  | 44 |
| 4.1    | Hipótesis general .....  | 44 |
| 4.2    | Hipótesis específicas.....   | 44 |
| V      | MATERIALES Y MÉTODOS.....  | 44 |
| 5.1    | Tratamientos y Diseño experimental .....   | 45 |
| 5.2    | Variables a evaluar .....  | 45 |

|                                       |  |    |
|---------------------------------------|--|----|
| 5.3                                   | Material vegetal y establecimiento <i>in vitro</i> .....           | 45 |
| 5.4                                   | Inoculación de hongos micorrízicos y condiciones del cultivo ..... | 46 |
| 5.5                                   | Caracterización micorrízica y porcentaje de colonización .....     | 47 |
| 5.6                                   | Contenido de clorofila total y carotenoides .....                  | 47 |
| 5.7                                   | Contenido de macro y micronutrientos.....                          | 48 |
| 5.8                                   | Análisis estadístico .....   | 48 |
| VI RESULTADO .....                    |  | 48 |
| 6.1                                   | Porcentaje de supervivencia y colonización micorrízica.....        | 48 |
| 6.2                                   | Efecto micorrízico sobre el desarrollo <i>ex vitro</i> .....       | 50 |
| 6.3                                   | Clorofila total y carotenoides .....                               | 53 |
| 6.4                                   | Contenido de macro y micronutrientos.....                          | 54 |
| VII DISCUSIÓN.....                    |  | 55 |
| 7.1                                   | Efecto de las micorrizas sobre el desarrollo <i>ex vitro</i> ..... | 55 |
| 7.2                                   | Contenido de clorofila total y carotenoides .....                  | 57 |
| 7.3                                   | Caracterización micorrízica .....                                  | 58 |
| 7.4                                   | Contenido de macro y micronutrientos.....                          | 59 |
| 7.5                                   | Discusión general.....   | 62 |
| VIII CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS ..... |  | 62 |
| IX CONCLUSIONES.....                  |  | 63 |
| X LITERATURA CITADA .....             |  | 64 |

## LISTA DE CUADROS

|   |    |
|---|----|
| <b>Cuadro 1.</b> Estadísticas de la producción de estevia en México .....   | 19 |
| <b>Cuadro 2.</b> Clasificación taxonómica de <i>Stevia rebaudiana</i> .....   | 21 |
| <b>Cuadro 3.</b> Condiciones edafoclimáticas para estevia.....  | 24 |
| <b>Cuadro 4.</b> Efectos de los HMA en cultivos agroalimentarios.....   | 33 |
| <b>Cuadro 5.</b> Contenido bioquímico de la hoja de <i>S. rebaudiana</i> en 100 g de hoja seca .....  | 35 |
| <b>Cuadro 6.</b> Contenido de minerales en hojas secas de <i>S. rebaudiana</i> (mg/ 100 g de hoja seca). .....  | 35 |
| <b>Cuadro 7.</b> Efecto del hongo micorrízico arbuscular ( <i>Glomus intraradices</i> ) sobre variables de desarrollo en plántulas de estevia ( <i>S. rebaudiana</i> Bertoni) durante la etapa de aclimatización.....   | 51 |
| <b>Cuadro 8.</b> Efecto del hongo micorrízico arbuscular ( <i>Glomus intraradices</i> ) sobre el contenido de macronutrientes y micronutrientes de plántulas de estevia ( <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) <i>ex vitro</i> durante la etapa de aclimatización a los 60 días de cultivo ..... | 55 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Esquema del agroecosistema con estevia ( <i>Stevia rebaudiana</i> ).....   | 9  |
| <b>Figura 2.</b> Los 10 Pronaces del CONACyT.....   | 15 |
| <b>Figura 3.</b> Producción de estevia en México.....   | 18 |
| <b>Figura 4.</b> Producción de estevia en Nayarit, Sonora y Quintana Roo en el año 2020<br>.....  | 18 |
| <b>Figura 5.</b> Diagrama comparativo de los tipos de micorrizas (beneficios para la planta)<br>y otras interacciones planta-hongo (daños para la planta).....  | 28 |
| <b>Figura 6.</b> Esquema de los tipos de micorrizas.....  | 29 |
| <b>Figura 7.</b> Esquema general de la micropropagación y sus fases de cultivo .....  | 42 |
| <b>Figura 8.</b> Efecto del hongo micorrízico arbuscular ( <i>Glomus intraradices</i> ) sobre a)<br>colonización y b) supervivencia evaluados a los 60 días de cultivo <i>ex vitro</i> de estevia<br>( <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) .....                      | 49 |
| <b>Figura 9.</b> Colonización de <i>Glomus intraradices</i> en raíces de plántulas de estevia<br>( <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) <i>ex vitro</i> a los 60 días después de la inoculación con<br>esporas .....   | 50 |
| <b>Figura 10.</b> Efecto del hongo micorrízicos arbuscular ( <i>Glomus intraradices</i> ) sobre<br>variables de desarrollo en plántulas de estevia ( <i>S. rebaudiana</i> Bertoni) durante la etapa<br>de aclimatización .....                                      | 52 |
| <b>Figura 11.</b> Efecto de hongo micorrízico arbuscular ( <i>Glomus intraradices</i> ) sobre el<br>desarrollo <i>ex vitro</i> de plántulas de estevia ( <i>S. rebaudiana</i> Bertoni) durante la etapa de<br>aclimatización. ....                                  | 53 |
| <b>Figura 12.</b> Efecto del hongo micorrízico arbuscular ( <i>Glomus intraradices</i> ) sobre el<br>contenido de a) clorofila total y b) $\beta$ -caroteno de plántulas de estevia ( <i>Stevia rebaudiana</i><br>Bertoni) durante la etapa de aclimatización ..... | 54 |

## I. INTRODUCCIÓN

El cambio climático es uno de los mayores desafíos que enfrenta el mundo en la actualidad, genera incertidumbre en la actividad agrícola, por los cambios en las variables agroclimáticas como la temperatura y la precipitación, que son importantes para el desarrollo de cualquier cultivo (Casanova-Pérez *et al.*, 2018).

De igual manera, los modelos de producción industrial han contribuido al cambio climático, al promover el uso de fertilizantes químicos y plaguicidas, responsables de la acidificación del suelo y la generación de Gases de Efecto Invernadero (GEI); particularmente el óxido nitroso ( $N_2O$ ) a través de la desnitrificación de los ecosistemas, tiene el potencial de incrementar las emisiones de GEI en una magnitud 300 veces mayor que el  $CO_2$  (De Oliveira *et al.*, 2013; Dorich *et al.*, 2020).

De acuerdo al Panel Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC, por sus siglas en inglés) el sector agrícola es, a nivel mundial, la principal fuente de GEI (20% de las emisiones globales), responsable del 78.6% de las emisiones de  $N_2O$  y del 39.1% de las emisiones de metano ( $CH_4$ ) (IPCC, 2018; Dorich *et al.*, 2020). El uso desmedido y la alta intensidad con que se aplican los agroquímicos en los agroecosistemas, influye no solo en la seguridad del entorno ecológico, sino en la producción agrícola, seguridad alimentaria, salud humana y el desarrollo agrícola sostenible (Xing y Zhu, 2000; Lai *et al.*, 2009; Fischer *et al.*, 2010).

En la medida que los sistemas de producción agropecuaria agravan el problema del cambio climático, existe la necesidad de nuevas estrategias de manejo que involucren prácticas de agricultura regenerativa y sustentable que respalden el futuro de este sector y, en consecuencia, mitiguen la contaminación agrícola, aumenten la rentabilidad de los cultivos, reduzcan las emisiones de GEI y garanticen la seguridad alimentaria y ambiental (Shuqin y Fang, 2018). En este sentido, durante la última década, los biofertilizantes han sido propuestos como una solución sostenible para la reducción del uso de fertilizantes químicos.

En años recientes, la utilización de Hongos Micorrízicos Arbusculares (HMA) ha demostrado ser una opción viable, de bajo costo y ambientalmente compatible para mejorar la producción mundial de alimentos (Cavagnaro *et al.*, 2015; Dhawal *et al.*, 2016). Se ha demostrado que la inoculación de plantas con HMA, mejora la absorción de fósforo (P), ya que aumenta su disponibilidad en suelos ácidos tropicales (Pérez-Velasco *et al.*, 2019). El P es un elemento con una alta capacidad de fijación, lo que ocasiona su baja movilidad en el suelo, motivo por el cual, las plantas no son capaces de aprovecharlo (Sánchez y Uehara, 1980; Cordell y White, 2011); su disponibilidad en el suelo es limitada a razón de ~0.05 - 0.1% de contenido de P total del suelo (Sharma *et al.*, 2013).

De esta forma, los HMA reducen la dependencia de los cultivos a los fertilizantes, facilitando la absorción de este macronutriente, mismo que desempeña un papel crítico durante la producción primaria en cultivos agrícolas, principalmente en suelos tropicales. Así, el uso de estos microorganismos es de interés en los agroecosistemas donde las prácticas convencionales son cada vez más nocivas para el ambiente (Felföldi *et al.*, 2022). La simbiosis planta-HMA puede tener un gran impacto en el rendimiento de las plantas y el funcionamiento del ecosistema, beneficios que han sido reconocidos por su valor potencial en los agroecosistemas sostenibles (Choi *et al.*, 2018). Por otro lado, a diferencia de otros cultivos edulcorantes tradicionales, como la caña de azúcar, el cultivo de estevia reduce los insumos agronómicos, incluidos los nutrientes, el agua y la energía (Clemente *et al.*, 2021).

Los HMA son biótrosos obligados que establecen asociaciones simbióticas con algunas plantas y tienen efectos fisiológicos sobre el desarrollo vegetal (Luo *et al.*, 2022). En plantas, estos microorganismos fúngicos inciden en su crecimiento, diferenciación, fotosíntesis, absorción de agua y absorción de nutrientes, contribuyendo a una mayor capacidad de supervivencia (Pinos *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2021). Además, los HMA desarrollan mecanismos de tolerancia en las plantas que les permite persistir o prosperar bajo estrés ambiental (Branco *et al.*, 2022). Los efectos positivos de los HMA han sido demostrados en cultivos agroalimentarios como: caña gigante (*Arundo donax* L.) (Tauler y Baraza, 2015), crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*) (Wang *et al.*, 2018), maíz (*Zea*

*mays* L.) (Fasusi *et al.*, 2021), chile poblano (*Capsicum annum*) (Almaraz-Suárez *et al.*, 2021), lechuga (*Lactuca sativa* L.) (Rasouli *et al.*, 2022) y tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Molinari *et al.*, 2022).

La estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) es una planta de tipo semi-arbustiva perenne nativa de América del Sur (Paraguay) que pertenece a la familia Asteraceae (Janah *et al.*, 2021). Su cultivo se realiza en regiones tropicales y subtropicales de diversos países del mundo (Castañeda-Sucedo *et al.*, 2020; Büyük *et al.*, 2022). Esta planta, es de importancia económica debido a sus usos como aditivo alimentario, cosmético, farmacéutico y su alto contenido de glucósidos de esteviol. Este glucósido es capaz de reducir la ingesta calórica de alimentos, conservando su dulzura (Tavarini *et al.*, 2018). Sin embargo, el cultivo de estevia tiene grandes retos en materia de producción y competitividad debido a los métodos de propagación convencional. Su propagación a partir de semillas, muestra una baja tasa de germinación (Castañeda-Sucedo *et al.*, 2020), mientras que la propagación vegetativa por mini-esquejes, restringe la cantidad de individuos a obtener y existen riesgos de contaminación por plagas y enfermedades (Vázquez-Baxcajay *et al.*, 2014; Ghose *et al.*, 2022).

La biotecnología vegetal y microbiana ofrecen alternativas para el mejoramiento de los cultivos agrícolas. Por un lado, mediante micropropagación y utilizando técnicas de cultivo de tejidos vegetales, es posible obtener plántulas de manera constante, en espacios reducidos, y con alta calidad genética y fitosanitaria (Vázquez-Baxcajay *et al.*, 2014; Bayraktar, 2019); y, por otra parte, la microbiología utiliza microorganismos con potencial como biofertilizantes, que permiten a la planta presentar un mejor desempeño (Elnahal *et al.*, 2022). La combinación de estas biotecnologías puede ser empleada para el proceso de aclimatización de plántulas, fase final de la micropropagación. La aclimatización consiste en transferir plántulas o brotes *in vitro* a condiciones *ex vitro*, con cambios en la humedad relativa, temperatura e irradiancia con el objetivo de mantener altos porcentajes de supervivencia *ex vitro* (Gómez-Kosky *et al.*, 2021; Jagiello-Kubiec *et al.*, 2021). Algunos estudios han demostrado que los HMA ayudan a las plántulas a superar el estrés del trasplante durante la aclimatización y mejoran el crecimiento de las

plántulas micropropagadas (Pandino *et al.*, 2022). La utilización de HMA en fase de aclimatización ha sido estudiado en especies como lirio (*Gloriosa superba* L.) (Yadav *et al.*, 2012), manzano de hojas de ciruelo (*Malus prunifolia*) (Dalla *et al.*, 2021), cardo (*Cynara cardunculus*) (Pandino *et al.*, 2022) y caña de azúcar (*Saccharum* spp.) (Moreno-Hernández *et al.*, 2022). Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de diferentes dosis del hongo micorrízico arbuscular (*Glomus intraradices*) sobre el desarrollo *ex vitro* de plántulas de *Stevia rebaudiana* Bertoni durante la aclimatización.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

El crecimiento exponencial de la población humana, la urbanización y la industrialización han tenido un impacto negativo en el ambiente. Desde la revolución verde, la agricultura intensiva introdujo el uso de diferentes fertilizantes químicos y plaguicidas que han aumentado la emisión de GEI (Kumari *et al.*, 2022). Dentro de este contexto, uno de los mayores retos de la industria agroalimentaria es proporcionar alimentos de calidad nutricional y en forma sustentable, de modo que sean suficientes para abastecer la demanda creciente. Una alternativa sustentable en el ámbito agrícola es el uso de HMA como biofertilizantes, los cuales pueden brindar beneficios durante el proceso de aclimatización de plántulas provenientes del cultivo *in vitro*, así como la mejora en la productividad del cultivo. La importancia del uso de plántulas obtenidas *in vitro*, cobra cada vez más interés, debido a las condiciones de cambio climático que se presentan en la actualidad (Nahuelcura *et al.*, 2022). En este sentido, los HMA mejoran la fertilidad del suelo, aumentan el rendimiento de los cultivos y permiten el equilibrio de los ciclos de nutrimentos (Tahat *et al.*, 2020), además de contribuir a reducir las emisiones de GEI (Levis *et al.*, 2011).

Por otro lado, existe una demanda cada vez mayor de plantas de estevia por parte de la industria agroalimentaria. Se considera que es un cultivo rentable, novedoso, y de gran potencial para México, debido a su uso como edulcorante natural no calórico, que puede ser consumido sin riesgo para la salud por personas diabéticas (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2015). No obstante, los métodos convencionales de propagación de estevia, son poco eficientes

para cubrir la demanda del mercado. Por lo general, *S. rebaudiana* se propaga por semillas y por esquejes, en ambos casos con una tasa de propagación baja. Además, se tiene una alta demanda de mano de obra, número limitado de individuos por planta, y la presencia potencial de patógenos en los tejidos de las plantas (Al-Taweel *et al.*, 2021). En años recientes, la micropropagación vegetal (cultivos de tejidos) ofrece la posibilidad de producir de manera constante un gran número de plántulas genotípicamente uniformes, de alta calidad genética y fitosanitaria en espacios reducidos (Vázquez-Baxcajay *et al.*, 2014; Castañeda-Sucedo *et al.*, 2020; Ghose *et al.*, 2022).

Si bien, la propagación de *S. rebaudiana* mediante cultivo *in vitro* presenta una ventana de oportunidad, una de las limitantes observadas durante el proceso de aclimatización (fase final de la micropropagación), se relaciona con el hecho de que las plántulas *in vitro* al ser trasladadas a invernaderos, son vulnerables a condiciones ambientales (temperatura, irradiancia, humedad relativa) que pueden afectar la tasa de supervivencia *ex vitro*. De tal manera que la fase de aclimatización sigue representando un reto, ya que usualmente se registran altas mortalidades en plántulas que presentan sistemas radiculares poco desarrollados, o bien, son víctimas de la presencia de fitopatógenos.

La aclimatización es uno de los pasos más importantes en la adaptación estructural y fisiológica durante la preparación de las plántulas. Esta fase es el comienzo de la existencia autótrofa de la planta, con el inicio de los procesos fisiológicos necesarios para la supervivencia. Las plántulas micropropagadas están libres de enfermedades, pero también carecen de HMA. La inoculación de plántulas micropropagadas con HMA durante la etapa de aclimatización puede contribuir a altas tasas de colonización a través de efectos positivos de simbiosis micorrízica sobre la actividad de la raíz. Los HMA al colonizar las raíces, aumentan el vigor de las plantas al incrementar la absorción del agua y nutrientes minerales, especialmente P, y el establecimiento de plántulas en condiciones adversas del suelo y climáticas. Además, los HMA producen hifas extrarradicales densas y largas para proteger a las plantas hospedantes de los patógenos de las raíces y mitigar los efectos de las variaciones extremas de temperatura, pH y estrés hídrico (Verdin *et al.*, 2006). El uso de especies de HMA promueve un

aumento de la materia fresca y seca, lo cual se refleja en el rápido crecimiento y altura de la planta (Yano-Melo *et al.*, 1999; Yadav *et al.*, 2013).

## **2.1 Teoría General de Sistemas (TGS)**

La Teoría General de Sistemas (TGS) fue expuesta por el biólogo Ludwig Von Bertalanffy en 1950. Esta teoría se representa como una forma sistemática y científica de acercarse y representar la realidad y, al mismo tiempo, como una orientación hacia formas de trabajo transdisciplinario para resolver problemas complejos (Vilaboa, 2013; Casanova-Pérez, 2018; Martínez-Dávila 2018). Su premisa básica es que exista una correlación de elementos relacionados entre sí, que conforman un todo, y bajo esa concepción uno de sus principios es que *“el todo es más que la suma de sus partes”* y, desde su perspectiva integradora, es aplicable a cualquier sistema (Vanegas *et al.*, 2007). La TGS indica que cualquier actividad, como la agricultura, no puede separar sus elementos, y que la síntesis, es el resultado de una totalidad mayor (la región, cuenca o estado). Lo anterior demuestra que los sistemas permiten conocer agroecosistemas en sus aspectos biológicos, físicos, sociales, económicos y políticos, en donde los problemas o situaciones serán transformados por la aplicación de la investigación científica y tecnología a partir de una visión compleja y holística (García, 2007).

El objetivo principal de la TGS, es el unificar métodos y conceptos de diversos rubros de la ciencia y que estos funcionen como principios de validez general (Vanegas *et al.*, 2007). La TGS busca formular principios válidos para sistemas en general (antes llamados objetos), sea cual fuere la naturaleza de sus componentes y las fuerzas interactivas o de organización presentes en ellas (Bohórquez, 1993). Para Johansen (1993), un sistema es un grupo de partes y objetos que interactúan y que forman un todo o que se encuentran bajo la influencia de fuerzas con alguna relación definida. De acuerdo a Hart (1985), los sistemas tienen como elementos: la materia prima, la interacción de los componentes, entradas, salidas y límites. Sin embargo, Herrscher (2003) argumenta que la función de un sistema es determinada por criterios de productividad, eficiencia y variabilidad, y gracias a la percepción del ser humano decide

ver a los sistemas como un conjunto que posee propiedades. Además, argumenta que los objetos no son sistemas, sino hay objetos que tratamos como sistemas.

## **2.2 Concepto de Agroecosistema y su relación con la TGS**

El Agroecosistema (AES) es una representación o modelo de un corte de la realidad agrícola, manejado por un controlador cibernético (agricultor o campesino) para producir y satisfacer de manera óptima las necesidades y demandas sociales del mercado. Se conceptualiza como una totalidad organizada en la que los elementos no son separables y, por tanto, no deben ser estudiados de forma independiente (Martínez-Dávila, 2018).

El AES constituye el eslabón de inicio y determinante en toda cadena de alimentación y consumo agroalimentario. Los sistemas de producción primaria se ven abastecidos por el AES para continuar con procesos de distribución que permiten el consumo a diferentes niveles (local, regional, nacional o internacional), permitiendo la supervivencia del ser humano. Se constituye así la responsabilidad social del AES (sistema superior) que es alimentar a la sociedad (Martínez-Dávila y Casanova-Pérez, 2018). En el AES se activa el primer nivel de oferta de abastecimiento de la producción agrícola (en fresco o con valor agregado) y los procesos de distribución comienzan a satisfacer la demanda estimada, del mercado regional, nacional o internacional y por tanto del consumo. En este proceso aparente y simple ocurre el fenómeno más importante de la reproducción social: el consumo-para vivir- depende ineludiblemente del AES y éste también depende del consumo (familiar y social) para sobrevivir. Esto constituye a lo que el sistema superior del AES puede estar comprometido por su responsabilidad social: alimentar a la sociedad (Martínez-Dávila y Casanova-Pérez, 2018).

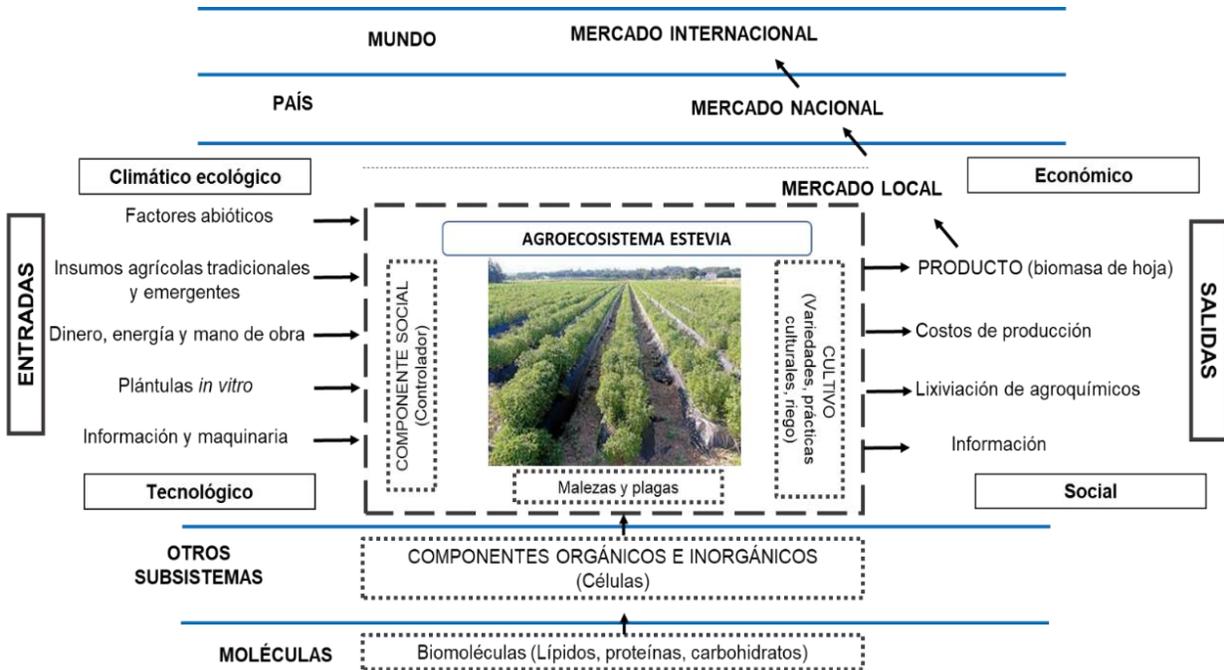
El AES tiene sus bases en el enfoque de sistemas y la Teoría General de Sistemas propuesta por Bertalanffy (1976). El AES aborda el problema de la complejidad a través de una forma de pensamiento basada en la totalidad y sus propiedades. En el AES no hay unidades aisladas; todas sus partes actúan con una misma orientación y finalidad, ya que es necesario el funcionamiento correcto de los elementos que lo integran para el eficiente desempeño del todo en su conjunto, facilitando la unificación de varios campos

del conocimiento de las ciencias físicas, ecológicas, biológicas y sociales (Vilaboa, 2013; Platas-Rosado *et al.*, 2017).

### **2.2.1 Conceptualización del agroecosistema estevia**

El agroecosistema se considera como un sistema abierto que tiene relación permanente con su entorno, mediante el intercambio de energía, materia, información e interacción constante entre el sistema y el ambiente. Presenta estructura, componentes, límites, función e interacción entre componentes, entradas, salidas y una retroalimentación, funcionando como un proceso sinérgico para lograr un objetivo definido (Vilaboa, 2013). Los AES son sistemas complejos con componentes biológicos que han sido distribuidos en el tiempo y el espacio interactuando con componentes socioculturales (racionalidades, conocimientos y cultura de los agricultores) (Sarandón, 2002). En el sistema se establecen relaciones o interacciones entre los componentes que deben entenderse y ser consideradas al analizar el sistema en su conjunto. El ser humano es quien limita a los sistemas de acuerdo a sus fines, establece fines arbitrariamente, ya que el agroecosistema se modifica en relación con el objeto de estudio, materiales y recursos financieros disponibles, delimita su área de estudio con la finalidad de hacer eficiente el uso de sus recursos en función del tiempo, espacio y dinero disponible para investigar. El objetivo del agroecosistema coincide con los productos de salida: alimentos, materias primas y servicios (Vilaboa, 2013). En la Figura 1 se conceptualiza el agroecosistema estevia. Este agroecosistema se ve influenciado por aspectos climáticos, ecológicos, tecnológicos, económicos y sociales. En las entradas hay factores climáticos-ecológicos (clima, altitud, precipitación, luz, temperatura, suelo, viento), insumos agrícolas (fertilizantes, herbicidas, plaguicidas), abonos orgánicos, biofertilizantes y subproductos, mano de obra, maquinaria y equipo, energía, dinero e información; mientras que en las salidas encontramos rendimiento de la calidad de la hoja, lixiviación de agroquímicos e información. En el aspecto económico, por ejemplo, en China, el cultivo se distribuye en el mercado nacional e internacional como un potencial edulcorante. En México, la estevia puede ser un cultivo innovador y rentable, presentando condiciones promisoras del mercado interno y del externo (Lozano-

Contreras y Ramírez-Jaramillo, 2022). El consumo puede ser como hierba o como productos industrializados. Sin embargo, existe un gran desconocimiento acerca del buen manejo del agroecosistema estevia.



**Figura 1.** Esquema del agroecosistema con estevia (*Stevia rebaudiana*). Fuente: Modificado de Martínez-Dávila, 2020.

### 2.3 Relación con los Objetivos de Desarrollo Sustentable (ODS)

En el año 2015, la ONU aprobó 17 Objetivos y 169 metas como parte de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible, con el fin de proponer acciones para el fin de la pobreza, protección del ambiente y mejorar la calidad de vida del ser humano, así como las perspectivas de las personas a nivel mundial. La presente investigación se relaciona directa o indirectamente con los objetivos 2, 3, 12 y 13, mismos que implican acciones para la seguridad alimentaria, la agricultura sostenible y la producción y el consumo responsable, así como las acciones climáticas. A continuación, se describe la relación del agroecosistema estevia con algunos ODS en particular, y se describe su incidencia en la centralidad del cuidado del ambiente y la salud integral hacia otro paradigma de sostenibilidad de la vida.

**En el Objetivo 2. Hambre cero.** A pesar de que la actividad agrícola representa la mayor fuente de empleo a nivel mundial con un aporte económico primordial (40%), y constituye el sector de mayor ingresos/empleos en zonas rurales pobres del mundo, el hambre y la seguridad alimentaria, continúan siendo los principales retos a solventar. Por lo cual, este objetivo busca erradicar el hambre y garantizar la seguridad alimentaria mediante el acceso universal a suficientes alimentos inocuos y nutritivos, a través de la promoción de una agricultura sostenible.

Para mitigar estas amenazas, principalmente en poblaciones vulnerables, se deben adoptar medidas y acciones que permitan responder a la demanda creciente de alimentos, como p. ej. optimizar la producción agrícola sostenible mediante cambios en los modelos de producción y de consumo. En este sentido, el nuevo paradigma de la Bioeconomía Circular busca fortalecer las cadenas de valor y de suministros de alimentos, siendo menos dependientes de la importación de materias primas y uso de fertilizantes químicos; y por el contrario basarse en prácticas sustentables y modelos productivos que impliquen bioinsumos agrícolas como los biofertilizantes (HMA). El reto es satisfacer las demandas de los consumidores, mediante biotecnologías que permitan proteger la salud del suelo e incrementar su productividad, promoviendo la reutilización y reciclado de los nutrientes del suelo. De tal forma que es prioritario asegurar la sostenibilidad de los agroecosistemas, mediante prácticas agrícolas resilientes que incrementen la productividad, contribuyan al mantenimiento de los ecosistemas y la biodiversidad, fortalezcan la capacidad de adaptación al cambio climático, a fenómenos meteorológicos extremos, sequías, y mejoren progresivamente la calidad del suelo (ONU, 2020).

En el agroecosistema, el subsistema suelo realiza diversas funciones, mismas que a su vez, son desarrolladas por la diversidad de organismos que habitan en él y que interactúan con el medio físico y químico del suelo. Así, la salud del suelo del agroecosistema sustenta la productividad de plantas, animales, y permite la vivienda de los humanos (USDA-NTCS, 2012; Levard, Mathieu y Masse, 2019). Por su parte, la fertilidad del suelo se refiere a la capacidad del suelo para proporcionar los nutrientes

requeridos para el crecimiento de las plantas de interés, como nitrógeno (N), P, potasio (K) y micronutrientes (Osman, 2013). Al respecto, la fertilidad del suelo tropical puede ser limitada por factores como el bajo contenido de nutrientes, estrés por humedad, erosión, alta fijación de P, alta acidez por toxicidad de aluminio y baja biodiversidad del suelo. Esta fragilidad del suelo limita la producción de alimentos en los sistemas de cultivo anual.

En este sentido, las funciones que desempeña el suelo en un agroecosistema están relacionadas con la conservación de la estructura física del suelo, la descomposición de la materia orgánica (MO), el reciclaje de nutrientes y el control de patógenos y enfermedades, mediante procesos biológicos complejos basado en la biodiversidad del suelo, que permiten disminuir la susceptibilidad de las plantas hacia plagas, patógenos y enfermedades. Un suelo sano y de calidad se considera fértil, con buena estructura y biológicamente activo (Havlicek, 2012).

Con relación a los HMA, juegan un papel importante en los agroecosistemas en la mejora de calidad física (a través de las hifas externas), química (a través de una mayor absorción de nutrientes) y biológica a través de la red alimentaria del suelo (Cardoso y Kuyper, 2006). Este tipo de microorganismos benéficos mantiene y mejora la estructura del suelo. Además, eficientizan el uso de macro y micronutrientes relativamente inmóviles, incidiendo en su cantidad, a través de la solubilización de éstos y permitiendo su biodisponibilidad para las plantas del agroecosistema, evitando así las limitaciones químicas que pudieran existir en el suelo. Los HMA participan en el reciclaje de nutrientes y flujos de energía dentro de la cadena trófica y la liberación de nutrientes. De esta forma, el reciclaje de nutrientes, define la conservación y disponibilidad de éstos, en la producción de cultivos como parte del agroecosistema (Levard, Mathieu y Masse, 2019). Otra ventaja del uso de los HMA, es la función que desempeñan en las plantas, con respecto a la disminución de la toxicidad de elementos, como el aluminio y manganeso, y la protección contra los patógenos.

**Objetivo 3. Salud y Bienestar.** Este objetivo se refiere a la promoción de la salud y del bienestar del ser humano. Se enfoca en la buena salud, y los estilos de vida saludables, medidas preventivas y una atención médica moderna y eficiente para todos. Una de sus metas para el 2030, es reducir en un tercio, las mortalidades por enfermedades no transmisibles, como la diabetes. Actualmente, más de 2 000 millones de personas en todo el mundo presentan sobrepeso o son obesas (ONU, 2020). Por lo que el obtener materias primas, que puedan ser utilizadas para la elaboración de edulcorantes herbales sin contenido calórico, a través del cultivo de estevia, podría coadyuvar a la problemática de obesidad y disminuir la incidencia de enfermedades crónico degenerativas como la diabetes. Hoy en día, la estevia se comercializa mundialmente como sustituto de la sacarosa o bien a través de diversos productos alimenticios endulzados con estevia que son consumidos por diabéticos sin incrementar el índice glicémico. De esta forma, la estevia es un cultivo, valorado por ser libre de calorías, y que ayuda a reducir la ingesta de energía y el azúcar añadido en los alimentos. También, se le considera la mejor fuente alternativa de azúcar, especialmente para pacientes diabéticos y obesos. Sus beneficios incluyen acciones antihiper glucémicas pero también como antihipertensivas, antiinflamatorias, antitumorales, antidiarreicas, antibacterianas, diuréticas, antisépticas, antiinflamatorias. El uso de estevia previene la hipertensión, actúa como un agente bactericida y estimula la producción y utilización de insulina (Jawad *et al.*, 2022).

**Objetivo 12. Producción y consumo responsables.** A nivel mundial los sistemas agrícolas se han caracterizado por el manejo intensivo de la tierra, perturbando el subsistema suelo de los agroecosistemas y causando el deterioro de la calidad y fertilidad del mismo (Jaurixje *et al.*, 2013), disminuyendo así su capacidad para suministrar alimentos. Además, las diversas actividades agroindustriales y alimentarias, han contribuido con el 22% del total de las emisiones de GEI, por lo que una de las metas de este objetivo es lograr la gestión sostenible y el uso eficiente de los recursos naturales, a través de la gestión racional de productos químicos y reduciendo significativamente su liberación a la atmósfera, agua y suelo para minimizar sus efectos adversos sobre la salud humana y el ambiente.

El consumo y la producción sostenibles tienen como premisa la desvinculación del crecimiento económico de la degradación ambiental, incrementando la eficiencia de los recursos y promoviendo estilos de vida sostenibles, y contribuyendo a la mitigación de la pobreza y la transición hacia economías verdes, características de baja emisión de C. El uso de biofertilizantes como los HMA es de importancia en la agricultura sostenible y para la conservación y regeneración de los suelos, representando así una alternativa dentro de la producción responsable de los agroecosistemas.

**Objetivo 13. Acción por el clima.** El cambio climático está afectando a nivel global a las naciones, alterando las economías nacionales y afectando a las poblaciones humanas y biodiversidad en general. Los sistemas meteorológicos muestran alteración, al igual que el nivel del mar, y surgen eventos climáticos cada vez más extremos. Por lo que se requiere de medidas para abordar la emergencia climática, con el fin de salvaguardar vidas y los medios de subsistencia. En 2018, los desastres naturales afectaron a más de 39 millones de personas, a través incendios forestales masivos, sequías, huracanes e inundaciones. Este objetivo se puede cumplir fortaleciendo la resiliencia y la capacidad de adaptación a los riesgos climáticos y los desastres naturales a nivel mundial (ONU, 2020).

Por otra parte, el cambio climático amenaza la capacidad de alcanzar la seguridad alimentaria mundial, eliminar la pobreza y lograr el desarrollo sostenible. De acuerdo con Jerbi (2022), el estrés abiótico, se han vuelto más común debido al cambio climático, por ejemplo la sequía se considera uno de los principales factores que disminuyen la productividad de los cultivos, y amenazan la seguridad alimentaria. Ésta perjudica diversos procesos fisiológicos de los tejidos vegetales y causa cambios en los metabolitos primarios y secundarios.

En este sentido, el uso de HMA representa un papel benéfico en la mitigación de los efectos adversos de la sequía, coadyuvando a que los sistemas sean más sostenibles. La interacción simbiótica entre plantas y HMA, presenta una estrategia sostenible para aumentar el rendimiento y la productividad de las plantas, incluso bajo estrés debido al

cambio climático (Sangiorgio *et al.*, 2020). La promoción de estas comunidades microbiológicas del suelo ofrece nuevas oportunidades para crear sistemas agrícolas sostenibles. A través de la red fúngica, los HMA proporcionan nutrientes adicionales del suelo natural con el potencial de reducir las entradas de fertilizantes químicos (Fehr, 2021). Además, como se ha comentado previamente, los HMA incrementan la disponibilidad de P en el suelo para las plantas huésped, debido a que el suelo puede presentar una cantidad abundante de P pero su biodisponibilidad es muy baja para los cultivos. El uso de los fertilizantes a base de P es una preocupación ambiental relacionada con la eutrofización de los cuerpos de agua dulce.

Por otro parte, se sabe que el aumento de la temperatura media del aire se atribuye a la mayor concentración de GEI en la atmósfera, en particular, del CO<sub>2</sub>, que representa el 76% del efecto invernadero global. Sin embargo, los microorganismos del suelo, como los HMA, mejoran la tasa de captura del C del suelo, asimilándolo a través de sus hifas (Malyan *et al.*, 2019).

El óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), es otro gas de importancia por su efecto invernadero que acrecienta el calentamiento global. En este sentido, los HMA forman asociaciones mutualistas con la mayoría de las plantas terrestres, lo que puede ayudar a la reducción de emisiones de N (Cui *et al.*, 2021).

De esta forma, los HMA, constituyen una herramienta que contribuye a la regulación del clima, la protección de los servicios ecosistémicos del suelo y la biodiversidad de los agroecosistemas.

## **2.4 Relación con los PRONACES**

Los Programas Nacionales Estratégicos (PRONACES) son la iniciativa prioritaria del CONACyT. Se conciben como un medio para organizar los esfuerzos de investigación en torno a problemas nacionales concretos que, por su importancia estratégica, requieren de atención y solución general (PRONACES-CONACyT, 2022). El objetivo de los PRONACES es investigar las causas de esos problemas y buscar soluciones. A continuación se presentan los 10 PRONACES (Figura 2).



**Figura 2.** Los 10 Pronaces del CONACyT. Fuente: CONACyT, 2022.

En particular, el Pronaces- Salud es un programa de apoyo a la investigación en la salud, que otorga financiamiento a proyectos con enfoques transdisciplinarios e integrales, dirigidos a aportar conocimiento, evidencias y acciones para la solución de los principales retos y la promoción de la salud en México. El objetivo de este programa es generar conocimiento y acciones estratégicas que contribuyan a la prevención, diagnóstico, manejo y control de los principales problemas de salud de la población (Salud-CONACyT, 2022).

El consumo de azúcar y edulcorantes se ha asociado con la obesidad y diabetes, que son problemas de salud pública en México. En el año de 1994 se incrementó en el país las importaciones de edulcorantes para la elaboración de alimentos y bebidas (Unar-Munguía *et al.*, 2019). Reemplazar la sacarosa por edulcorantes no calóricos y naturales puede contribuir a disminuir la obesidad y el desarrollo de diabetes. La estevia es un edulcorante herbal, utilizada en muchos países como sustituto del azúcar porque es de 200 a 300 veces más dulce que la sacarosa, no se ha mostrado un impacto negativo en la salud humana y no tiene valor calórico (Yildiz y Karhan, 2021).

El Programa Nacional Estratégico en Sistemas Socioecológicos y Sustentabilidad (Pronaces-SSyS) tiene como objetivo impulsar la co-producción de conocimiento a nivel técnico-científico, institucional y comunicativo en donde se lleven a cabo acciones de conservación, restauración, uso y aprovechamiento de los ecosistemas, de los recursos

naturales y de la biodiversidad mediante una perspectiva de sustentabilidad y de justicia social. Por lo que se adopta un enfoque socioecológico que posibilita explorar y entender sistemas complejos, dinámicos y evolutivos, integrados por una gama amplia de fenómenos biofísicos, socioeconómicos, políticos y culturales que se interrelacionan a distintas escalas espaciales y temporales (CONACyt- Sistemas Socioecológicos y Sustentabilidad, 2022)

Mediante proyectos que aseguren la sostenibilidad de los agroecosistemas a través de prácticas agrícolas resilientes que incrementen la productividad, mantenga la biodiversidad y la capacidad de adaptarse al cambio climático, sequías, y el suelo mantenga su fertilidad (ONU, 2020). El agroecosistema estevia utilizando biofertilizantes puede caracterizarse como un sistema socioecológico y sustentable, por la eficiente asimilación de nutrientes a través de las hifas de los HMA hacia la planta, reduciendo los fertilizantes aplicados y manteniendo la fertilidad del suelo. Además, este cultivo se comercializa como sustituto de la sacarosa, consumido por diabéticos sin incrementar el índice glicémico ((Jawad *et al.*, 2022).

## **2.5 Origen y producción de estevia a nivel mundial y nacional**

*Stevia rebaudiana* fue descrita por primera vez en 1905 por Moisés Santiago Bertoni, un botánico-naturalista de origen italiano-suizo que emigró a Paraguay en 1882 (Soejarto, 2001). Es una planta herbácea perteneciente a la familia *Asteraceae*, originaria de la región noreste de América del Sur, aunque en la actualidad se cultiva en muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo, incluyendo Europa y América del Norte (Khiraoui *et al.*, 2017; Soejarto *et al.*, 2019; Ahmad *et al.*, 2020).

### **2.5.1 Producción mundial**

A nivel mundial, la estevia es cultivada en una superficie cercana a las 32 000 ha. De éstas, China posee el 75% del área. Otros países dedicados a su cultivo a gran escala son Japón, Taiwán, Tailandia, Corea, Brasil, Malasia y Paraguay. El cultivo y uso de estevia se ha extendido en muchas regiones del mundo, incluyendo Brasil, Paraguay, México, Rusia, Indonesia, Corea, Estados Unidos, Canadá y Argentina.

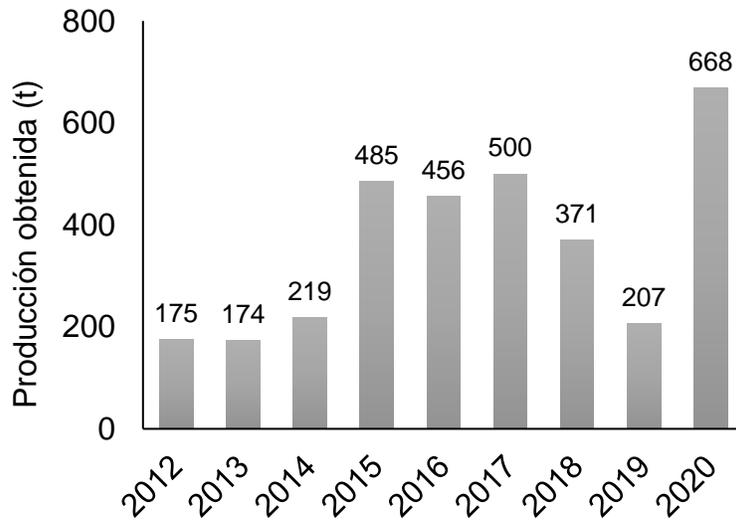
A nivel de producción, las ventas globales de edulcorantes a base de estevia aumentaron de 2013 a 2017 en un 285%. Así, la producción anual pasó de 3 500 t a 10 000 t, respectivamente (Anchal *et al.*, 2021; Termsung *et al.*, 2021; Yildiz y Karhan, 2021). En Japón se estima que el valor de mercado total del edulcorante de estevia es de alrededor de 15 500 a 23 500 millones de dólares (Castañeda- Saucedo *et al.*, 2020).

Tradicionalmente, en algunos países de América del Sur, Europa, Asia, China y Japón, la estevia se ha utilizado como edulcorante de bajo contenido calórico durante décadas. Su forma de consumo varía de acuerdo con el país. Por ejemplo, en la India se utiliza la hoja seca, cruda o el edulcorante procesado; en los estados unidos se utilizan las hojas de estevia en polvo y extractos refinados de hojas y se utiliza como suplemento dietético; mientras que en Brasil, Corea y Japón, se consumen las hojas de estevia y los extractos altamente refinados (Gasmalla *et al.*, 2014; Ahmad *et al.*, 2020).

Desde el 2011, el uso de los glucósidos de esteviol altamente purificado ha sido aprobado como aditivo alimentario (E960) en la Unión Europea (Kunová *et al.*, 2014). Después de América del Norte, Europa es el segundo mercado más grande de sustitutos de azúcar. El mercado europeo está segmentado geográficamente, donde un número creciente de empresas, particularmente en el Reino Unido, Alemania, Francia, España, Rusia e Italia fabrican productos que contienen glucósidos de esteviol (Tavarini *et al.*, 2018).

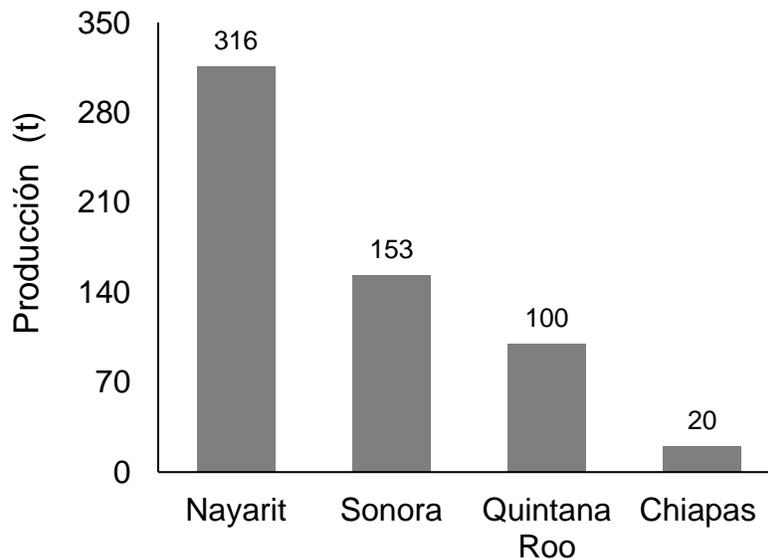
### **2.5.2 Producción en México**

La producción de estevia en México se ha registrado desde el año 2012. En la Figura 3 se muestran los valores de producción de estevia desde 2012. Durante el 2014, la superficie de siembra fue de 57 ha bajo condiciones de riego, siendo Nayarit (24 ha) y Campeche (21 ha) los principales estados productores, junto con Quintana Roo (10 ha) (SIAP, 2016; Ramírez-Jaramillo y Lozano-Contreras, 2017). De 2015 a 2018, se duplicó el volumen de producción de años anteriores; decayendo en 2019, y repuntando en 2020 con el mayor volumen de producción obtenido hasta esa fecha.



**Figura 3.** Producción de estevia en México (SIAP, 2020).

El cultivo de estevia se desarrolla en ocho estados del país, de los cuales, Nayarit tiene una producción de 316 t (47.3%), Sonora 153 t (22.8%), Quintana Roo 100 t (16.5%) y Chiapas 20 t (3%) (Olmos, 2022). Estos tres estados representan el 86.7% de la producción nacional (Figura 4).



**Figura 4.** Producción de estevia en Nayarit, Sonora y Quintana Roo en el año 2020 (Olmos, 2022).

En cuanto a la superficie cosechada para los estados de Sonora, Nayarit y Quintana Roo fue de 29, 25 y 9 ha, respectivamente. Mientras que los rendimientos promedio para Chiapas, Nayarit y Quintana Roo fueron de 13.2, 12.8 y 12.3 t ha<sup>-1</sup>, respectivamente. En cuanto a los valores de producción, en los estados de Sonora, Nayarit y Quintana Roo se generaron 7, 5 y 3 millones de pesos, respectivamente, con un valor total de producción en México de estevia de 17 millones de pesos (Olmos, 2022). En el 2020 la superficie destinada para el cultivo de estevia fue de 81 ha, para una producción total de 668 t y un rendimiento promedio de 8.7 t ha<sup>-1</sup>, alcanzando un precio por tonelada de \$ 1 350 dólares (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Estadísticas de la producción de estevia en México.

| Parámetros             | Valores                |
|------------------------|------------------------|
| Producción             | 668 t                  |
| Superficie sembrada    | 81 ha                  |
| Rendimiento            | 8.3 t ha <sup>-1</sup> |
| Precio medio \$ US (t) | 1 350 dólares          |

Fuente: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2020).

## 2.6 Principales usos de la estevia

La estevia es cultivada comercialmente para la extracción de glucósidos de esteviolo. Las hojas son la principal fuente de diterpenos de glucósidos, tales como los esteviósidos, rebaudiósidos A y C, y el dulcósido A, los cuales le confieren un dulzor intenso en una escala de 210, 242, 30 y 30 veces mayor que la sacarosa, respectivamente (Bayraktar, 2019). Estos glucósidos se caracterizan, además, por no mostrar efectos secundarios tóxicos, ni cancerígenos (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012). Cabe destacar que la estevia, además de su uso en la industria como edulcorante no calórico y potenciador alimentario, se utiliza en muchos países como medicamento. Diversos estudios han demostrado que posee propiedades como antidiabético, antiobesidad, antitumoral, antihipertensivo, antimicrobiano, anticaries y exhibe propiedades antioxidantes (Ahmad *et al.*, 2020; Ryan, 2021; Hernández *et al.*, 2022).

En el año 2010, el Comité Mixto FAO/OMS de expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) otorgó a la planta la certificación de alimento seguro (Cauich-Cauich *et al.*, 2022). Desde entonces, ha sido considerado un cultivo con alto potencial económico y, en la actualidad, se ubica como el segundo edulcorante natural a nivel mundial (Cauich-Cauich *et al.*, 2022). A partir del 2017, las hojas de estevia se pueden utilizar para infusiones de hierbas, frutas y té, y el valor nutracéutico de la biomasa podría ser una oportunidad para el mercado de las hojas secas de estevia (Tavarini *et al.*, 2018). Se considera un cultivo rentable novedoso, de gran potencial para México, ya que la prevalencia de la diabetes y la obesidad seguirá aumentando. Entre 2000 y 2018, la prevalencia de obesidad aumentó un 42% especialmente entre las mujeres y las personas mayores de 50 años (Meza *et al.*, 2015; Barquera *et al.*, 2018). De este modo, el uso de estevia como edulcorante natural no calórico, representa una alternativa valiosa, ya que pueden ser consumido sin riesgo para la salud por personas diabéticas (Ruíz-Ruíz *et al.*, 2015).

## **2.7 Descripción y clasificación taxonómica de *S. rebaudiana***

*Stevia rebaudiana*, es uno de los 950 géneros de plantas que pertenecen a la familia Asteraceae. Esta especie está representada por un grupo de hierbas, subarbustos y arbustos anuales, y perennes que se encuentran en regiones montañosas, bosques abiertos, márgenes de ríos y valles secos (Yadav *et al.*, 2011). Su primera descripción botánica se atribuye a Moisés Santiago de Bertoni (Soejarto *et al.*, 2019) en el año de 1899. La planta fue nombrada inicialmente como *Eupatorium rebaudianum* (Ahmad *et al.*, 2022) en honor a Ovidio Rebaudi, quien fue el primer químico que estudió las características químicas de las sustancias extraídas en 1900. Posteriormente, su nombre cambió por el actual *S. rebaudiana* Bertoni en 1995 (Khiraoui *et al.*, 2017). Al principio, la estevia fue empleada exclusivamente para la producción de alimentos, pero, debido a las propiedades curativas que se le atribuían, se empezó a utilizar con fines medicinales (Khiraoui *et al.*, 2017; Ahmad *et al.*, 2022).

De las 230 especies existentes de estevia, únicamente *S. phlebophylla* y *S. rebaudiana* producen componentes con sabor dulce (Németh y János, 2019). *S. rebaudiana* se

describe como un arbusto perenne con un extenso sistema radicular, tallos quebradizos, hojas pequeñas y elípticas (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2017). Alcanza una altura desde 60 a 100 cm, y durante su desarrollo inicial no posee ramificaciones. No presenta una raíz principal ni profunda, sino que se distribuye cerca de la superficie (Lozano-Contreras y Ramírez-Jaramillo, 2022). La flor es pequeña y blanquecina. El fruto es aquenio, contiene una sola semilla que se disemina por el viento; si la semilla es oscura, es fértil y si es clara es estéril (Lozano-Contreras y Ramírez-Jaramillo, 2022). El Cuadro 2 muestra la clasificación taxonómica de la estevia.

Con el fin de generar mayores rendimientos de esteviosidos, se han creado nuevas variedades de estevia para su siembra comercial. En la actualidad, existen más de 200 variedades de estevia reportadas en el mundo (Lozano-Contreras y Ramírez-Jaramillo, 2022).

**Cuadro 2.** Clasificación taxonómica de *Stevia rebaudiana*.

| Taxones       | Clasificación     |
|---------------|-------------------|
| Reino         | Plantae           |
| Subreino      | Tracheobionta     |
| Superdivisión | Spermatophyta     |
| División      | Magnoliophyta     |
| Clase         | Magnoliopsida     |
| Subclase      | Asteridae         |
| Grupo         | Monochlamydae     |
| Orden         | Asterales         |
| Familia       | Asteraceae        |
| Subfamilia    | Asteroideae       |
| Tribu         | Eupatorieae       |
| Género        | <i>Stevia</i>     |
| Especie       | <i>rebaudiana</i> |

Fuente: Yadav *et al.*, 2011.

La siembra en México se inició con la variedad Morita II, procedente de Japón (Martínez-Cruz, 2015). Esta variedad se caracteriza por contener una alta concentración de glucósidos; destacando el contenido de Rebaudiósido A que oscila de 7 al 13%, mientras que el contenido de Esteviosido varía de 1.2 al 5%. No obstante, al no ser una variedad

de origen tropical, presenta algunos inconvenientes para su desarrollo comercial, como: mayor demanda de nutrimentos que las variedades criollas (provenientes de Paraguay), quebrantamiento de tallos primarios y secundarios, lo cual dificulta su rebrote, además de ser una variedad susceptible al hongo *Fusarium*, que puede generar pérdidas de hasta un 30% en la producción (Jarma, 2008).

## **2.8 Manejo del cultivo de estevia y requerimientos edafoclimáticos**

La densidad de siembra generalmente se considera de 80,000 a 100, 000 plantas ha<sup>-1</sup>, con una distancia entre plantas de 16 cm y entre líneas de 45 a 65 cm (Ramírez, 2011). Se requiere de riegos superficiales constantes para evitar que la planta sufra estrés hídrico. El tipo de riego que se recomienda es por goteo, y se aprovecha para realizar la aplicación de algún fertilizante (Flores-González, 2019). Por otra parte, las principales podas son la de formación, sanitaria o de renovación (Flores-González, 2019). Según Ramírez-Jaramillo y Lozano-Contreras (2017), la más importante es la de formación, la cual se realiza a los ocho días después de la plantación en campo. En esta poda se corta el ápice de la plántula, dejando de tres a cuatro pares de hoja con el propósito de estimular la brotación de las ramas laterales. La poda sanitaria consiste en eliminar las ramas que han sufrido daño mecánico o cuando se presenta mucha floración. Se recomienda podar toda la planta a unos 25 cm del suelo, con el fin de estimular el crecimiento vegetativo (Ramírez, 2011).

En cuanto a la fertilización, se deben realizar análisis de suelo para establecer un programa de nutrición. Flores-González (2019) encontró que para producir 2.5 t<sup>-1</sup> de hoja seca, se requieren 162 kg de N, 19 kg de P, 140 kg de K, 40 kg de calcio (Ca) y 9 kg de magnesio (Mg). La recomendación general es aplicar por hectárea las siguientes mezclas físicas: 100 kg de la formulación 15-15-15 + 50 kg de cloruro de potasio y 15 kg de urea. Mientras que, Hashimoto Pinto (2016) reportó que para obtener una tonelada de hoja seca por hectárea en Brasil se requieren 130 kg de N, 18.8 kg de P, 131.5 kg de K, 47.3 kg de Ca, 8.3 kg de Mg y 9.7 kg de azufre (S).

Es importante tener en cuenta las condiciones edafoclimáticas óptimas para la producción de estevia. El Cuadro 3 muestra las condiciones óptimas y sub-óptimas para cultivar estevia. *Stevia rebaudiana* crecen preferentemente en regiones tropicales y subtropicales, en un rango de temperatura de 20 a 30 °C y, a una altitud entre los 0 a 600 msnm, con precipitaciones pluviales que oscilan entre los 1400 a 1800 mm. De acuerdo a Ramírez *et al.* (2011), la humedad relativa debe ser menor a 85%, pero mayor a 75% para evitar la incidencia de enfermedades. El pH del suelo debe mantener entre 5.5 – 7.0, siempre que no sea salino.

## **2.9 Estevia criollo (nativo) y variedad Morita II**

El material de estevia principalmente es criollo proveniente de Paraguay; al realizar las siembras con este material, las plantas presentan diferencias morfológicas y fenológicas, por tanto, hay variabilidad en sus componentes de rendimiento como altura de la planta, longitud y ancho de la hojas, floración y cosecha (Ramírez, 2011). Esta variedad es la más utilizada en el mundo; presenta un ciclo precoz de 2 a 2.5 meses, y se puede cosechar hasta el 3% de rebaudiósido A y 7% de esteviosido. Tiene un rendimiento de 1 000 a 1 200 kg ha<sup>-1</sup> por año bajo condiciones de temporal, y de 3 000 a 4 000 ha<sup>-1</sup> por año bajo condiciones de riego (Daza *et al.*, 2015). En la actualidad se pueden encontrar variedades mejoradas en el mercado (Ramírez, 2011). Por ejemplo, la variedad Morita II fue generada por Toyosigue Morita, agrónomo y fitomejorador japonés. Esta variedad tiene un mayor rendimiento y calidad del producto final que los materiales criollos. Presenta una altura de hasta 90 cm; ciclo de 3 a 3.5 meses; tolerante a septoria (enfermedad fungosa de la hoja); contiene hasta el 12% de rebaudiósido A y hasta el 3% de esteviosido. Presenta rendimiento de 1 000 a 1 500 kg ha<sup>-1</sup> por año bajo condiciones de temporada y de 4 000 a 8000 ha<sup>-1</sup> por año bajo condiciones de riego (Espitia *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2016). La variedad Morita II es la más demandada por su mayor contenido de glucósidos de esteviolo.

**Cuadro 3.** Condiciones edafoclimáticas para la producción de estevia.

| Condiciones      | Condición óptima  | Condición sub-óptima  |
|------------------|---|---|
| Región           | Tropical y subtropical  | Templada  |
| Altitud          | 0 a 600 msnm  | 500 a 1200 msm  |
| Suelos           | Suelo areno-arcilloso o franco-arcilloso con regular a alta proporción de materia orgánica  | -   |
| Drenaje          | Alta  | Regular   |
| Temperatura      | 20 a 30 °C  | 15 a 18 °C<br>30 a 43 °C  |
| Precipitaciones  | Durante todo el año entre 1400-1800 mm  | 500 a 1000 mm<br>Mayor a 2000   |
| Humedad relativa | 75% a 85%   |   |
| pH               | 5.5 a 7.0   | 7.1 a 7.5<br>4 a 5  |
| Salinidad        | Baja o nula salinidad   | Media   |
| Fotoperiodo      | Días largos con una alta intensidad solar (T Máx: 43 °C).<br>Fotoperiodo crítico: 12 a 13 h | Evitar la exposición prolongada de luz produce daños y fallas en el enraizado |

Fuente: Ramírez *et al.*, 2011; Yaday *et al.*, 2011; Gutiérrez y Bermejo, 2015; Carrascal, 2016; Barberá, 2017; Lozano-Contreras y Ramírez-Jaramillo, 2017.

## 2.10 Tipos de propagación de estevia

La reproducción de estevia es por vía sexual y asexual. Sin embargo, la reproducción sexual se ve afectada por el bajo porcentaje de germinación de las semillas (10-38%) (Paredes-Suárez, *et al.*, 2021). Por lo que este método no es recomendable para fines comerciales. En la propagación asexual se conservan las características fenotípicas de la planta progenitora y se asegura la homogeneidad en las plantas, lo cual es importante en la reproducción a nivel comercial (Tamura *et al.*, 1984). La propagación por esquejes es conveniente para escala comercial y es importante tener una planta madre de donde se obtenga el material vegetativo (Oliva *et al.*, 2009). Otro método de propagación asexual, es la micropropagación, que permite el incremento acelerado del número de plantas derivadas de un genotipo seleccionado, reducción de tiempo de multiplicación, la obtención de grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajo costo y mayor control de sanidad del vegetal que se propaga (Orozco, 2004; Levitus, 2010).

## **2.11 El calentamiento global y el cambio climático**

El Panel Intergubernamental de expertos sobre el Cambio climático (IPCC) indica que el calentamiento global es inequívoco, por ser evidente a partir de las observaciones de aumentos en el promedio mundial de las temperaturas del aire, derretimiento generalizado de los glaciares y aumento del nivel promedio del mar, y el aumento de las concentraciones de GEI (IPCC, 2013).

El cambio climático es la variación en el clima de cualquier área durante un largo período de tiempo (Chen y Chen, 2013). La emisión de GEI es una de las principales causas del calentamiento global y del cambio climático (Kumari *et al.*, 2022). Los ciclos solares, las erupciones volcánicas, la deriva continental, los gases atmosféricos son procesos internos naturales que también contribuyen al cambio climático. Sin embargo, son diversas las actividades humanas como la industrialización, urbanización, agricultura (25% de las emisiones), las responsables del drástico cambio climático que está afectando al planeta hoy en día (Kumari *et al.*, 2022).

En los últimos 50 años la concentración de GEI ha aumentado considerablemente, afectando a todas las regiones del mundo con eventos climáticos extremos, incluidas olas de calor, fuertes precipitaciones, sequías y ciclones tropicales (Feliciano *et al.*, 2022). Esto contribuye a cambios rápidos y a gran escala en los ecosistemas. Se prevé que el calentamiento global en 1.5 °C a 2 °C sea superado durante el siglo XXI a menos que se reduzcan drásticamente las emisiones de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (Feliciano *et al.*, 2022).

### **2.11.1 El cambio climático y la producción agrícola**

Dentro de la actividad agrícola, el cambio climático está impactando sobre los sistemas de producción como consecuencia del aumento en la frecuencia y la gravedad de los eventos extremos (Zubelzu *et al.*, 2022). La producción agrícola en cualquier país depende en gran medida de las condiciones climáticas, y en el escenario actual, el aumento de la temperatura, la escasez de agua, la disminución de la fertilidad del suelo y el aumento de la salinidad genera un desafío importante para la seguridad y soberanía

alimentaria de muchos países del mundo. Por lo tanto, la reducción en los rendimientos de producción de los cultivos, está influenciada en gran medida por el estrés abiótico causado por la limitación de agua, temperaturas altas, frío extremo, acidez y salinidad del suelo; y por el estrés biótico ocasionado por patógenos, insectos, malezas (Wang, 2013) La evidencia indica que el estrés biótico puede causar una pérdida del 28.2% en el trigo, un 37.4 % en el arroz, un 31.2% en maíz, un 40.3% en papas y un 28.8% en el algodón (Oerke, 2006).

Las principales limitaciones ambientales para el manejo agrícola y la producción de cultivos, son las altas tasas de evapotranspiración, el aumento de la variabilidad de las precipitaciones y la intensa sequía en verano (Clemente *et al.*, 2021). En tales condiciones, las prácticas agrícolas sostenibles puedan diversificar los sistemas de cultivo y mitigar el cambio climático. Por ejemplo, los cultivos perennes reducen la erosión del suelo, minimizan la lixiviación de nutrientes, capturan más carbono (C) en los suelos, protegen los recursos hídricos, crean una mejor tolerancia a las plagas y proporcionan un hábitat continuo para la vida silvestre (Zhang *et al.*, 2011). Además, dichas especies requieren menos uso de equipos agrícolas que los cultivos anuales, así como menor cantidad de fertilizantes y herbicidas (Schmer *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011). En este sentido, *S. rebaudiana* es una especie que se cultiva con éxito en una amplia gama de ambientes agroecológicos, desde zonas semihúmedas, subtropicales hasta templadas (Clemente *et al.*, 2021). Asimismo, requiere menores aportes de tierra, agua y energía para producir la misma cantidad de dulzura que se encuentra en otros edulcorantes naturales. Por ejemplo, la huella hídrica de la estevia fue un 92% más baja que la del azúcar de remolacha y un 95% más baja que en caña de azúcar (Ashwell, 2015).

Los enfoques biotecnológicos desempeñan un papel importante en la adaptación y mitigación del cambio climático. El uso de HMA ayuda a restaurar el ecosistema dañado y resolver diferentes problemas ambientales para mitigar el cambio climático. Diversos estudios han demostrado que los HMA causan un efecto positivo en la relación entre el suelo y la planta (Kumari *et al.*, 2022).

### **2.11.2 Condiciones ambientales y su efecto sobre los hongos micorrízicos**

Las condiciones ambientales estresantes están muy extendidas y afectan a todos los microorganismos. Sin embargo, al igual que otros organismos, los HMA desarrollan mecanismos de estrés que les permiten persistir o incluso prosperar bajo estrés ambiental, controlar daños, y activar procesos de reparación. Dichos mecanismos pueden proteger a sus socios vegetales, lo que contribuye a su salud y supervivencia en condiciones hostiles. Los HMA pueden moldear fuertemente no solo su fisiología y la de las plantas, sino también su ecología y evolución (Branco *et al.*, 2022).

A pesar de la abundante evidencia relacionada con los efectos del estrés en HMA y su capacidad para soportar condiciones estresantes, múltiples aspectos de estos procesos siguen sin estar claros, así como tampoco está claro cómo el estrés afecta el ciclo de vida de los hongos (Branco *et al.*, 2022).

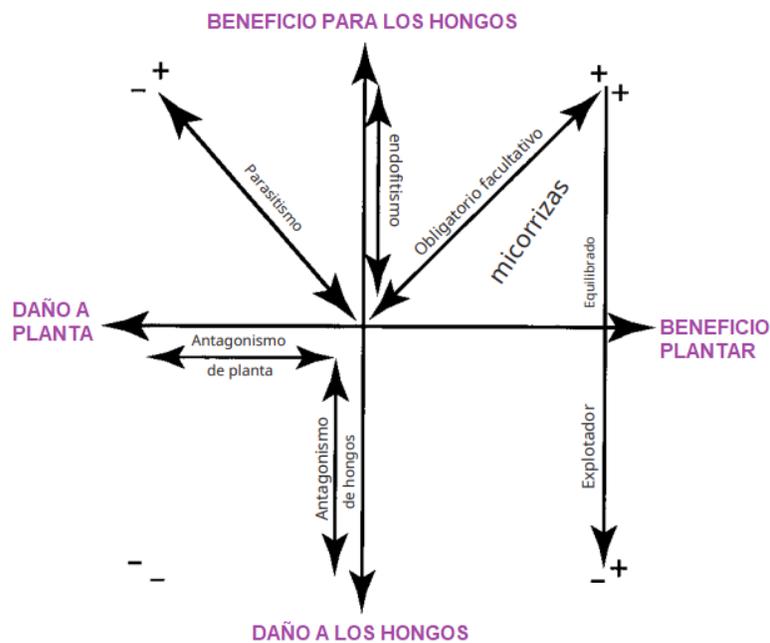
Los HMA además de mejorar la química y biología del suelo, pueden proteger a las plantas de ambientes hostiles al influir en las respuestas de estrés y la salud de las plantas, pero también pueden desempeñar un papel importante en la configuración de la adaptación ambiental de las plantas (Rodríguez *et al.*, 2004).

### **2.12 Micorrizas: interacciones simbióticas**

El término micorriza fue expuesto por primera vez por Albert Bernard Frank en 1885, para definir a la asociación simbiótica mutualista que existe entre las raíces de las plantas y ciertos tipos de hongos del suelo (Siddiqui y Pichtel, 2008). Su nombre proviene de los términos griegos “*mikos*” que significa hongos y “*rhiza*” que significa raíz. Esta asociación es esencial para uno o ambos socios y ocurre en un órgano especializado de la planta donde el contacto íntimo resulta del desarrollo sincronizado de la raíz de una planta viva y el hongo. Esta simbiosis micorrizica puede ser mutualista o no, dependiendo de si el flujo de nutrientes entre el hongo y la planta es balanceado o explotador, respectivamente (Brundrett, 2004). La mayoría de las micorrizas se consideran asociaciones mutualistas equilibradas en donde el hongo favorece la asimilación de P, agua y micronutrientes [Mg, calcio (Ca), hierro (Fe)], al aumentar la superficie de la

raíz, y la planta proporciona a éste, productos fotosintéticos necesarios para su crecimiento y supervivencia (Brundrett, 2004; Pathan *et al.*, 2020). Sin embargo, las micorrizas no pueden clasificarse universalmente como asociaciones mutualistas porque los beneficios para los hongos en asociaciones con plantas micoheterótrofas son poco plausibles y aparentemente sólo benefician a las plantas (Brundrett, 2004).

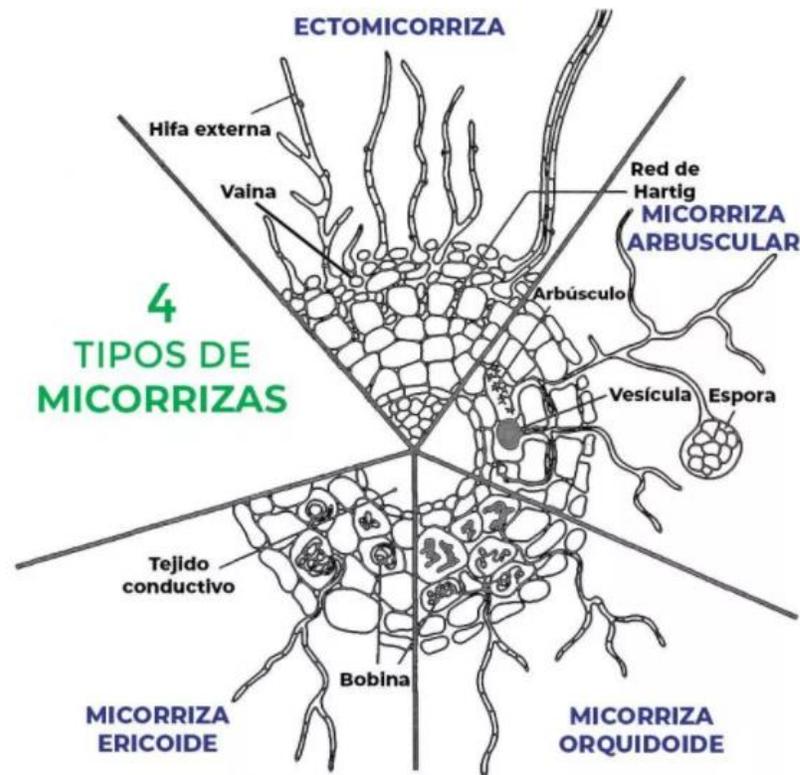
Por otro parte, las asociaciones patogénicas implican un contacto íntimo entre la planta y el hongo, pero se diferencian de las micorrizas porque carecen de la transferencia de nutrimentos del hongo a la planta y son perjudiciales para las plantas hospedantes, lo que provoca síntomas de enfermedad (Brundrett, 2004). Los hongos micorrízicos también se comportan como endófitos, necrótrofos y antagonistas de las plantas hospedantes o no hospedantes, con funciones que varían durante la vida de sus asociaciones (Brundrett, 2004). Las asociaciones de micorrizas representan diversos grados de interdependencia y especialización morfológica como se muestra en la Figura 5.



**Figura 5.** Diagrama comparativo de los tipos de micorrizas (beneficios para la planta) y otras interacciones planta-hongo (daños para la planta). Fuente: Adaptado de Brundrett, 2004.

### 2.12.1 Clasificación de las micorrizas

Las micorrizas son asociaciones múltiples que comprenden diversas categorías morfológicas, funcionales y evolutivas (Smith y Read, 1997). Cuando las micorrizas establecen interacciones, los hongos por lo general modifican la morfología de la raíz, desarrollando nuevas estructuras que caracterizan a los diferentes tipos de micorrizas (Panwar *et al.*, 2008; Allen y Allen, 1991). Ciertos tipos de micorrizas son semejantes y comparten linajes de plantas, mientras que otras tienen características anatómicas muy distintas e historias evolutivas separadas. En la Figura 6 se describen los cuatro grupos de micorrizas: a) ectomicorriza, b) micorriza arbuscular, c) micorriza orquidoide y d) micorriza ericoide.



**Figura 6.** Tipos de micorrizas. Fuente: Adaptado de Selosse y Le Tacon, 1998.

**a) Ectomicorriza (ECM).** Estas micorrizas prefieren asociarse con plantas leñosas y árboles de zonas templadas, siendo especialmente característico en hayas, pinos, robles y eucaliptus (Allen y Allen, 1991). Los hongos pertenecen a los grupos Ascomycetes, Basidiomycetes y Phycomycetes. Se caracteriza por tener un manto hifal y una estructura compleja altamente ramificada llamada red de Hartig. El hongo no penetra más allá de los espacios intercelulares de la corteza por lo que no entra a la célula.

**b) Micorriza Arbuscular (MA).** También conocida como Micorriza Vesicular Arbuscular, (MVA) o micorriza glomeromicota, es la asociación de hongo-raíz más extendida y común. Se presenta en más del 85% de las especies vegetales de importancia agrícola (Allen y Allen, 1991). Se le conoce también como endomicorriza, no forma un manto externo que se pueda observar a simple vista. Las hifas se introducen inicialmente entre las células epidérmicas de la raíz, pero luego penetran en el interior de éstas, formando vesículas alimenticias y arbusculos (Allen y Allen, 1991). Dentro de la raíz, el hongo coloniza las células de la corteza, pero no alcanza la endodermis (Figura 6). Existen seis géneros de hongos que son responsables de esta colonización generalizada, siendo: *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Sclerocytis* y *Scutellospora* (Blee *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 2008).

**c) Micorriza orquideoide.** Forma asociaciones con el grupo de las orquídeas, siendo imprescindibles para su desarrollo y vida juvenil. Presenta haustorio sin ramificación u ovillos espirales dentro de las células. Su micelio es casi incoloro y el manto hifal está ausente. En estado adulto, la planta puede llegar a independizarse, en algunos casos. La principal característica de esta micorriza es la formación de pelotones dentro de las células de la planta. Los hongos de este tipo de micorriza se incluyen en la división Basidiomycetes (Allen y Allen, 1991).

**d) Micorriza ericoide.** Es el tipo más sencillo y simple. El hongo penetra en las células para formar ovillos y no presenta manto externo. Pertenece a la división de hongos Ascomycetes y Basidiomycetes (Allen y Allen, 1991).

### **2.12.2 Micorrizas arbusculares**

Este tipo de hongos es el más abundante en horticultura, pertenece a la división Glomeromycota y son simbioses forzados (Vosátka y Albrechtová, 2009). Los HMA tienen diferentes estructuras particulares como hifas, vesículas y arbusculos. Las hifas son estructuras principales y se pueden clasificar en: i) ineficaces, las que inician la colonización y establecen contacto con las raíces; ii) absorbentes, las que exploran el suelo e intercambian nutrientes y iii) fértiles, las encargadas de la producción asexual de esporas (Camarena- Gutiérrez, 2012).

Durante el proceso de la simbiosis micorrízica arbuscular, una espora de HMA germina para posteriormente ramificarse en múltiples trayectorias con el fin de establecer contacto y comunicación bioquímica con las raíces de la planta circundante. Compuestos químicos como los flavonoides y los elicitores (moléculas capaces de inducir cualquier tipo de defensa en la planta) identifican y reconocen al simbionte esta primera etapa de la simbiosis (Cauich-Cauich *et al.*, 2022). Al mismo tiempo, se producen enzimas (catalasas y peroxidasas), aparece el apresorio (estructura simbiótica inicial) y el hongo penetra finalmente la raíz. Posteriormente, se inician cambios morfogénéticos para el proceso de colonización de las raíces, estableciéndose una asociación mutualista entre el hongo y la planta, donde ambos son beneficiados de esta relación (Cauich-Cauich *et al.*, 2022).

### **2.13 Importancia de los HMA en las plantas**

Los HMA presentes en el suelo, establecen relaciones mutualistas con las plantas y son elementos indispensables del ecosistema con un papel importante en la nutrición de las plantas, al proporcionar acceso a los nutrientes derivados del suelo. De manera natural, se observa una asociación íntima entre las raíces de las plantas y los HMA. Este tipo de hongos establecen asociaciones simbióticas con más del 80% de las plantas terrestres, y la tasa de colonización depende particularmente del tipo de hongo, la especie de planta y los factores ambientales (Bhantana *et al.*, 2021).

La colonización de HMA tiene un gran potencial en las interacciones entre plantas leguminosas y ecosistemas del suelo, debido a sus características biológicas y fisiológicas (El-Sawah *et al.*, 2021). Su asociación promueve el estado de nutrientes de las plantas hospederas, al facilitar la adquisición de N, P, K, Ca, Cu, Mg, Mn, Fe y Zn, en particular los de movilidad limitada, como el P y Zn (Yadav *et al.*, 2013). Además, se tiene un gran potencial en la absorción de agua, el biocontrol de patógenos, la síntesis de hormonas de crecimiento y el establecimiento de plántulas en condiciones adversas de suelo y climáticas (Yadav *et al.*, 2013).

Un adecuado manejo de nutrientes promueve el eficiente contenido de clorofila y la eficiencia fotosintética en hojas, por lo tanto, mejora el crecimiento, rendimiento y calidad de los cultivos (Wu *et al.*, 2021). Las clorofilas y los carotenoides son responsables de la absorción de luz que impulsa la fotosíntesis. El fotosistema I (PSI), el fotosistema II (PSII) y la reacción oscura de las plantas se ven afectados negativamente por el estrés a altas temperaturas, lo que resulta en una menor actividad fotosintética de transporte de electrones. Estudios previos han indicado que el contenido de clorofila es mayor en las plantas micorrizadas con HMA que en las plantas no micorrizadas bajo estrés por temperatura (Yan *et al.*, 2021).

Autores como Clapperton y Read (1992); Shumway y Koide (1995) señalan que la productividad (rendimiento) de la planta hospedante está correlacionada con el grado de colonización de los hongos micorrízicos. Por su parte, Evans y Miller (1988); Sidhu y Chakravarty (1990); Thomson *et al.* (1996); Soulas *et al.* (1997) señalaron que la productividad de las plantas es baja cuando los factores del suelo (fungicidas, pH, salinidad, anegación, temperatura, entre otros) inhiben el desarrollo de los hongos micorrízicos. Respecto a la productividad del hongo, disminuye por factores que dañan a las plantas como los herbicidas, contaminación, perturbación, entre otros (Termorshuizen y Schaffers, 1987).

Burgess *et al.* (1994) y Dickson *et al.* (1999) enfatizan que los flujos de nutrientes o las respuestas de crecimiento de las plantas son proporcionales al área de la interfaz

simbiótica. Así, el desarrollo de las hifas en el suelo está en función del crecimiento de las plantas o de los requerimientos de nutrimentos (Miller y Kling, 2000; Wallander *et al.*, 2001), y la acumulación de nutrimentos en las plantas puede explicarse por la fenología de las micorrizas (Newton, 1991; Lapointe y Molard, 1997). En este sentido, las raíces de las plantas son más eficientes en la formación de micorrizas para la absorción directa de nutrimentos (Wilson y Hartnett, 1998; Siqueira y Saggin-Júnior, 2001).

La mayoría de los hongos micorrízicos son simbioses obligados (Brundrett *et al.*, 1996; Smith y Read, 1997) de manera que el crecimiento radicular es necesario para la formación micorrízica (Hepper, 1985). Por ende, la absorción de nutrimentos se sincroniza con la formación micorrízica y la actividad hifal del suelo (Fitter, 1995; Wallander *et al.*, 2001). En el Cuadro 4 se indican los efectos de las micorrizas arbusculares en cultivos agroalimentarios.

**Cuadro 4.** Efectos de HMA en cultivos agroalimentarios.

| Cultivo   | Efecto positivo  | Referencia                            |
|---|--|---------------------------------------|
| <b>Caña de azúcar</b><br>( <i>Saccharum</i> spp.)     | A dosis de 50 y 100 esporas por plántula, encontraron un incremento en el contenido de Mg (12%) y Ca (8%) en las hojas   | Moreno-Hernández <i>et al.</i> , 2022 |
| <b>Melón</b><br>( <i>Cucumis melo</i> L.)             | Incremento de biomasa (peso seco de brotes 9-12%); altura de brotes (12%); bioquímica (azúcares solubles 103%, clorofila total 174%)   | Meddich <i>et al.</i> , 2021          |
| <b>Caña de azúcar</b><br>( <i>Saccharum</i> spp.)     | Incremento del crecimiento vegetal (8%)  | Fors <i>et al.</i> , 2020             |
| <b>Tomate</b><br>( <i>Lycopersicon esculentum</i> L.) | Modulación de la absorción de nutrimentos: P (180%), K (44%), Ca (55%), Fe (212%), Zn (180%) y Mn (100%) en las hojas; y P (126%), K (47.8 %), Ca (75%), Fe (183%), Zn (200%), Mn (100%) en raíz | Di Martino <i>et al.</i> , 2019       |
| <b>Chile morrón</b><br>( <i>Capsicum annuum</i> )     | Incremento de la altura de las plantas (36%); diámetro de tallo (40%); peso de fruto (132.5%)  | Pérez-Velasco <i>et al.</i> , 2019    |
| <b>Agave</b><br>( <i>Agave cupreata</i> )             | Incremento de la biomasa seca total de las plantas (239%)  | Trinidad-Cruz <i>et al.</i> , 2017    |

## 2.14 Uso HMA en plántulas *ex vitro*

La aplicación de hongos micorrízicos en plántulas *ex vitro*, permite una mejor supervivencia al momento de su aclimatización en invernadero (De Souza *et al.*, 2020). La aclimatización es la etapa más delicada de la micropropagación, lo que dificulta la obtención de nuevas plántulas. En este sentido, el uso de sustratos adecuados asociados con HMA ha sido una alternativa para el crecimiento y desarrollo de plántulas. Di Martino *et al.* (2019); Brunetto *et al.* (2019); Al-Karaki y Williams (2021) mencionan que los HMA establecen asociaciones mutualistas simbióticas con la mayoría de las plántulas, suministrando a las raíces nutrientes y agua. Diversos estudios indican que en cultivos agrícolas como la soja (*Glycine max*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), uva (*Vitis vinífera*), caña de azúcar (*Saccharum spp.*), la inoculación con HMA aumentó el crecimiento y mejoró la absorción de nutrientes (Brunetto *et al.*, 2019; Di Martino *et al.*, 2019; Al-Karaki y Williams 2021). Los HMA también optimizan las relaciones con el agua, es decir, las plantas presentan mayor disponibilidad de sobrevivir el estrés por sequía, salinidad o por variación de la temperatura (Dalla *et al.*, 2021; Meddich *et al.*, 2021; Sales *et al.*, 2021). En virtud de lo anterior, el uso de HMA en el campo podrían favorecer el ahorro en el uso de fertilizantes solubles, y coadyuvar a una agricultura sustentable y con menor impacto en el ambiente, obteniendo mayores rendimientos en producción de hoja seca en el agroecosistema estevia, mejorando la calidad del suelo (física, química y biológica).

### **2.15 Efecto de los HMA en la biomasa y nutrientes de las plantas**

Con respecto al contenido nutrimental de la estevia, el Cuadro 5 indica la composición bioquímica por cada 100 g de hoja seca. El componente principal de las hojas de estevia son los carbohidratos, aunque también presenta contenidos altos de proteína y fibra dietética. *S. rebaudiana* presenta compuestos fenólicos y un contenido de vitaminas C y B, semejante a otras frutas y hortalizas de consumo frecuente, tales como plátano, manzana, piña, calabaza, berenjena, entre otros (Johnston *et al.*, 2007; Arroyo *et al.*, 2018).

**Cuadro 5.** Contenido bioquímico de la hoja de *S. rebaudiana* en 100 g de hoja seca.

| Compuesto                             | Contenido (g) |
|---------------------------------------|---------------|
| Proteínas                             | 11.2-16       |
| Carbohidratos                         | 61.9          |
| Lípidos                               | 1.9-3.73      |
| Fibra dietética                       | 6.8- 15.2     |
| Fenólicos (polifenoles y flavonoides) | 4.6           |
| Vitamina C                            | 0.014         |
| Vitamina B                            | 0.00043       |

Fuente: Peteliuk *et al.*, 2021.

Además, la planta contiene macro y microelementos como Zn, Fe, Ca, K, Na, Mg y otros minerales que son esenciales para la salud humana (Cuadro 6). Ejemplo en 100 gramos de hoja seca el contenido de potasio varia de 17.3 y 21.15 mg y el calcio entre 8.20 y 17.7 mg.

**Cuadro 6.** Contenido de minerales en hojas secas de *S. rebaudiana* (mg/ 100 g de hoja seca).

| Minerales      | mg    | mg     |
|----------------|-------|--------|
| Potasio (K)    | 21.15 | 17.30  |
| Calcio (Ca)    | 17.70 | 8.20   |
| Sodio (Na)     | 14.93 | 0.70   |
| Magnesio (Mg)  | 3.26  | 2.40   |
| Cobre (Cu)     | 0.73  | 6.00   |
| Manganeso (Mn) | 2.89  | 30.00  |
| Hierro (Fe)    | 5.89  | 366.00 |
| Zinc (Zn)      | 1.26  | 20.00  |

Fuente: Abou- Arab *et al.*, 2010; Atteh *et al.*, 2011.

## 2.16 Efectos benéficos de la simbiosis micorrízica-arbuscular en plantas de estevia

Los beneficios de la simbiosis para las plantas cultivadas se han reportado en términos de supervivencia, morfológicos y productivos (Nanjundappa *et al.*, 2019). Los HMA son capaces de mejorar las condiciones fisiológicas de las plantas, en condiciones, como la tensión del suelo causada por metales pesados, compactación del suelo, salinidad y sequía (Atakan *et al.*, 2018). Además, se ha evidenciado la mejora en el crecimiento y productividad de las plantas cultivadas (Mbarki *et al.*, 2018). *S. rebaudiana* es altamente

susceptible a la colonización por HMA y la diversidad de estos microorganismos en el suelo tiene un efecto diferencial en el hospedero.

La mejora en la nutrición mineral, es el principal beneficio que los HMA aportan a las plantas micorrizadas. Sin embargo, este beneficio también desencadena un aumento en las concentraciones de clorofila que, a su vez modifican la tasa fotosintética, resultando en una mayor productividad fisiológica.

La inoculación con HMA en *S. rebaudiana* sin duda ha mostrado resultados positivos, en primer lugar, porque conduce a una mayor producción de biomasa, aspecto comercial de este cultivo (Da Silva *et al.*, 2021). En este contexto la inoculación de *Glomus intraradices*, estimula la altura, número de hojas, longitud de raíces y producción de biomasa que se relacionan con un mayor contenido de clorofila, que se atribuye a una mejora en el estado nutricional de la planta, como resultado de la extensa red de hifas de HMA (Cauich-Cauich *et al.*, 2022). Esta red cubre una mayor área de suelo, con el fin de absorber agua y nutrientes de baja disponibilidad y movilidad. La asociación micorrízica modifica la calidad de *S. rebaudiana*, mejorando su crecimiento (Tavarini *et al.*, 2018).

## **2.17 El suelo y su fertilidad**

El suelo y los cultivos agrícolas son vulnerables al estrés ambiental, y en consecuencia, al cambio climático. En los agroecosistemas, la biodiversidad del suelo y los servicios ecosistémicos proporcionados por el suelo están amenazados por una variedad de factores naturales y humanos (Sofa *et al.*, 2022). Los suelos agrícolas frecuentemente están sujetos a prácticas agronómicas que alteran las redes tróficas del suelo y hacen que los suelos sean menos productivos a largo plazo. En este contexto, el uso sostenible del suelo destinado a mejorar su estado, crecimiento y desarrollo de las plantas/raíces, juega un papel crucial para mejorar la capacidad biológica de los suelos agrícolas (Sofa *et al.*, 2022).

La fertilidad del suelo se define como se señaló en el apartado conceptualización en los ODS, como la capacidad de un suelo para proporcionar nutrientes de manera oportuna

y en cantidad adecuada al cultivo que se encuentra creciendo en él (Salgado-García *et al.*, 2016). Los principales factores que limitan la fertilidad del suelo en zonas tropicales y para la agricultura sostenible son: i) bajo contenido de nutrimentos; ii) estrés por humedad; iii) erosión; iv) alta fijación de P; v) alta acidez con toxicidad por aluminio; y vi) baja biodiversidad del suelo (Sánchez y Logan, 1992; Gruhn *et al.*, 2000; Cardoso y Kuyper, 2006). De esta forma, la fragilidad de los suelos limita la producción de alimentos en los sistemas productivos de cultivo anual.

La mayoría de las especies de plantas, incluidos los principales cultivos trópicos, forman asociaciones beneficiosas con HMA, impulsando la producción de alimentos, y reduciendo el uso de fertilizantes químicos convencionales (Igiehon and Babalola, 2007). Estas asociaciones fúngicas, permiten restaurar la salud del suelo, mejorar el crecimiento de las plantas y el rendimiento de los cultivos, y hacer frente al estrés abiótico (Vishwakarma *et al.*, 2022). Es por ello, que los HMA, se consideran el recurso más importante y poco conocido para la adquisición de nutrimentos (macro y micronutrimentos) y el crecimiento de las plantas en la agricultura. De tal forma que los HMA mejoran la calidad física, química y biológica del suelo (Cardoso y Kuyper, 2006).

Por otra parte, la humedad del suelo es un componente importante para el crecimiento de los hongos, siendo influenciado por el porcentaje de humedad. Su disminución puede limitar directamente la disponibilidad de materia orgánica para los hongos, de modo que la tasa de degradación puede disminuir y el crecimiento de hongos del suelo puede limitarse. Asimismo, la humedad controla la temperatura del suelo y el flujo de calor (Cardoso y Kuyper, 2006). Lenoir *et al.* (2016) señalan que la baja humedad del suelo afecta el alargamiento de las hifas de HMA y disminuye la germinación de las esporas. A continuación se mencionan las principales funciones de los macronutrimentos en plantas.

## **2.18 Macronutrimentos**

### **2.18.1 Nitrógeno**

El N es un macroelemento esencial que promueve el desarrollo de las plantas, el rendimiento y la calidad de los cultivos. Es esencial en la biosíntesis de clorofila, ácidos nucleicos, aminoácidos y enzimas (Wang, 2020). La MO y el nitrógeno total son dos propiedades fundamentales para evaluar la fertilidad del suelo (Jarquín-Sánchez *et al.*, 2011). Es importante la materia orgánica en el suelo porque regula los procesos químicos, influye en sus características y la actividad biológica. El n está involucrado en diversos procesos vitales, y su deficiencia afecta el crecimiento de la planta. Las plantas absorben el N a través de las raíces del suelo, como iones disueltos de nitrato y amonio. El ciclo global del N se constituye por las interacciones del suelo, organismos y la atmósfera. El N presente en los agroecosistemas procede de los restos de plantas, abonos, estiércol, fertilizantes, nitratos liberados por las lluvias y la fijación de N por microorganismos (Benimeli *et al.*, 2019).

### **2.18.2 Fósforo (P)**

El P es un elemento esencial en los agroecosistemas para la producción de alimentos. Este elemento fue descubierto por Hennig Brand, un farmacéutico y alquimista alemán. Justus Von Liebig en 1840 fue la primera persona en comprobar la importancia del P y N para mejorar los rendimientos agrícolas (Ashley *et al.*, 2011). Desde ese momento comenzó a utilizarse de forma rutinaria como fertilizante mineral. Antes del uso generalizado de fertilizantes comerciales, la producción de los cultivos dependía de los niveles naturales de P en el suelo provenientes de la adición de estiércol del ganado, las inundaciones, cultivos migratorios y residuos de cultivos (Ashley *et al.*, 2011). Un siglo después, la agricultura industrial alteró drásticamente el ciclo biogeoquímico natural, que recicla el P de regreso al suelo, a través de la materia vegetal en descomposición (Schipanski y Bennett, 2021). De tal forma que el P proveniente de los fertilizantes sintéticos al fijarse en el suelo se inmoviliza y la planta no lo aprovecha. Sin este nutrimento, el cultivo ya no tendrá un buen rendimiento vegetal ni una buena productividad (Sinclair y Vadez, 2002). Existen diversos factores que hacen que el P no esté disponible en el suelo, tales como: i) un bajo pH (<4) (Bordeleau *et al.*, 1994); ii)

presencia de aluminio (Al), Fe, Mg, silicio (Si), Ca, materia orgánica (MO); iii) la actividad de los microorganismos.

En suelos ácidos tropicales, existen estrategias para incrementar la disponibilidad de P con una alta capacidad de fijación del mismo. Una de ellas, consiste en aplicar altas cantidades de fertilizantes fosfóricos (Cordell y White, 2011). Sin embargo, esta práctica resulta insostenible, debido a que los fertilizantes presentan grandes costos y existe, como se ha comentado, una baja eficiencia de aprovechamiento por parte de la planta (Cordell y White, 2011). Cerca del 95% del P que se aplica en los campos agrícolas se inmoviliza, generando riesgos ambientales, y únicamente entre 5%-10% es aprovechado. No obstante, el uso de inoculantes microbianos resulta una alternativa sencilla y de fácil aplicación que mejora el uso eficiente de P, además de permitir la sostenibilidad y la preservación del ambiente. Los microorganismos juegan un papel importante en el ciclo biogeoquímico y también hacen disponible este elemento para las plantas. Para el caso del P, los microorganismos solubilizadores de este nutriente participan activamente en procesos de mineralización a partir de una fuente orgánica (disolución del P), en donde los HMA, específicamente ayudan a que exista una mejor absorción de este nutriente (Cordell y White, 2011).

### **2.18.3 Potasio**

Cada año se extraen casi  $32.2 \times 10^{12}$  g de K de la corteza terrestre. Los depósitos de K se encuentran principalmente en minerales evaporíticos, especialmente la silvita y halita. También se encuentra en una variedad de minerales primarios, especialmente la ortoclasa (feldespato), biotita y moscovita, de los cuales se libera por meteorización química (Schlesinger, 2021). Se considera un nutriente esencial para el crecimiento y metabolismo de las plantas y contribuye en gran medida a la supervivencia de éstas, sobre todo bajo situaciones de estrés biótico y abiótico, siendo importante para la producción y calidad de los cultivos (Wang, 2013). En plantas, así como en los animales, el K participa en el equilibrio osmótico e iónico (Schlesinger, 2021). Los movimientos de K son el principal determinante de la función estomática en las plantas. En los seres

humanos, el K controla el equilibrio electrolítico de la sangre y controla la contracción de los músculos.

Algunas plantas y bacterias del suelo acceden activamente al K de los minerales primarios a través de la liberación de ácidos orgánicos. A medida que el K se lixivia de los ecosistemas terrestres en la escorrentía, eventualmente se incorpora al mar, donde se acumula en depósitos de evaporita y minerales arcillosos secundarios, incluida la illita (Schlesinger, 2021). La meteorización química proporciona el 11% de la absorción anual de K por parte de las plantas, frente al 1% de la deposición atmosférica, tanto en lluvia como en sequía. Las partículas que contienen K se pierden de las hojas de las plantas, formando aerosoles orgánicos. El K se lixivia fácilmente del follaje de las plantas y comúnmente es el elemento más concentrado en las precipitaciones, debajo del dosel de un bosque (Schlesinger, 2021).

## **2.19 Biotecnología Vegetal**

La Biotecnología es una herramienta que utiliza sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para crear o modificar productos, con fines de mejoramiento de las plantas, animales, o procesos para usos específicos (Convenio de Diversidad Biológica, 2022). Al hablar de agentes biológicos o derivados biológicos, se refiere principalmente a microorganismos, células de animales y plantas, enzimas, material genético aislado y clonado (Sasson, 1989; Roca y Ramírez, 2000). La biotecnología comprende un conjunto de técnicas aplicables a diversas actividades de la sociedad y es multidisciplinaria e interdisciplinaria, cuya base se fundamenta en la biología, la química y la física. Metódicamente y propositivamente se integra en la ingeniería, medicina, la informática e incluso en las ciencias y tecnologías blandas de la economía, sociología y la psicología (Hernández-Zárate y Zamora-Castro, 2018).

La Biotecnología presenta una interface en cada uno de estos campos y hay diferentes categorías de la Biotecnología, por ejemplo; la Biotecnología de Plantas (Biotecnología Verde), se refiere a la relación con las plantas, es aquella que impacta a los sectores agrícolas, ganadero y forestal. Su interés es la obtención de nuevas variedades de

plantas, producción de biofertilizantes, clonación, así como el cultivo *in vitro* y la micropropagación de especies hortícolas, leguminosas, árboles y plantas en peligro de extinción (Hernández-Zárate y Zamora-Castro, 2018). Esta biotecnología comprende técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* que utilizan plantas, partes de las plantas o entidades subcelulares, así como procesos biológicos, para las industrias de fabricación y servicio (Etienne *et al.*, 1999).

### **2.19.1 Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) y sus aplicaciones**

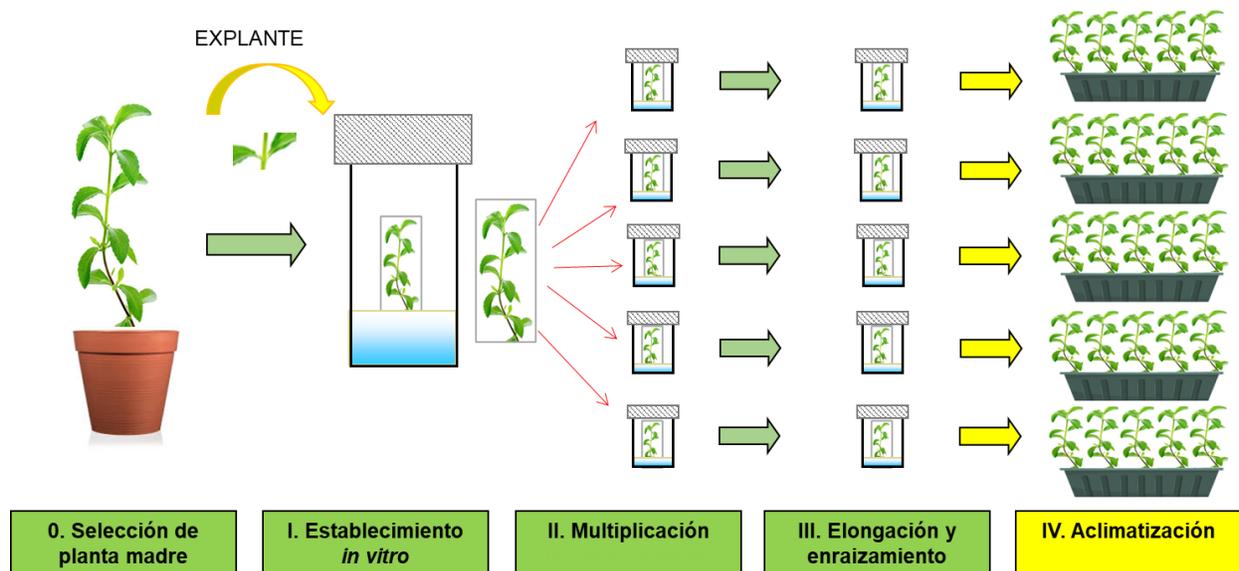
El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) es un conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de cualquier parte de una planta, desde una célula hasta un organismo completo, bajo condiciones artificiales, axénicas y controladas (Pérez *et al.*, 1999; Phillips y Garda, 2019). El objetivo es conseguir que las células expresen su totipotencia, es decir, la capacidad que tienen las células vegetales de regenerar una planta completa, tejidos, órganos o incluso plantas completamente diferenciadas, cuando son separadas de un organismo de origen (Mitalipov y Wolf, 2009).

Existen dos principales vías para la regeneración de plantas *in vitro*: la embriogénesis somática y la organogénesis. La organogénesis, se aboca a la producción de órganos vegetales como raíces o brotes y la embriogénesis somática consiste en la formación de embriones a partir de células somáticas (Pérez *et al.*, 1999). Tanto la organogénesis como la embriogénesis somática se originan directamente a partir de los tejidos parentales o indirectamente a través de la formación de un callo, y se ven principalmente afectadas por el tipo de explante (fragmento de la planta) y procesos de señalización mediante reguladores de crecimiento de la planta (Loyola y Ochoa, 2018). Los cultivos resultantes pueden usarse posteriormente para la producción masiva de plantas micropropagadas (Espinosa-Leal *et al.*, 2018).

### **2.19.2 Micropropagación**

La micropropagación o clonación *in vitro* es la propagación asexual de plantas utilizando técnicas de CTV (Pérez *et al.*, 1999). Es una herramienta biotecnológica fiable que ha

mostrado ventajas en comparación con otros sistemas convencionales de propagación. Permite producir plantas a gran escala que son genéticamente idénticas a la planta madre en poco tiempo, produce plántulas libres de enfermedades y de alta calidad. Otros beneficios del CTV, es que la producción de las plántulas de interés puede realizarse de forma no estacional y se facilita el comercio o intercambio internacional (Pérez *et al.*, 1999; Malakar *et al.*, 2022). Roca *et al.* (1991) argumentan, que se tiene la posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempos económicamente costeables, exhibiendo un mayor control sobre la sanidad del material que se propaga y la posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existan pocos individuos. Estas ventajas hacen a la propagación *in vitro* una práctica comercial rentable con alto valor agregado. En la Figura 7, se muestra el proceso de micropropagación de cualquier especie vegetal consta de cinco etapas básicas (Pérez *et al.*, 1999).



**Figura 7.** Esquema general de la micropropagación y sus fases de cultivo. Fuente: elaboración propia.

Las etapas del proceso de micropropagación son descritas de acuerdo con Pérez *et al.* (1999) como:

**Etapa 0.** Selección de planta madre: en esta fase se seleccionan y acondicionan las plantas madre para asegurar el éxito de la micropropagación, partiendo de una planta con características agronómicamente deseables y vigorosas. El objetivo de esta etapa es garantizar la eficiencia en el establecimiento y desarrollo de los cultivos *in vitro*.

**Etapa I.** Establecimiento *in vitro*: consiste en la elección del tipo de explante y la esterilización de éste, para iniciar el cultivo axénico. La elección del explante depende de lo que se quiera generar en la etapa 2. En esta etapa el porcentaje de éxito puede ser bajo por los problemas de adaptación y contaminantes que la planta puede presentar. Sin embargo, es muy poco el material vegetal que se necesita para iniciar la siguiente etapa.

**Etapa II.** Multiplicación de tejido: se realiza de manera concreta la micropropagación donde se obtiene un gran número de brotes nuevos a partir de los explantes establecidos.

**Etapa III.** Elongación y enraizamiento: se pretende que los brotes generados en la multiplicación crezcan y desarrollen un sistema radical para hacer más fácil su manejo y adaptación a un ambiente *ex vitro*.

**Etapa IV.** Aclimatización: su objetivo principal es lograr la adaptación de las plántulas al momento del trasplante y el inicio del crecimiento *ex vitro*. En esta etapa las plántulas *in vitro* pasan a condiciones externas, para la cual deben tomarse en cuenta características importantes; humedad relativa, incremento paulatino en la intensidad luminosa, trabajar bajo condiciones higiénicas para el control de microorganismos.

### III OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Determinar el efecto de diferentes dosis del hongo micorrízico arbuscular (*Glomus intraradices*) sobre el desarrollo *ex vitro* de plántulas de *Stevia rebaudiana* Bertoni durante la aclimatización.

### **3.2 Objetivos específicos**

1. Medir el desarrollo *ex vitro* de las plántulas de estevia bajo diferentes dosis de HMA.
2. Analizar el contenido de clorofila y carotenoides en plántulas *ex vitro* de estevia bajo diferentes dosis de HMA.
3. Determinar la cantidad de macro y micronutrientes absorbidos en las plántulas *ex vitro* de estevia inoculadas con diferentes dosis de HMA.
4. Medir la colonización micorrízica de estevia por microscopía óptica de campo claro.

## **IV HIPÓTESIS**

### **4.1 Hipótesis general**

La aplicación de hongos micorrízicos arbusculares (*Glomus intraradices*) inoculados al sustrato, tendrá un efecto positivo sobre la supervivencia, colonización, desarrollo y fisiología en plántulas *ex vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni durante la etapa de aclimatización.

### **4.2 Hipótesis específicas**

1. La endomicorriza (*G. intraradices*) adicionada al sustrato, tienen un efecto positivo en las variables de porcentaje de supervivencia de las plántulas, longitud de la plántula y raíz, número de ramas y raíces, número de hojas por rama, longitud de las ramas, peso fresco y seco de la plántula y raíz.
2. La aplicación de la endomicorriza (*G. intraradices*) incrementa el contenido de clorofila y carotenoides en plántulas *ex vitro* de estevia.
3. El uso de *G. intraradices* aumenta el contenido de nutrientes en plántulas de estevia micorrizadas durante la aclimatización.
4. *G. intraradices* coloniza las raíces de estevia durante la aclimatización *ex vitro*.

## **V MATERIALES Y MÉTODOS**

El trabajo experimental fue desarrollado en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Colegio de Posgraduados Campus Córdoba en el periodo de octubre de 2021 a agosto de 2022. El tipo de estudio de esta investigación es experimental, se basa en el método hipotético-deductivo.

### **5.1 Tratamientos y Diseño experimental**

El estudio fue realizado bajo un diseño completamente al azar utilizando 32 plántulas por tratamiento. Todos los experimentos (tratamientos) fueron realizados por triplicado. De cada tratamiento se tomaron 10 plántulas de forma aleatoria.

### **5.2 Variables a evaluar**

Se tomaron datos de supervivencia, altura de la planta, número de hojas, número de raíces, longitud de la raíz. Además, se registró el porcentaje de materia fresca y seca, y porcentaje de colonización. En el análisis foliar se determinó Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K), Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Hierro (Fe), Cobre (Cu), Zinc (Zn), Manganeseo (Mn) y Boro (B). También se analizó el contenido de clorofila y carotenoides en las hojas.

### **5.3 Material vegetal y establecimiento *in vitro***

Se utilizaron plántulas jóvenes de *Stevia rebaudiana* Bertoni cultivar Morita II de tres meses de edad. Para el establecimiento *in vitro*, los explantes fueron esquejes de 2 cm de longitud con dos yemas axilares cada uno. Los esquejes se desinfectaron con jabón comercial Axion® (Mission Hills, S.A. de C.V., San José Iturbide, Gto, MX) y se lavaron con flujo lento de agua corriente durante 10 min. Posteriormente, en campana de flujo laminar, se sumergieron en etanol al 70% (v/v) durante 1 min y posteriormente en una solución al 15% (v/v) de cloro comercial Cloralex™ (Industrias Alen, S.A. de C.V., Santa Catarina, N.L, MX) (5% de i.a.) con dos gotas de Tween 20® (Sigma-Aldrich® Chemical Company, MO, USA) por cada 100 mL de agua durante 10 min. Finalmente, los esquejes se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Los explantes se sembraron en tubos de ensayo (22 x 150 mm) que contenían 10 mL de medio de cultivo Murashige and Skoog (1962) (MS) suplementado con 1 mg L<sup>-1</sup> de 6-Bencilaminopurina (BAP, Sigma-

Aldrich®). El pH del medio se ajustó a 5.8 y se añadieron 2.5 g L<sup>-1</sup> de Phytigel™ (Sigma-Aldrich®) como agente gelificante. Se esterilizó en autoclave durante 15 min a 120 °C y 115 kPa. Los explantes se incubaron a 24 ± 2 °C, bajo irradiancia de 40 ± 5 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y un fotoperiodo de 16 h luz: 8 h oscuridad. Después de un mes de cultivo, los brotes obtenidos se cortaron en segmentos axilares de 2 cm de longitud y se transfirieron a frascos de 500 mL conteniendo 40 mL de medio de cultivo MS suplementado con 2 mg L<sup>-1</sup> BAP. Los cultivos se incubaron bajo las condiciones antes mencionadas.

#### **5.4 Inoculación de hongos micorrízicos y condiciones del cultivo**

La inoculación con HMA se llevó a cabo en condiciones *ex vitro* bajo invernadero utilizando brotes obtenidos en la fase de multiplicación, con 2 cm de longitud, dos hojas y sin sistema radical. Los HMA utilizados fueron de la especie *Glomus intraradices* (Biofertilizante INIFAP®, Chiapas, MX). La asociación planta-hongo (micorriza) se llevó en charolas de polipropileno de 32 cavidades con un sustrato conformado por composta, turba y agrolita (2:1:1 v/v). El sustrato fue esterilizado previamente en autoclave durante 30 min a 120 °C y 115 kPa. Posteriormente, los brotes de estevia se inocularon con *G. intraradices* a diferentes dosis (0, 50, 150, 300 y 450 esporas por plántula). Los brotes inoculados de estevia se cubrieron con un domo translúcido para controlar las condiciones de humedad. Las plántulas inoculadas se mantuvieron en condiciones de invernadero con 60% sombra a 30 ± 2 °C, humedad relativa del 60 ± 10% y luz natural a una irradiancia de 80 ± 10 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> durante 4 semanas. Posteriormente, a las plántulas se les retiró el domo y se mantuvieron en condiciones de invernadero a una temperatura de 35 ± 2 °C, humedad relativa del 30% y luz natural a una irradiancia de 150 ± 10 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> durante un mes. A lo largo del experimento, se le aplicó riego con agua de osmosis cada tercer día durante 60 días. Transcurridos 60 días de aclimatización en invernadero, se evaluó el porcentaje de supervivencia, altura de la plántula y raíz, número de hojas y raíces, longitud de la raíz y peso fresco y seco de la plántula. El peso seco se determinó utilizando un horno de secado (Felisa, FE292, JAL, MX) a una temperatura de 75 °C durante 72 h. El contenido de materia seca se calculó utilizando el peso seco/peso fresco × 100. También, se evaluó el porcentaje de

colonización, contenido de clorofila total, carotenoides y el contenido de macronutrientes (N, P, K, Ca y Mg) y micronutrientes (Fe, Cu, Zn, Mn y B).

### **5.5 Caracterización micorrízica y porcentaje de colonización**

*Caracterización de la micorriza.* Para visualizar el efecto de las diferentes dosis de HMA se tomaron 10 muestras de segmentos de las raíces de 1 cm de longitud. Las muestras de raíz se lavaron tres veces con agua corriente para eliminar la tierra, y luego se sumergieron en KOH (hidróxido de potasio) (Avantor™ Performance Materials, S.A de C.V., Ecatepec de Morelos, Edo. de Méx. MX) al 10% durante 90 min a 90 °C. Se eliminó el sobrenadante y se lavaron con agua corriente. Se sumergieron en HCl (ácido clorhídrico) (Productos Químicos Monterrey S.A. de C.V., Monterrey, N.L, MX) al 2% por 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, se tiñeron con azul de metileno al 0.05% por 10 min a temperatura ambiente (25 °C). Las muestras se observaron bajo un microscopio compuesto VE-M5LCD (Velab Co, Texas, USA) usando el objetivo 40X/0.65. El registro de imágenes se realizó a través del software ZEN 3.4 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Múnich, Baviera, DEU).

*Porcentaje de colonización.* Para determinar el porcentaje de colonización de HMA se utilizaron diez segmentos de raíces de un cm por tratamiento. A partir de las observaciones microscópicas, los porcentajes de colonización se realizaron mediante la siguiente fórmula: Porcentaje de colonización de la raíz (%) = (No. de segmentos de raíces infectadas/No. de segmentos de raíz examinados) × 100. Posteriormente, se tomaron muestras de 1 cm de raíz y se observaron en el microscopio compuesto VE-M5LCD.

### **5.6 Contenido de clorofila total y carotenoides**

El contenido de clorofila total se determinó de acuerdo con Harborne (1973). Para cada muestra, se maceró 1 g de materia fresca con acetona al 80% y se dejó reposar a -4 °C por 24 h. Después, la mezcla se filtró con papel filtro No. 41, se ajustó a un volumen de 25 mL con acetona al 80%. Se utilizaron 2 mL por muestra y se leyeron a una absorbancia de 663 y 645 nm para clorofila a y b, respectivamente. Las lecturas se

realizaron en un espectrofotómetro (Genesys 10 S, Thermo Scientific; MA, USA). Mientras que, el contenido de carotenoides ( $\beta$ -caroteno) se determinó por el método propuesto por Biehler *et al.* (2010) a una absorbancia de 450 nm.

### **5.7 Contenido de macro y micronutrientos**

Para determinar el contenido de nutrientes, las muestras se secaron a 70 °C en un horno de secado (Felisa) durante 72 h y se pulverizaron las hojas en un minimolino de tejido vegetal (Oster 6832, Wisconsin, USA). Las muestras fueron sometidas a digestión húmeda en una mezcla de ácidos perclórico y nítrico en una proporción de 2:1 (v/v), según el protocolo descrito por Alcántar y Sandoval (1999). Para determinar las concentraciones de macronutrientos (N, P, K, Ca y Mg) y micronutrientos (Fe, Cu, Zn, Mn y B), los extractos se analizaron utilizando un espectrómetro de emisión óptica de inducción de plasma acoplado (ICP-OES, Varian 725-ES, Agilent; Mulgrave, Victoria, AUS). La concentración de N se determinó por el método semi-microkjeldahl de acuerdo con el protocolo descrito por Bremner (1965).

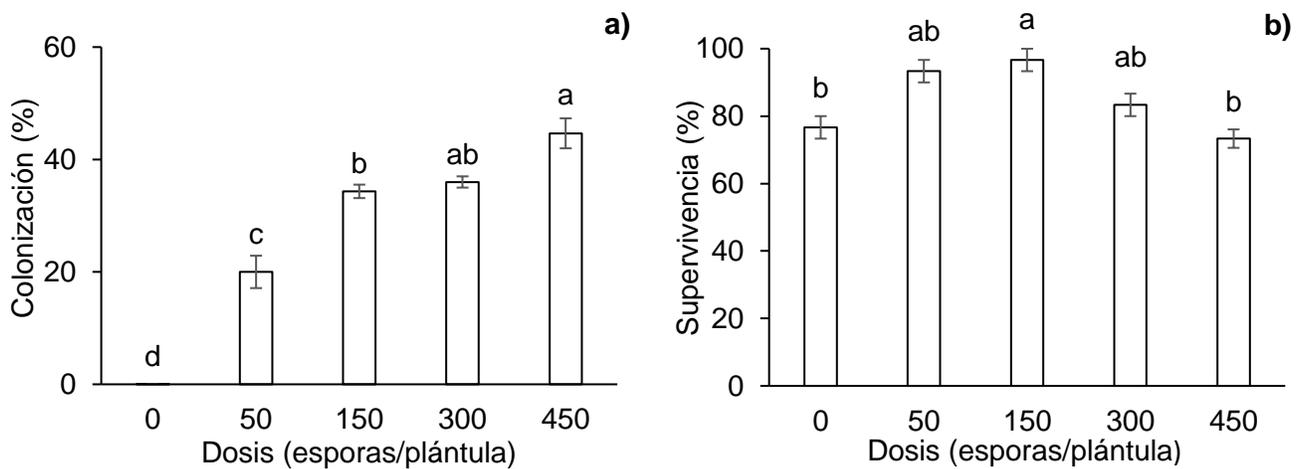
### **5.8 Análisis estadístico**

Se realizó una prueba estadística de análisis de varianza (comparación de medias) seguido de una prueba de Tukey (nivel de significancia  $p < 0.05$ ) utilizando el software estadístico SPSS Statistics V22.0 (Windows). Los datos porcentuales se transformaron con la fórmula  $Y = \arcseno(\sqrt{x / 100})$ , donde  $x$  es el valor porcentual.

## **VI RESULTADO**

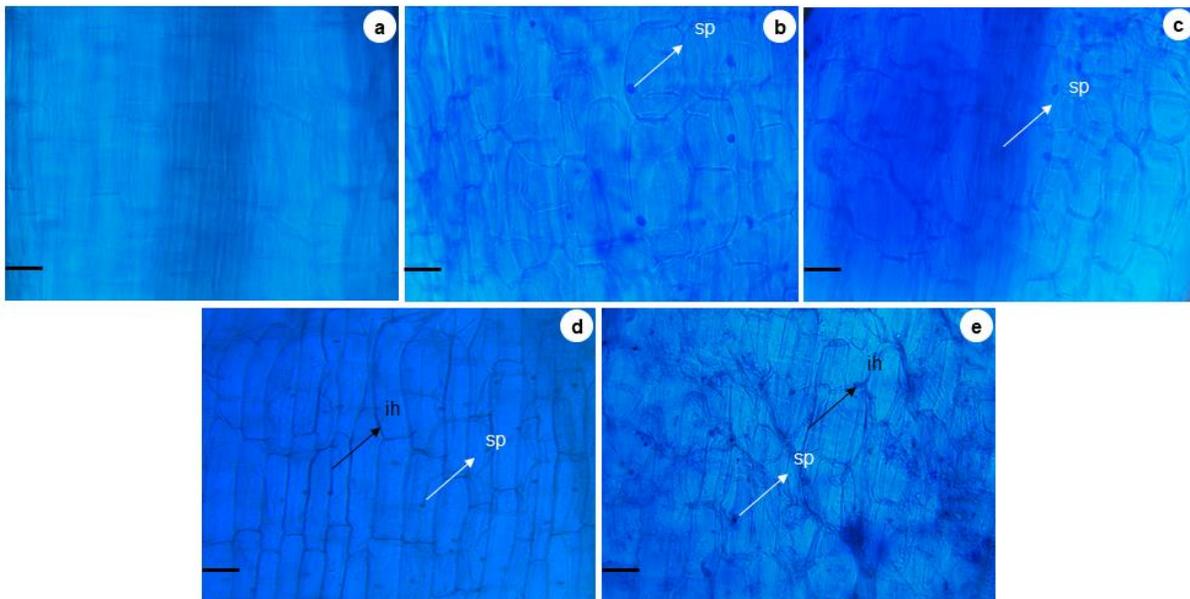
### **6.1 Porcentaje de supervivencia y colonización micorrízica**

Los resultados en este estudio muestran un efecto positivo de los HMA sobre el porcentaje de colonización de esporas y supervivencia de las plántulas *ex vitro* (Figura 8 a y b). La mayor colonización de esporas se obtuvo en las dosis de 450 esporas por plántula; y la menor con en el tratamiento control (Figura 8a). Respecto a la supervivencia, el mayor porcentaje se obtuvo en la dosis de 150 esporas por plántula que es el 96.6%; mientras que el menor porcentaje de supervivencia se registró con el tratamiento control y con la dosis de 450 esporas por plántula; 76.6 y 73.3%, respectivamente. La diferencia fue significativa (Figura 8b). Una colonización mayor al 36 % es nociva (afecta a supervivencia) para las plántulas.



**Figura 8.** Efecto del hongo micorrízico arbuscular (*Glomus intraradices*) sobre a) colonización y b) supervivencia evaluados a los 60 días de cultivo *ex vitro* de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Se realizó una prueba estadística de análisis de varianza (ANDEVA). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ ).

En la Figura 9 se muestra la colonización de esporas de *G. intraradices* en raíces de plántulas de *S. rebaudiana*.



**Figura 9.** Colonización por *Glomus intraradices* en raíces de plántulas de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) *ex vitro* a los 60 días después de la inoculación con esporas: a) plántulas no micorrizadas; b) 50 esporas por plántula; c) 150 esporas por plántula; d) 300 esporas por plántula; y e) 450 esporas por plántula. Estructuras típicas de hongos, como hifas intracelulares (ih); esporas (sp). Barras negras = 100  $\mu$ m.

## 6.2 Efecto micorrízico sobre el desarrollo *ex vitro*

Al medir el efecto de *G. intraradices* sobre las variables de desarrollo en plántulas de *S. rebaudiana*, se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los diferentes tratamientos de dosis de esporas por plántula (Cuadro 7 y Figura 10). Para la variable altura, las plántulas de mayor altura se obtuvieron con el tratamiento de 150 esporas por plántula; y la menor altura con el control. Respecto a la variable número de hojas, la mayor cantidad se encontró en los tratamientos con 50 y 150 esporas por plántula; y el menor número de hojas con el tratamiento control. En cuanto al número de raíces por plántula, la mayor cantidad se obtuvo en la aplicación de 150 esporas por plántula; mientras que la menor cantidad de raíces se observó en el control. La longitud de la raíz fue significativamente mayor en los tratamientos donde se aplicaron HMA (50, 150, 300 y 450 esporas por plántula), respecto al tratamiento control (plántulas no micorrizadas) que mostró la menor longitud de raíz (Figura 11).

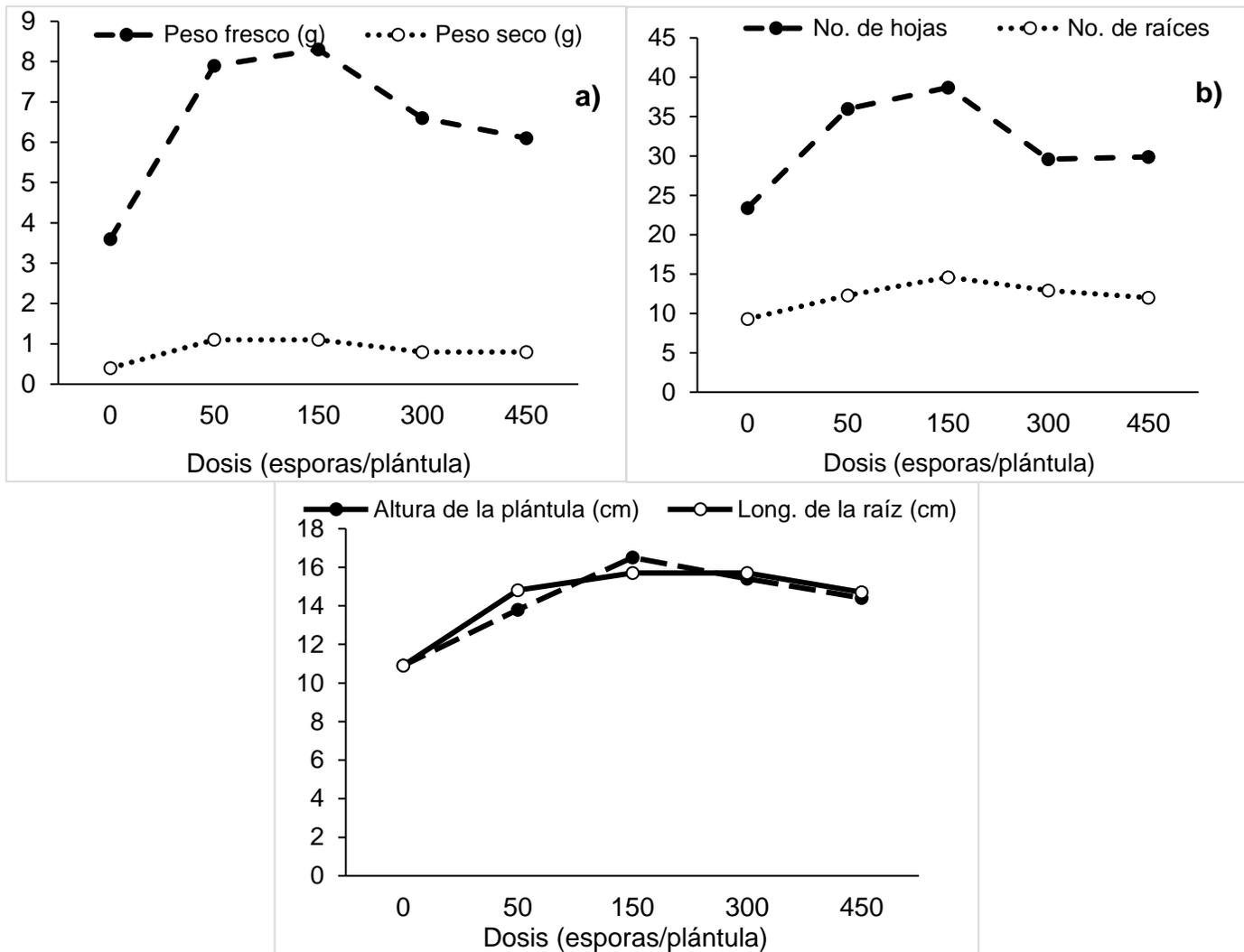
En cuanto a las variables de biomasa, los mayores pesos frescos y secos se tuvieron en las dosis de 50 y 150 esporas por plántula; mientras que el menor peso fresco y seco se obtuvo con el tratamiento control. En ambas variables, los valores fueron significativamente mayores en todos los tratamientos donde se aplicaron HMA (50, 150, 300 y 450 esporas por plántula), respecto al tratamiento control. El mayor desarrollo de *S. rebaudiana*, se logró con la dosis óptima de 150 esporas por plántula, logrando mayor altura, mayor número de hojas y raíces, en relación a los otros tratamientos y el control; mientras que los tratamientos micorrizados mostraron la mayor longitud de raíces.

**Cuadro 7.** Efecto del hongo micorrízicos arbuscular (*G. intraradices*) sobre variables de desarrollo en plántulas de estevia (*S. rebaudiana* Bertoni) durante la etapa de aclimatización.

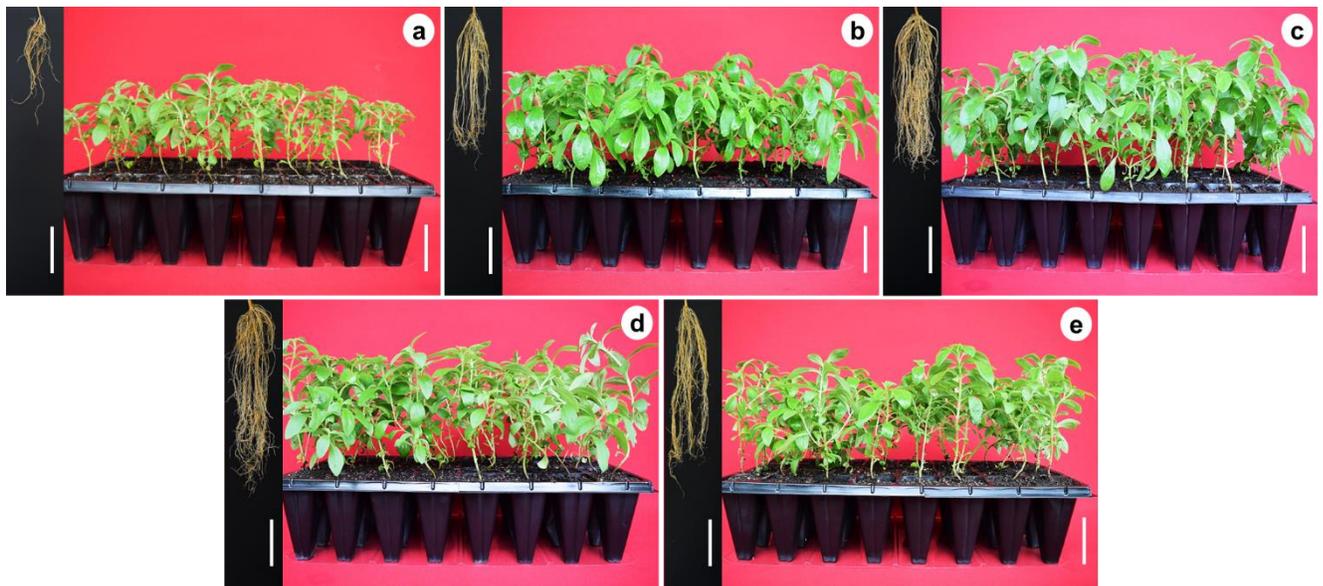
| Dosis HMA (esporas/plántula) | Altura (cm)              | No. de hojas            | No. de raíces por plántula | Longitud de la raíz (cm) | Peso fresco (g)         | Peso seco (g)          |
|------------------------------|--------------------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|
| 0                            | 10.9 ± 0.5 <sup>c</sup>  | 23.4 ± 1.4 <sup>c</sup> | 9.3 ± 0.5 <sup>c</sup>     | 10.9 ± 0.5 <sup>b</sup>  | 3.6 ± 0.3 <sup>c</sup>  | 0.4 ± 0.0 <sup>c</sup> |
| 50                           | 13.8 ± 0.5 <sup>b</sup>  | 36.0 ± 1.3 <sup>a</sup> | 12.3 ± 0.8 <sup>b</sup>    | 14.8 ± 0.5 <sup>a</sup>  | 7.9 ± 0.6 <sup>a</sup>  | 1.1 ± 0.1 <sup>a</sup> |
| 150                          | 16.5 ± 0.4 <sup>a</sup>  | 38.7 ± 2.0 <sup>a</sup> | 14.6 ± 0.5 <sup>a</sup>    | 15.7 ± 0.5 <sup>a</sup>  | 8.3 ± 0.4 <sup>a</sup>  | 1.1 ± 0.1 <sup>a</sup> |
| 300                          | 15.4 ± 0.5 <sup>ab</sup> | 29.6 ± 1.4 <sup>b</sup> | 12.9 ± 0.4 <sup>ab</sup>   | 15.7 ± 0.5 <sup>a</sup>  | 6.6 ± 0.3 <sup>ab</sup> | 0.8 ± 0.1 <sup>b</sup> |
| 450                          | 14.4 ± 0.5 <sup>b</sup>  | 29.9 ± 1.4 <sup>b</sup> | 12.0 ± 0.4 <sup>b</sup>    | 14.7 ± 0.4 <sup>a</sup>  | 6.1 ± 0.4 <sup>b</sup>  | 0.8 ± 0.1 <sup>b</sup> |

Los valores representan la media ± error estándar. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ ).

En esta etapa de aclimatización la dosis que mejor respondió al cultivo estevia fue a dosis de 150 esporas por plántula, lo que podría deberse al efecto beneficioso de la micorriza al proporcionar mayor absorción de agua y nutrientes ayudando a las plántulas a adaptarse mejor al estrés del trasplante y a los patógenos de las raíces (Parkash *et al.*, 2011). A dosis de 300 y 450 esporas por plántula, tuvieron efectos negativos sobre la supervivencia, de acuerdo a Wu *et al.*, (2021) determinaron que a dosis altas de inoculante micorrízico no son apropiadas para el establecimiento de una interacción simbiótica entre los HMA y las raíces de las plántulas debido a un efecto tóxico del hongo sobre la planta que puede afectar la supervivencia y desarrollo.



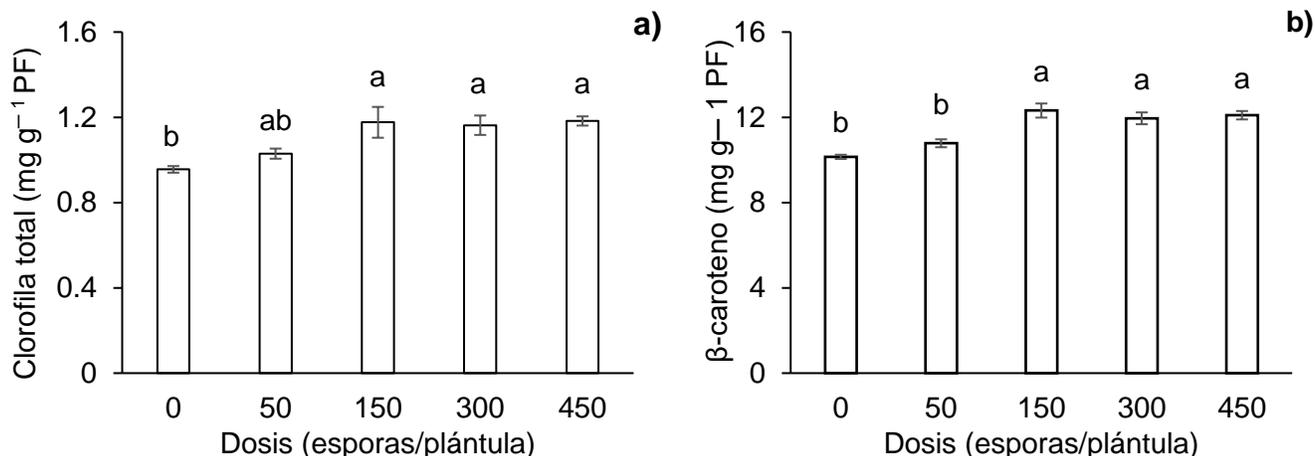
**Figura 10.** Efecto del hongo micorrízico arbuscular (*Glomus intraradices*) sobre variables de desarrollo en plántula de estevia (*S. rebaudiana* Bertoni) durante la etapa de aclimatización. a) peso seco y fresco de la plántula, b) número de hojas y raíces por plántula, y c) altura de la plántula y longitud de la raíz.



**Figura 11.** Efecto de hongo micorrízico arbuscular (*Glomus intraradices*) sobre el desarrollo *ex vitro* de plántulas de estevia (*S. rebaudiana* Bertoni) durante la etapa de aclimatización. a) plántulas no micorrizadas; b) 50 esporas por plántula; c) 150 esporas por plántula; d) 300 esporas por plántula; y e) 450 esporas por plántula. Barras blancas = 5 cm.

### 6.3 Clorofila total y carotenoides

Al analizar el efecto de *G. intraradices* sobre el contenido de clorofila total y carotenoides de *S. rebaudiana* se encontraron diferencias entre tratamientos (Figura 12). El mayor contenido de clorofila se determinó con los tratamientos de 150, 300 y 450 esporas por plántula; y la menor concentración en el tratamiento control (Figura 12a). Para el contenido de carotenoides, el valor más alto se determinó en los tratamientos de 150, 300 y 450 esporas por plántula; mientras que los valores significativamente menores se tuvieron en los tratamientos de 0 y 50 esporas por plántula (Figura 12b).



**Figura 12.** Efecto del HMA (*Glomus intraradices*) sobre el contenido de: a) clorofila total; y b)  $\beta$ -caroteno de plántulas de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) durante la etapa de aclimatación. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ ).

#### 6.4 Contenido de macro y micronutrientos

Se registró un efecto de los HMA sobre el contenido de nutrientes, a excepción del B y K (Cuadro 8). Para los macronutrientos N y P, el mayor contenido se encontró en los tratamientos con 50 y 150 esporas por plántula. El menor contenido de N se determinó en el tratamiento control; mientras en P el menor contenido se tuvo en el tratamiento control, y en los tratamientos con 300 y 450 esporas por plántula. El K mostró diferencias estadísticas significativas entre el control y todos los tratamientos con micorrizas (50, 150, 300 y 450 esporas). El valor más alto se presentó en el tratamiento control, y el valor más bajo con 450 esporas por plántula. Para el caso de Ca, los contenidos más altos se obtuvieron en los tratamientos con 50 y 150 esporas por plántula; mientras que el menor contenido se tuvo en la dosis de 450 esporas por plántula. Las concentraciones de Mg oscilaron entre  $3.04 \text{ mg kg}^{-1}$  peso seco y  $4.56 \text{ mg kg}^{-1}$  peso seco. El mayor contenido se tuvo en el tratamiento de 150 esporas por plántula, y el menor en el tratamiento control. Respecto a los micronutrientos, los contenidos de Fe y Zn en los tratamientos con micorrizas fueron significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) a los obtenidos en el tratamiento control. Para el Cu, las concentraciones más altas se encontraron en los tratamientos con 0, 50 y 150 esporas por plántula, siendo estos valores significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) que los obtenidos en 300 y 450 esporas por plántula. Para el caso de Mn, el

mayor contenido se obtuvo en las dosis de 50 y 150 esporas por plántula; mientras que el menor contenido de este nutrimento se obtuvo en el tratamiento control. El B fue el único nutrimento que no mostró diferencias significativas entre tratamientos. A dosis de 50 esporas (HMA) por plántula los macronutrientos de N, P, Ca y Mn en las hojas fueron mayores. En plántulas inoculadas con HMA, los micronutrientos de Fe y Zn fueron mayores. El Mg aumenta en las hojas a dosis mayor e igual de 150 esporas por plántula. El Cu es mayor en el control y en a dosis de 50 y 150 esporas de HMA por plántula. El K disminuye en las hojas cuando las plántulas son inoculadas con HMA. El B no tuvo diferencia entre el control y tratamientos con HMA.

**Cuadro 8.** Efecto del hongo micorrízico arbuscular (*Glomus intraradices*) sobre el contenido de macronutrientos y micronutrientos de plántulas de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) *ex vitro* durante la etapa de aclimatización a los 60 días de cultivo.

| HMA<br>(esporas/<br>plántula) | Macronutrientos (g kg <sup>-1</sup> peso seco)  |                           |                           |                           |                           |
|-------------------------------|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                               | N   | P                         | K                         | Ca                        | Mg                        |
| 0                             | 25.86 ± 0.90 <sup>c</sup>                       | 2.89 ± 0.11 <sup>b</sup>  | 16.44 ± 1.10 <sup>a</sup> | 4.39 ± 0.12 <sup>b</sup>  | 3.04 ± 0.11 <sup>c</sup>  |
| 50                            | 42.68 ± 1.50 <sup>a</sup>                       | 4.10 ± 0.16 <sup>a</sup>  | 11.46 ± 1.32 <sup>b</sup> | 4.99 ± 0.08 <sup>a</sup>  | 3.59 ± 0.23 <sup>bc</sup> |
| 150                           | 44.65 ± 1.04 <sup>a</sup>                       | 4.44 ± 0.24 <sup>a</sup>  | 8.93 ± 1.10 <sup>b</sup>  | 5.04 ± 0.13 <sup>a</sup>  | 4.56 ± 0.20 <sup>a</sup>  |
| 300                           | 32.09 ± 1.07 <sup>b</sup>                       | 3.03 ± 0.17 <sup>b</sup>  | 8.21 ± 0.21 <sup>bc</sup> | 4.06 ± 0.07 <sup>bc</sup> | 4.13 ± 0.31 <sup>ab</sup> |
| 450                           | 32.94 ± 1.08 <sup>b</sup>                       | 2.84 ± 0.12 <sup>b</sup>  | 5.13 ± 0.33 <sup>c</sup>  | 3.91 ± 0.12 <sup>c</sup>  | 4.15 ± 0.28 <sup>ab</sup> |
|                               | Micronutrientos (mg kg <sup>-1</sup> peso seco) |                           |                           |                           |                           |
|                               | Fe  | Cu                        | Zn                        | Mn                        | B                         |
| 0                             | 67.12 ± 3.13 <sup>b</sup>                       | 9.88 ± 0.90 <sup>a</sup>  | 45.85 ± 1.93 <sup>b</sup> | 48.44 ± 1.96 <sup>c</sup> | 37.92 ± 1.81 <sup>a</sup> |
| 50                            | 86.60 ± 2.52 <sup>a</sup>                       | 9.70 ± 0.52 <sup>a</sup>  | 60.80 ± 2.81 <sup>a</sup> | 90.66 ± 5.88 <sup>a</sup> | 31.83 ± 1.45 <sup>a</sup> |
| 150                           | 89.42 ± 4.20 <sup>a</sup>                       | 10.30 ± 0.76 <sup>a</sup> | 61.89 ± 2.05 <sup>a</sup> | 96.14 ± 4.25 <sup>a</sup> | 37.28 ± 1.89 <sup>a</sup> |
| 300                           | 83.82 ± 2.95 <sup>a</sup>                       | 6.85 ± 0.16 <sup>b</sup>  | 57.85 ± 2.04 <sup>a</sup> | 67.74 ± 2.99 <sup>b</sup> | 31.53 ± 1.89 <sup>a</sup> |
| 450                           | 95.33 ± 2.52 <sup>a</sup>                       | 7.15 ± 0.27 <sup>b</sup>  | 56.36 ± 2.87 <sup>a</sup> | 70.20 ± 3.52 <sup>b</sup> | 31.06 ± 1.50 <sup>a</sup> |

Los valores representan la media ± error estándar. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey,  $p < 0.05$ ).

## VII DISCUSIÓN

### 7.1 Efecto de las micorrizas sobre el desarrollo *ex vitro*

Los resultados obtenidos demuestran el efecto de diferentes dosis de micorrizas sobre las variables de desarrollo evaluadas. La dosis recomendada por plántula es de 150 esporas. El efecto positivo de esta dosis sobre el desarrollo podría deberse a que con el 34% de colonización se logra una adecuada interacción simbiótica, lo que pudo favorecer procesos fisiológicos de la planta como la eficiencia fotosintética y la absorción de

nutrimentos. Esta condición permitió un crecimiento adecuado de la plántula en sus primeras etapas de desarrollo y demostró un efecto sobre la supervivencia.

Los efectos fisiológicos positivos y de supervivencia en plantas inoculadas con HMA han sido reportados en especies como caña gigante (*Arundo donax* L.) (Tauler y Baraza, 2015), maíz (*Zea mays* L.) (Fasusi *et al.*, 2021), estevia (*Stevia rebaudiana*) (Zewail *et al.*, 2021), chile poblano (*Capsicum annum*) (Almaraz-Suárez *et al.*, 2021) y lechuga (*Lactuca sativa* L.) (Rasouli *et al.*, 2022). Sin embargo, los efectos de las micorrizas en el desarrollo dependen de la especie del hongo, la dosis de HMA y la especie de planta huésped (Wang *et al.*, 2020; De Oliveira *et al.*, 2022). Tauler y Baraza (2015) encontraron, en plantas de *A. donax* inoculadas con *Glomus intraradices* y *Glomus mosseae* (dosis de 125 esporas por planta) un aumento del crecimiento y la supervivencia del 100% durante la etapa de aclimatización. Almaraz-Suárez *et al.* (2021) observaron un aumento significativo de la biomasa seca en plantas *C. annum* inoculadas con un consorcio de HMA (*Funnelformis geosporum* y *Claroideoglomus* sp.) a una dosis de 477 esporas por planta. Rasouli *et al.* (2022) obtuvieron en plantas de *L. sativa* inoculadas con *Glomus mossae* y *Ascophyllum nodosum*, un mayor número de hojas, peso fresco y seco de raíces y peso seco de hojas, en comparación con el testigo. Hijri (2016) en papa (*Solanum tuberosum*) obtuvo un aumento en el rendimiento al inocular con *Rhizophagus irregularis* a una dosis de 70 esporas por semilla. En este sentido, Sales *et al.* (2018) señalan que la inoculación de HMA influye en la acumulación de biomasa aérea y radicular.

Recientemente, Moreno-Hernández *et al.* (2022) mencionan que el efecto negativo sobre el desarrollo a las dosis más altas de micorriza podría deberse a una interrupción de la simbiosis ocasionada por la colonización excesiva en la raíz. Harrison (2005) menciona que los HMA son biótrosos obligados que viven simbióticamente en las raíces de las plantas; habitan en las células corticoides de la raíz y obtienen carbono (C) de la planta huésped. Los HMA transfieren nutrientes del suelo a la raíz de las plantas, promueven la conducción de agua, contribuyen a un aumento en la tasa fotosintética, fortalecen el sistema de defensa contra agentes patógenos, aumentan el índice de tolerancia al estrés abiótico y promueve la síntesis de hormonas de crecimiento del tipo auxinas, citoquininas

y giberelinas (Khalil *et al.*, 2011; Giovannetti *et al.*, 2015; Tauler y Baraza, 2015; Diagne *et al.*, 2020).

En este estudio, los brotes obtenidos *in vitro* se desarrollaron en condiciones de cultivo con el medio MS, a partir de la adsorción de carbohidratos, nutrimentos y vitaminas, con un comportamiento fotomixotrófico, pasando de condiciones heterótrofas a autótrofas durante la etapa de aclimatización. Probablemente, al mejorar la capacidad de fijación de CO<sub>2</sub> a través de micorrizas, se podría facilitar el autotrofismo para contribuir a la supervivencia y desarrollo en la fase de aclimatización. Los HMA pueden contribuir a un ajuste o acoplamiento a las condiciones ambientales *ex vitro*. Aunado a ello, Branco *et al.* (2022) mencionan que los HMA pueden conferir a las plantas mecanismos de tolerancia al estrés, permitiéndoles prosperar bajo condiciones adversas.

## **7.2 Contenido de clorofila total y carotenoides**

En todos los tratamientos con micorrizas presentaron un incremento en el contenido de clorofila. La acumulación de clorofila en plántulas inoculadas con micorrizas ha sido reportada en varias especies como cebada (*Hordeum vulgare* L.) (Hajiboland *et al.*, 2019), maíz (*Zea mays*) (Sun *et al.*, 2021), sandía (*Citrullus lanatus* L. cv. Qilin) (Wu *et al.*, 2021), lechuga (*Lactuca sativa* L.) (Yan *et al.*, 2021), salvia (*Salvia officinalis* L.) (Ostadi *et al.*, 2022) y caña de azúcar (*Saccharum* spp.) (Juntahum *et al.*, 2022). En un estudio realizado por Janah *et al.* (2021) en plantas de *S. rebaudiana* inoculadas con *Glomus* sp., *Sclerocystis* sp. y *Acaulospora* sp., a una dosis de 75, 45 y 5 esporas por planta, respectivamente, la colonización micorrízica aumentó la concentración de pigmentos fotosintéticos. De acuerdo a Wu *et al.* (2021) en *C. lanatus* observaron que, al utilizar un consorcio de micorrizas vegetales a una dosis de 300 esporas por planta, aumentó el contenido de clorofila y la tasa fotosintética. Sun *et al.* (2021) demostraron que al inocular plantas de *Z. mays* con *Funneliformis mosseae* a una dosis de 1000 esporas por planta, aumentó el contenido de clorofila y tasa fotosintética. Juntahum *et al.* (2022) al inocular plantas de *Saccharum* spp. con *Glomus* sp., *Rhizophagus clarus* y *Acaulospora denticulata* a una dosis de 100 esporas por planta, no encontraron diferencias en el contenido de clorofila. En este estudio, el aumento en el contenido total

de clorofila en dosis de 150, 300 esporas por plántula podrían estar relacionado con mayor actividad fotosintética como consecuencia de una colonización eficiente. De acuerdo a Baltazar-Bernal *et al.* (2022) la variación en el contenido de clorofila es un factor importante que determina indirectamente la capacidad fotosintética y, por lo tanto, el crecimiento de la planta.

En relación a los carotenoides, las plántulas de estevia mostraron un aumento a diferentes dosis de micorrizas, siendo mayor el contenido de carotenoides cuando las plántulas fueron tratadas con micorrizas 150, 300 y 450 esporas por plántula. La acumulación de carotenoides en plántulas inoculadas con micorrizas ha sido reportada en varias especies como sandía (*Citrullus lanatus* L.) (Ye *et al.*, 2019) y melón (*Cucumis melo*) (Meddich *et al.*, 2021). Ye *et al.* (2019) encontraron que en *C. lanatus* inoculado con *Funnelformis mosseae* a una dosis de 700 esporas por plántula, el contenido de carotenoides aumentó. Meddich *et al.* (2021) señalan que en *C. melo*, al utilizar un consorcio de micorrizas con *Glomus* sp. a una dosis de 44 esporas por planta, el contenido de carotenoides aumentó. De acuerdo con Sun *et al.* (2022), los carotenoides funcionan como captadores de luz para la fotosíntesis, absorbiendo energía luminosa y transfiriéndola a las clorofilas en un rango de absorción de 450 a 550 nm. Según Moreno-Hernández *et al.* (2022), un estado nutricional adecuado ocasionado por HMA promueve un aumento en el contenido de pigmentos fotosintéticos y la eficiencia fotosintética.

### **7.3 Caracterización micorrízica**

La caracterización de la interacción micorriza-estevia demostró una eficiente asociación simbiótica entre ambos simbioses a dosis de 150 esporas por plántula. Esta asociación se debe a que, en presencia de un huésped compatible, el hongo y la planta intercambian varias señales que inician el proceso celular simbiótico. Además, los HMA ofrecen a las plantas una ventaja mutualista. Sin embargo, un exceso de hifas como resultado del aumento de la colonización podría causar competencia por espacio, agua y nutrientes. Respecto al bajo porcentaje de colonización en dosis de 0 y 50 esporas por plantas pudo ser ocasionada por una baja esporulación y desarrollo de esporas. De acuerdo con Kiers

*et al.* (2000) las diferentes especies de HMA deben influir en la supervivencia, colonización y crecimiento de las diferentes especies de plantas hospederas. Liu *et al.* (2021) demostró que en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) inoculadas con *Funneliformis mosseae* a 200 esporas por planta, se promueve una mayor capacidad fotosintética, un 85.2% de colonización radicular y aumenta la absorción de nutrientes de las plantas (N, P y K). Moreno- Hernández *et al.* (2022) al inocular caña de azúcar con *Glomus intraradices* a dosis de 50 y 100 esporas por plántula, obtuvieron 30% y 58% de colonización, respectivamente, logrando mejorar el desarrollo de las plántulas. Sin embargo, Wu *et al.* (2022) argumenta que una dosis alta de inoculante micorrízico no es apropiada para el establecimiento de una interacción simbiótica entre los HMA y las raíces de las plantas debido a un efecto tóxico del hongo que podría afectar la supervivencia y desarrollo de la planta.

#### **7.4 Contenido de macro y micronutrientos**

La inoculación de HMA tuvo efecto sobre el contenido de macro y micronutrientos en las plántulas de estevia cultivadas *ex vitro*. Las dosis de 50 y 150 esporas por plántula aumentaron significativamente el contenido de P y N, esto podría deberse a la adecuada colonización de las raíces por los HMA que absorben estos nutrientes por las hifas extraradicales. El N es un macronutriente importante para el crecimiento de las plantas (Miransari, 2011), necesario para la síntesis de la clorofila (Shi *et al.*, 2022), aminoácidos, proteínas, paredes celulares, membranas y ácidos nucleicos (Guo *et al.*, 2022). De acuerdo con Reynolds *et al.* (2005) un mayor contenido de N en las plantas micorrizadas es consecuencia de una mejor nutrición. Mientras que, el P es un nutriente esencial para el crecimiento de las plantas y metabolismo de los ácidos nucleicos. Los HMA son capaces de secretar enzimas fosfatasas, que catalizan y liberan P para el beneficio de las plantas (Tshibangu *et al.*, 2020). En cuanto al K, el mayor contenido de este elemento se obtiene en las plántulas control. De acuerdo con Pallon *et al.* (2007), el potasio se acumula en cantidades significativas en las esporas de HMA. Olsson *et al.* (2008) demostraron que en las hifas fúngicas y las vesículas se tiene un alto contenido de potasio, donde estas últimas funcionan como un órgano de almacenamiento. El K es un

elemento esencial para la síntesis de proteínas y activas enzimas involucradas en el metabolismo de los carbohidratos (Hasanuzzaman *et al.*, 2018; Ali *et al.*, 2021), desempeña un papel importante en diversos estreses abióticos como la sequía, salinidad, toxicidad por metales y temperaturas altas o frías (Hasanuzzaman *et al.*, 2018). En cuanto al Ca y Mn, el mayor contenido se obtiene a dosis de 50 y 150 esporas por plántula. Esto pudo deberse a una eficiente colonización sin afectar la interacción ecológica. Respecto al bajo contenido de Ca, en 450 esporas por plántula pudo deberse a un exceso en la colonización, ocasionando competencia por este elemento. El Ca es un elemento principal esencial para las plantas, se requiere para funciones estructurales en la pared celular y las membranas (White y Broadley, 2003). El alto contenido Mg en dosis de 150 esporas por plántula podría atribuirse al aumento de clorofila en este tratamiento, que es un elemento esencial para la síntesis de clorofila. El contenido de Fe aumenta en las plántulas micorrizadas, ya que de acuerdo con Clark y Zeto (2000), las hifas producen sideróforos y crecen en mayores volúmenes de suelo, obteniendo acceso a más nutrimentos. El Fe juega un papel importante en la activación de varios sistemas enzimáticos como el de la hidrogenasa fumárica, catalasa, oxidasa y citocromos (Khalediyan *et al.*, 2021). En plántulas control y dosis de 50 y 150 esporas, aumentó el contenido de Cu. De acuerdo con Hristozkova *et al.* (2016); Merlos *et al.* (2016) la inoculación de HMA puede dificultar la absorción de metales pesados por las plantas. El Cu juega una función importante en la asimilación del CO<sub>2</sub> y producción de ATP (Marques *et al.*, 2018). El Cu constituye diversas proteínas como la plastocianina del sistema fotosintético, y el citocromo oxidasa de la cadena de transporte de electrones (Kumar *et al.*, 2021). Sin embargo, este elemento en exceso, puede intoxicación en las plantas (Fu *et al.*, 2022). El mayor contenido de Zn en plántulas tratadas con micorrizas se debió probablemente a que este micronutriente es puesto a disposición por las micorrizas. El Zn tiene varias funciones en las plantas, como el metabolismo de proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, lo que compromete no solo el rendimiento sino también a la calidad de las plantas (Bhantana *et al.*, 2022).

Cheng *et al.* (2022) al inocular naranjas Newhall navel (*Citrus sinensis* Osbeck cv. Newhall) con *D. versiformis* y *Diversispora spurca* a dosis de 9 600 esporas por árbol, observaron que la inoculación fúngica, mejoró la calidad externa de la fruta y aumentó el contenido de K, Mg y Mn con *D. versiformis* y el contenido de Cu, Zn, K y Mg con *D. spurca*, en comparación con los controles no inoculados. Moreno-Hernández *et al.* (2022) al inocular caña de azúcar con *G. intraradices* a dosis de 50 y 150 esporas por planta, encontraron un incremento en el contenido de Mg, Fe y Cu. De acuerdo a Allen (2011), la extensión de las hifas de los HMA, les permite obtener mayores nutrimentos del suelo.

En este estudio se observó que las diferentes dosis de HMA, tienen un efecto sobre el contenido de macro y micronutrientes. La deficiencia de algunos elementos en plántulas puede explicarse por una competencia, debido a que es una asociación obligada para el hongo, pero no para la planta. Los resultados obtenidos en este estudio tienen una importancia práctica en la fase de aclimatización durante la micropropagación. La inoculación de *G. intraradices* a diferentes dosis tienen un efecto sobre el porcentaje de colonización, supervivencia, crecimiento, contenido de clorofilas, carotenoides y el estado nutricional de las plántulas *ex vitro* de *S. rebaudiana*. La dosis de 150 esporas por plántula de HMA, con el 34% de colonización, mejoró el desarrollo y las diferentes variables fisiológicas evaluadas; mientras que, a dosis de 0 y 450 esporas por plántula, con 0 y 44% de colonización, respectivamente, se obtuvo una menor tasa de supervivencia y escaso desarrollo. Lo que confirma, que el efecto de los HMA sobre el crecimiento de la planta huésped depende del porcentaje de colonización micorrízica (Lotfi *et al.*, 2019).

Normalmente la aclimatización requiere de 6 semanas después de trasplantar los brotes de *in vitro* al invernadero. Durante este periodo, se inicia la infección de colonización de los HMA y los huéspedes. Aproximadamente a los 2 meses las plántulas de estevia tienen el tamaño adecuado en la aclimatización para el trasplante a campo. Por otra parte, los HMA, juegan un papel importante en la nutrición de las plántulas y mantenimiento de la fertilidad del suelo en los agroecosistemas, pero su supervivencia se puede ver afectada por diferentes prácticas agrícolas como el uso de productos

químicos agrícolas (fungicidas y pesticidas) ya que pueden afectar el crecimiento y estructuras miceliales de los HMA. Lo anterior, representaría una amenaza para las plántulas en su establecimiento simbiótico y el mantenimiento potencial micorrízico del suelo. Sin embargo, el empleo de los HMA en las plántulas de *Stevia rebaudiana* aumenta el contenido de P, esto podría deberse a la adecuada colonización de las raíces por los HMA que absorben estos nutrimentos por las hifas extraradicales.

### **7.5 Discusión general**

Se encontró que las diferentes dosis de HMA tienen efecto sobre el contenido de macro y micronutrimentos. La deficiencia de algunos elementos en plántulas puede explicarse debido a una posible competencia, ya que es una asociación obligada para el hongo, pero no para la planta. Los resultados en este estudio tienen una implicación práctica para la fase de aclimatización durante la micropropagación debido a la importancia de la inoculación temprana con micorrizas en las plántulas obtenidas *in vitro*. La supervivencia, colonización, desarrollo y fisiología en plántulas *ex vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni durante la etapa de aclimatización, tienen un efecto positivo al aplicar HMA (*Glomus intraradices*) al sustrato. Con la aplicación de HMA en el agroecosistema estevia se espera obtener plántulas vigorosas, rejuvenecidas con un adecuado sistema radicular, un mejor aprovechamiento de la fertilización y mayor supervivencia en campo. En campo se esperaba que la simbiosis de HMA represente una herramienta interesante para aumentar la producción y calidad del cultivo estevia; aumento en el crecimiento, especialmente la producción de biomasa seca de las hojas y el rendimiento de los glucósidos de esteviol, gracias a la mejora de la absorción de nutrimentos.

## **VIII CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS**

La primera hipótesis específica indica que: La endomicorriza (*G. intraradices*) adicionada al sustrato, tienen un efecto positivo en las variables de supervivencia de las plántulas, longitud de la plántula y raíz, número de ramas y raíces, número de hojas por rama, longitud de las ramas, peso fresco y seco de la plántula y raíz. Se encontraron diferencias importantes entre tratamientos inoculados con HMA en comparación con el control para

todas las variables. Siendo la dosis óptima de inoculación 150 esporas de HMA por plántula, para el porcentaje de supervivencia y variables de desarrollo. En base a lo anterior, la primera hipótesis específica se rechaza parcialmente.

La segunda hipótesis específica indica que: La aplicación de la endomicorriza (*G. intraradices*) incrementa el contenido de clorofila y carotenoides en plántulas *ex vitro* de estevia. Se encontraron diferencias significativas en el contenido de clorofila y carotenoides a dosis igual o mayor a 150 esporas de HMA por plántula. Ante esta situación, la segunda hipótesis no se rechaza.

La tercera hipótesis específica indica que: El uso de *G. intraradices* aumenta el contenido de nutrimentos en plántulas de estevia micorrizadas durante la aclimatización. La aplicación de HMA en algunos nutrimentos favorece el contenido en las hojas. A dosis de 50 esporas (HMA) por plántula los macronutrimentos de N, P, Ca y Mn en las hojas fueron mayores. En plántulas inoculadas con HMA, los micronutrimentos de Fe y Zn fueron mayores. El Mg aumenta en las hojas a dosis mayor e igual de 150 esporas por plántula. El Cu es mayor en el control y a dosis de 50 y 150 esporas de HMA por plántula. El K disminuye en las hojas cuando las plántulas son inoculadas con HMA. El B no tuvo diferencia entre el control y tratamientos con HMA. Ante esta situación, la tercera hipótesis no se rechaza parcialmente.

La cuarta hipótesis específica indica que: *G. intraradices* coloniza las raíces de estevia durante la aclimatización *ex vitro*. La aplicación de HMA en plántulas de estevia colonizan y aumenta su colonización a mayor cantidad de HMA. De acuerdo a lo anterior, la cuarta hipótesis no se rechaza.

## **IX CONCLUSIONES**

En los resultados se obtuvo información sobre la inoculación de *Glomus intraradices* a diferentes dosis sobre el porcentaje de colonización y supervivencia, crecimiento, contenido de clorofilas y carotenoides, y sobre el estado nutricional de las plántulas *ex vitro* de *Stevia rebaudiana* Bertoni durante la etapa de aclimatización. Los hongos micorrízicos arbusculares a dosis de 150 esporas por plántula, con el 34% de

colonización, mejoran el desarrollo de las plántulas y promovieron un incremento en el contenido de clorofilas y carotenoides sin afectar la supervivencia durante la aclimatización. Se demostró que diferentes dosis de esporas de hongos micorrízicos arbusculares por plántula tienen un efecto sobre la absorción de algunos nutrimentos. Las dosis de 300 y 450 esporas por plántula, que representan el mayor porcentaje de colonización, tuvieron efectos negativos sobre la supervivencia, el desarrollo y el estado nutricional de algunos elementos. La aplicación temprana de HMA a las plántulas de estevia durante la aclimatización podría representar una ventaja de preacondicionamiento antes del trasplante para el establecimiento en campo.

La siembra de plántulas micorrizadas en el agroecosistema estevia, puede ser una herramienta benéfica para el crecimiento de la planta, producción de biomasa seca de las hojas y el rendimiento de glucosidos de esteviol. Además, es necesario evaluar las condiciones edafo-climáticas, variedad de la estevia y el manejo del cultivo en el agroecosistema debido a que influyen en la morfología de la planta y concentración de glucósidos de esteviol.

#### X LITERATURA CITADA

- Aguilera, P., N. Ortiz, N. Becerra, A. Turrini, F. Gaínza-Cortés, P. Silva-Flores, A. Aguilar-Paredes, J.K. Romero, E. Jorquera-Fontena, MdLL. Mora, y F. Borie. 2022. Application of arbuscular mycorrhizal fungi in vineyards: water and biotic stress under a climate change scenario: new challenge for chilean grapevine crop. *Front. Microbiol.* 13:826571. Doi: [10.3389/fmicb.2022.826571](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.826571)
- Aguirre-Medina, J. F., F. O. Mina-Briones, J. Cadena-Iñiguez, y R. M. Soto-Hernández. 2018. Efectividad de biofertilizantes y brasinoesteroide en *Stevia rebaudiana* Bert. *Agrociencia.* 52(4): 609-621. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952018000400609&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952018000400609&lng=es&nrm=iso). ISSN 2521-9766
- Ahmad, J., I. Khan, R. Blundell, J. Azzopardi, y M.F. Mahomoodally. 2020. *Stevia rebaudiana* Bertoni.: an updated review of its health benefits, industrial applications and safety. *Trends Food Sci. Techol.* 100: 177-189. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.030>
- Ahmad, N., P. Khan, A. Khan, M. Usman, M. Ali, H. Fazal, y M.N. Durrishahwar, C. Hano, y B.H. Abbasi. 2022. Elicitation of submerged adventitious root cultures of *stevia rebaudiana* with *Cuscuta reflexa* for production of biomass and secondary metabolites. *Molecules.* 27(1): 14. <https://doi.org/10.3390/molecules27010014>

- Alam, M.Z., M. A. Hoque, G.J. Ahammed, y L. Carpenter-Boggs. 2019. Arbuscular mycorrhizal fungi reduce arsenic uptake and improve plant growth in *Lens culinaris*. PLOS ONE. 14(5): e0211-441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211441>
- Alcántar, G.G., y V.M. Sandoval. 1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal. In: Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo AC (ed) Publicación especial 10 Chapingo, México. p 156.
- Ali, S., M, Atig, S.T. Sahi, y M. Arshad. 2021. Mineral profiling of resistant and susceptible tomato varieties against *Alternaria solani* causing early blight. Pak. J. Agri. Sci. 58(4): 1315-1321. DOI: [10.21162/PAKJAS/21.675](https://doi.org/10.21162/PAKJAS/21.675)
- Al-Karaki, G. N., y M. Williams. 2021. Mycorrhizal mixtures affect the growth, nutrition, and physiological responses of soybean to water deficit. Acta Physiol. Plant. 43(5): 1-9. Doi:[10.1007/s11738-021-03250-0](https://doi.org/10.1007/s11738-021-03250-0).
- Allen, M. F. 2011. Linking water and nutrients through the vadose zone: a fungal interface between the soil and plant systems. J Arid Land. 3(3): 155-163. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1227.2011.00155>
- Allen, M. F., y Allen, M. F. 1991. The ecology of mycorrhizae. Cambridge University Press.
- Almaraz-Suárez, J., A. González-Mancilla, R. Ferrera-Cerrato, M. P. Rodríguez-Guzmán, O. R. Taboada-Gaytán, L. V. Hernández-Cuevas, A. Alarcón, y A. Trinidad-Santos. 2021. Arbuscular mycorrhizal fungi in the rhizosphere of native plants and their effect on poblano pepper growth. Rev. Fitotec. Mex. 44(4): 571-579. <https://doi.org/10.35196/rfm.2021.4.571>
- Al-Taweel, S. K., C. R. Azzam, K. A. Khaled, y R. M. Abdel-Aziz. 2021. Improvement of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) and steviol glycoside through traditional breeding and biotechnological approaches. Sabrao J. Breed. Genet. 53(1): 88-111.
- Amani Machiani, M., A. Javanmard, M.R. Morshedloo, M. Janmohammadi, y F. Maggi. 2021. Funneliformis mosseae Application improves the oil quantity and quality and eco-physiological characteristics of soybean (*Glycine max* L.) under water stress conditions. J. Soil Sci. Plant Nutr. 21(4): 3076-3090. <https://doi.org/10.1007/s42729-021-00590-1>
- Anchal, S., S. Bahuguna, Pal. P. K. Priti, D. Kumar, P. S. Murthy, y A. Kumar. 2021. Non-destructive method of biomass and nitrogen (N) level estimation in *Stevia rebaudiana* using various multispectral indices. Geocarto Int. 1-13. <https://doi.org/10.1080/10106049.2021.1939436>
- Arroyo Uriarte, P., L. Mazquiarian Bergera, P. Rodríguez Alonso, T. Valero Gaspar, E. Ruiz Moreno J. M. Ávila Torres, G. Varela Moreiras. 2018. Frutas y hortalizas: nutrición

y salud en la España del s. XXI. FEN.  
<http://www.fesnad.org/resources/files/Noticias/frutasYHortalizas.pdf>

- Ashley, K., D. Cordell, y D. Mavinic, D. 2011. A brief history of phosphorus: from the philosopher's stone to nutrient recovery and reuse. *Chemosphere*. 84(6): 737-746.
- Ashwell, M. 2015. Stevia, nature's zero-calorie sustainable sweetener: A new player in the fight against obesity. *Nut. Today*. 50(3): 129. Doi: [10.1097/NT.0000000000000094](https://doi.org/10.1097/NT.0000000000000094)
- Atakan, A., H. Ö. Özkaya, y Erdoğan, O. 2018. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on heavy metal and salt stress. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*. 6(11): 1569-1574.
- Badda, N., K. Yadav, A. Aggarwal, y N. Kadian. 2015. Consortium effect of arbuscular mycorrhizal fungi and pseudomonas fluorescens with various levels of superphosphate on growth improvement of cotton (*G. arboreum* L.). *J. Nat. Fibers*. 12(1): 12-25. <https://doi.org/10.1080/15440478.2013.879085>
- Baltazar-Bernal, O., J. L. Spinoso-Castillo, E. Mancilla-Álvarez, y J.J. Bello-Bello. 2020. Arbuscular Mycorrhizal Fungi Induce Tolerance to Salinity Stress in Taro Plantlets (*Colocasia esculenta* L. Schott) during Acclimatization. *Plants*. 11(13): 1780. <https://doi.org/10.3390/plants11131780>
- Barberá Herrero, A. 2017. Proyecto de instalación de riego localizado en un cultivo de *Stevia rebaudiana* en Albalat de la ribera (Valencia). Tesis doctoral en Ingeniería Agroalimentaria y del medio Rural, Univ. Politécnica de Valencia.
- Barquera, S., L. Hernández-Barrera, B. Trejo-Valdivia, T. Shamah, I. Campos-Nonato, Rivera- J. Dommarco. 2018. Obesity in Mexico, prevalence and trends in adults. *Salud Publica Mex*. 62(6):682-92. <https://doi.org/10.21149/11630>
- Basharat, S., Z. Huang, M. Gong, X. Lv, A. Ahmed, I. Hussain, y L. Lui. 2021. A review on current conventional and biotechnical approaches to enhance biosynthesis of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana*. *Chin. J. Chem. Eng*. 30: 92-104. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2020.10.018>
- Bayraktar, M. 2019. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni using RITA® bioreactor. *Hortsci*. 54(4): 725-731. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13846-18>
- Begum, N., M. A. Ahanger, Y. Su, Y. Lei, N. S. A. Mustafa, P. Ahmad, y L. Zhang. 2019. Improved drought tolerance by AMF inoculation in maize (*Zea mays*) involves physiological and biochemical implications. *Plants*. 8(12): 579. <https://doi.org/10.3390/plants8120579>
- Benimeli, M. F., R. Corbella, D. A. Guevara, A. Sanzano. F. A. Sosa. 2019. El nitrógeno del suelo. Facultad de Agronomía y Zootecnia. Universidad Nacional de Tucumán. pp 11. [El nitrogeno del suelo 2019.pdf](#)

- Bhantana, P., M.G. Moussa, R. Malla, D. Khadka, S.P. Vista. R.K. Shrestha, y C.X. Hu. 2022. Foliar versus soil biofortification of Zn in citrus (*Citrus reticulata* Blanco) effect on mineral nutrition and fruit yield and quality. Biomed. J. Sci. Tech. Res. 41(3): 32755-32568. DOI: [10.26717/BJSTR.2022.41.006612](https://doi.org/10.26717/BJSTR.2022.41.006612)
- Bhantana, P., M.S. Rana, X. C. Sun, M.G. Moussa, M.H. Saleem, M. Syaifundin, y C. X. Hu. 2021. Arbuscular mycorrhizal fungi and its major role in plant growth, zinc nutrition, phosphorous regulation and phytoremediation. Symbiosis. 84(1): 19-37. <https://doi.org/10.1007/s13199-021-00756-6>
- Biehler E., F. Mayer, L. Hoffmann., E. Krause, y T. Bohn. 2010. Comparison of 3 spectrophotometric methods for carotenoid determination in frequently consumed fruits and vegetables. J. Food Sci. 75: C55–C61. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01417.x>
- Blee, K. A. 1997. Patterns of root colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and host plant responses. Utah State University. pp 141.
- Branco, S., A. Schauster, H.L. Liao, y J. Ruytinx. 2022. Mechanisms of stress tolerance and their effects on the ecology and evolution of mycorrhizal fungi. New Phytol. 235(6): 2158-2175. <https://doi.org/10.1111/nph.18308>
- Bremner, J. T. 1965. Inorganic forms of nitrogen. In Methods of soil analysis: part 2. Chemical and microbiological properties; John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA. 9, 1179–1237. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.c33>
- Brundrett, M., N. Bougher, B. Dell, T. Grove, N. Malajczuk. 1996. Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.
- Brunetto, G., Rosa, D. J., Ambrosini, V. G., Heinzen, J., Ferreira, P. A., Ceretta, C. A., and Tiecher, T. L. 2019. Use of phosphorus fertilization and mycorrhization as strategies for reducing copper toxicity in young grapevines. Sci. Hortic. 248: 176-183. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.026>
- Bohórquez, J. E. T. 1993. La teoría general de sistemas. Cuadernos de Geografía: Revista colombiana de geografía. 4(1): 111-137. [La teoría general de sistemas - Dialnet \(unirioja.es\)](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.026)
- Bordeleau, L. M., y D.1994. Prévost. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. Plant Soil. 161: 115-125. <https://doi.org/10.1007/BF02183092>
- Borgo, J., L. C. Laurella, F. Martini, C.A. Catalán, y V.P. Sülsen. 2021. *Stevia* genus: Phytochemistry and biological activities update. Molecules. 26 (9): 2733. <https://doi.org/10.3390/molecules26092733>
- Brundrett, M. 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. Biol. Rev. 79 (3): 473-495. <https://doi.org/10.1017/S1464793103006316>

- Burgess, T., B. Dell y N. Malajczuk. 1994. Variations in mycorrhizal development and growth stimulation by 20 *Pisolithus* Diversity and classification of mycorrhizal associations 489 isolates inoculated on to *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. *New Phytol.* 127: 731–739.
- Büyük, G., C. A. Bayram, M. Kırpık, y M. İnan. 2022. Agronomic performance and nutrient content of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) in different semi-arid locations. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 53(7): 848-861. <https://doi.org/10.1080/00103624.2022.2028819>
- Bücking, H., y A. Kafle. 2015. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in the nitrogen uptake of plants: current knowledge and research gaps. *Agronomy.* 5(4): 587-612. <https://doi.org/10.3390/agronomy5040587>
- Camarena-Gutiérrez, G. 2012. Interacción planta-hongos micorrízicos arbusculares. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente* 18(3): 409-421. Doi:10.5154/r.rchscfa.2011.11.093.
- Carrascal, R. H. 2016. Manual de cultivo de la stevia para agricultores (No. Bajados de internet/2015). Asociación Española de la *Stevia Rebaudiana*.
- Cardoso, I. M., y T. W. Kuyper. 2006. Mycorrhizas and tropical soil fertility. *Agric Ecosyst Environ.* 116(1-2): 72-84. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2006.03.011>
- Casanova-Pérez, L., J. P. Martínez-Dávila, S. López-Ortiz, C. Landeros-Sánchez, y G. López-Romero. 2018. Climate change communication between farmers and adaptation strategies in agroecosystems of the mexican sub-humid tropics. *Trop. Subtrop. Agroecosystems.* 21(2): 189-198.
- Castañeda-Saucedo, M. C., E. Tapia-Campos, J. D. P. Ramírez-Anaya, y J. Beltrán. 2020. Growth and development of stevia cuttings during propagation with hormones in different months of the year. *Plants.* 9(3): 294. <https://doi.org/10.3390/plants9030294>
- Cauich-Cauich, R. A., J.M. Tun-Suárez, E. de los Á. Herrera-Parra, J. Cristóbal-Alejo, y M. G. Lozano-Contreras. 2022. Arbuscular mycorrhizal symbiosis as sustainable alternative in the *Stevia rebaudiana* Bertoni production. *Agro Productividad.* 15(1): 59-67. <https://doi.org/10.32854/agrop.v15i1.20937>
- Cavagnaro, T. R., S. F. Bender, H. R. Asghari, y M. G. Van der Heijden. 2015. The role of arbuscular mycorrhizas in reducing soil nutrient loss. *Trends Plant Sci.* 20 (5): 283-290. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.03.004>
- Chandrasekaran, M., T. Boopathi, y P. Manivannan. 2021. Comprehensive assessment of ameliorative effects of AMF in alleviating abiotic stress in tomato plants. *J. Fungi.* 7(4): 303. <https://doi.org/10.3390/jof7040303>
- Chen, D., y H. W. Chen. 2013. Uso de la clasificación de Köppen para cuantificar la variación y el cambio climático: un ejemplo para 1901-2010. *Desarrollo ambiental.* 6: 69-79.

- Cheng, X. F., M. M. Xie, Y. Li, B. Y. Liu, C. Y. Liu, Q. S. Wu, K. Kuča, 2022. Effects of field inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and endophytic fungi on fruit quality and soil properties of Newhall navel orange. *Appl. Soil Ecol.* 170: 104308. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104308>
- Choi, J., W. Summers y U. Paszkowski. 2018. Mechanisms underlying establishment of arbuscular mycorrhizal symbioses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 56: 135-160. DOI: [10.1146/annurev-phyto-080516-035521](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035521)
- Clapperton. M. J. y D. J. Read. 1992. A relationship between plant growth and increasing VAM mycorrhizal inoculum density. *New Phytol.* 120: 227–234.
- Clark, R. Á., y S. K. Zeto. 2000. Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *J. Plant Nutr.* 23(7): 867-902. <https://doi.org/10.1080/01904160009382068>
- Clemente, C., L. G. Angelini, R. Ascrizzi, y S. Tavarini. 2021. *Stevia rebaudiana* (Bertoni) as a multifunctional and sustainable crop for the mediterranean climate. *Agriculture.* 11(2):123. <https://doi.org/10.3390/agriculture11020123>
- CONACyt-Sistemas Socioecológicos y Sustentabilidad, 2022. <https://conacyt.mx/pronaces/pronaces-sistemas-socioecologicos/>
- Cordell, D., y S. White. 2011. Peak phosphorus: clarifying the key issues of a vigorous debate about long-term phosphorus security. *Sustainability.* 3(10): 2027-2049. <https://doi.org/10.3390/su3102027>
- Cui, N., L. Shi, J. Guo, y T. Zhang. 2021. Arbuscular mycorrhizal fungi alleviate elevated temperature and nitrogen deposition-induced warming potential by reducing soil N<sub>2</sub>O emissions in a temperate meadow. *Ecol. Indic.* 131: 108193. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.108193>
- Da Silva, F. A., E. V. D. S. B. Sampaio, F. S. B. Da Silva, y L. C. Maia. 2021. Use of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus for increase in the concentration of compounds with antioxidant activity in *Libidibia ferrea*. *Res., Soc. Dev.* 10(4): e13010413827-e13010413827.
- Dalla Costa, M., T.D. Rech, S. Primieri, B.G. Pigozzi, S.S. Werner, y S. L. Stürmer. 2021. Inoculation with isolates of arbuscular mycorrhizal fungi influences growth, nutrient use efficiency and gas exchange traits in micropropagated apple rootstock 'Marubakaido'. *PCTOC.* 145(1): 89-99. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01994-0>
- Daza, M., A. Jurado, y V. Torres. 2015. Efecto de aplicación de diferentes láminas de riego en estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) bajo invernadero. *Temas Agrarios.* 20: 81-90.
- De Oliveira, B. G., J. L. N. Carvalho, C. E. P. Cerri, C.C. Cerri, y B. J. Feigl. 2013. Soil greenhouse gas fluxes from vinasse application in Brazilian sugarcane areas. *Geoderma* 200: 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2013.02.005>

- De Oliveira Júnior, J. Q., E. Da Conceição Jesús, R.C. De Souza, C. F, Da Silva, y M. G. Pereira. 2022. A mixture of arbuscular mycorrhizal fungi favors brazilian pepper seedlings under an intermediate level of soil phosphorus. *Rev. Caatinga*. 35(3): 641-648. <https://doi.org/10.1590/1983-21252022v35n315rc>
- De Souza Ferrari, M. P., R. M. S. Da Cruz, M. Dos Santos Queiroz, M. M. De Andrade, O. Alberton, y H. M. Magalhães. 2020. Efficient *ex vitro* rooting, acclimatization, and cultivation of *Curcuma longa* L. from mycorrhizal fungi. *J Crop Sci Biotechnol*. 23(5): 469-482. <https://doi.org/10.1007/s12892-020-00057-2>
- Dhawal, S., D. R. Sarkar, R. S. Yadav, M. Parihar, y Rakshit, A. 2016. Biopriming with arbuscular mycorrhizae for addressing soil fertility with special reference to phosphorus. *Int. j. bioresour. sci*. 3(2): 35-40. DOI: 10.5958/2454-9541.2016.00013.X
- Diagne, N., M. Ngom, P. I. Djighaly, D. Fall, V. Hocher, y S. Svistoonoff. 2020. Roles of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth and performance: importance in biotic and abiotic stressed regulation. *Divers*. 12(10): 370. <https://doi.org/10.3390/d12100370>
- Di Martino, C., A. Fioretto, D. Palmieri, V. Torino, y G. Palumbo. 2019. Influence of tomato plant mycorrhization on nitrogen metabolism, growth and fructification on P-limited soil. *J. Plant Growth Regul*. 38 (4): 1183-1195. DOI:10.1007/s00344-019-09923-y.
- Dorich, C. D., R. T. Conant, F. Albanito, K. Butterbach-Bahl, P. Grace, C. Scheer, V. O. Snow, I. Vogeler, T. J. VAan der Weerden. 2020. Improving N<sub>2</sub>O emission estimates with the global N<sub>2</sub>O database. *Curr. Opin. Environ. Sustain*. 47: 13–20. [doi:10.1016/j.cosust.2020.04.006](https://doi.org/10.1016/j.cosust.2020.04.006)
- Elnahal, A. S., M.T. El-Saadony, A. M. Saad, E.S.M. Desoky, A. M. El-Tahan, M. M. Rady, S.F. AbuQamar, y K. A. El-Tarabily. 2022. The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: A review. *Eur. J. Plant Pathol*. 162: 759-792. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02393-7>
- El-Ramady, H., N. Abdalla, Z. Fawzy, K. Badgar, X. Llanaj, G. Törös, P. Hajdú, Y. Eid, and J. Prokisch. 2022. Green Biotechnology of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus* L.): A Sustainable Strategy for Myco-Remediation and Bio-Fermentation. *Sustainability*. 14(6): 3667. <https://doi.org/10.3390/su14063667>
- El-Sawah, A. M., A. El-Keblawy, D. F. I. Ali, H. M. Ibrahim, M. A. El-Sheikh, A. Sharma, y M. S. Sheteiwy. 2021. Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria enhance soil key enzymes, plant growth, seed yield, and qualitative attributes of guar. *Agriculture*. 11(3): 194.
- El-Sherbeny, T. M. S., A. M. Mousa, y E. S. R. El-Sayed. 2022. Use of mycorrhizal fungi and phosphorus fertilization to improve the yield of onion (*Allium cepa* L.) plant. *Saudi J. Biol. Sci*. 29(1): 331-338. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.094>

- Espinosa-Leal, C. A., C.A. Puente-Garza, y S. García-Lara. 2018. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*. 248(1): 1-18. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
- Espitia, M., R. Montoya T., y B. Atencio S. 2009. Rendimiento de *Stevia rebaudiana* Bert. Bajo tres arreglos poblacionales en el Sinú medio. *Revista U. D. C. A. Actualidad y Divulgación Científica*. 12: 151-161.
- Etienne, H., D. Barry-Etienne, N. Vasquez, y M. Berthouly. 1999. Aportes de la biotecnología al mejoramiento genético del café: el ejemplo de la multiplicación por embriogénesis somática de híbridos F1 en América Central. In : *Desafíos de la caficultura en Centroamérica*. Bertrand Benoît (ed.), Rapidel Bruno (ed.). CIRAD-CP-CAFE, IRD, France-MAE, IICA-PROMECAFE, PROMECAFE, ICAFE-San José. San José : IICA, pp. 457-493. ISBN 92-9039-391-2
- Evans, D. G., y M. H. Miller. 1988. Vesicular-arbuscular mycorrhizas and the soil-disturbance-induced reduction of nutrient absorption in maize. I. Causal relations. *New Phytol.* 110: 67–74.
- Fasusi, O. A., A. E. Amoo, y O. O. Babalola. 2021. Propagation and characterization of viable arbuscular mycorrhizal fungal spores within maize plant (*Zea mays* L.). *J. Sci. Food and Agric.* 101(14): 5834-5841. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11235>
- Fehr, A. M. 2021. Sustainable food production with biostimulants: testing the effects of arbuscular mycorrhizal fungus *R. irregulare* and the bacteria *B. amyloliquifaciens* on plant growth and disease resistance. <https://digitalcollection.zhaw.ch/handle/11475/22876>
- Felföldi, Z., R. Vidican, V. Stoian, I. A. Roman, A. F. Sestras, T. Rusu, y R. E. Sestras. 2022. Arbuscular mycorrhizal fungi and fertilization influence yield, growth and root colonization of different tomato genotype. *Plants*. 11(13): 1743. <https://doi.org/10.3390/plants11131743>
- Feliciano, D., J. Recha, G. Ambaw, K. MacSween, D. Solomon, y E. Wollenberg. 2022. Assessment of agricultural emissions, climate change mitigation and adaptation practices in Ethiopia. *Climate Policy*. 22(4): 427-444. <https://doi.org/10.1080/14693062.2022.2028597>
- Fischer, G., W. Winiwarter, T. Ermolieva, C. Y. Cao, H. Qui, Z. Klimont., D. Wiberg., F. Waagner. 2010. Integrated modeling framework for assessment and mitigation of nitrogen pollution from agriculture: Concept and case study for China. *Agric. Ecosyst. Environ.* 136(1/2): 116–124.
- Flores González, A. 2019. Morfología y contenido de glucósidos de *Stevia rebaudiana* Bertoni y su relación con las condiciones edafo-climáticas y de manejo del cultivo (Master's thesis).

- Fors, R. O., O. J. Saggin, M. A. C. Carneiro, R. L. L. Berbara. 2020. Selection of arbuscular mycorrhizal fungi for sugarcane in four soils with the presence of dark septate endophytes. *Acta Scientiarum. Agronomy*. 42. Doi:10.4025/actasciagron.v42i1.42477.
- Fu, L., L. Zhang, P. Dong, J. Wang, L. Shi, C. Lian, y Y. Chen. 2022. Remediation of copper-contaminated soils using *Tagetes patula* L., earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi. *Int. J. Phytoremediation*. 24(10): 1107-1119. <https://doi.org/10.1080/15226514.2021.2002809>
- García, R. 2007. *Sistemas complejos. Conceptos, método y fundamentos epistemológicos de la investigación multidisciplinaria*. Ed. Gedisa, S.A. Buenos Aires. 200 pp.
- Gasmalla, M. A. A., R. Yang, A. Musa, X. Hua, W. Zhang. 2014. Physico-chemical assessment and rebaudioside A. Productivity of natural sweeteners (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *J. Food. Nutr. Res.* 2(5): 209-214. DOI:10.12691/jfnr-2-5-1
- Ghose, A. K., S. N. A. Abdullah, M. A. Md Hatta, P.E. Megat Wahab. 2022. *In vitro* regeneration of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) and evaluation of the impacts of growth media nutrients on the biosynthesis of Steviol Glycosides (SGs). *Agronomy*. 12(8): 1957. <https://doi.org/10.3390/agronomy12081957>
- Giovannetti, M., L. Avio, y C. Sbrana. 2015. Functional significance of anastomosis in arbuscular mycorrhizal networks. In: Horton, T. (eds). *Mycorrhizal Networks, Ecological Studies* 224. Springer, Dordrecht. pp. 41-67. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-7395-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-017-7395-9_2)
- Gómez-Kosky, R., D. Núñez J., C. Reyes E., A. Bernal V., M. Bermúdez C., P. Machado A., J. Álvarez F., E. Pineda, B. Kukurtcu, y D. D. Daniels. 2020. Effect of VIUSID Agro® and FitoMas-E® on the *ex vitro* acclimatization of sugarcane plants (*Saccharum* spp.) cultivar C90-469. *Sugar Tech.* 22(1): 42-51. <https://doi.org/10.1007/s12355-019-00752-7>
- Gruhn, P., F. Goletti, y M. Yudelman. 2000. Integrated nutrient management, soil fertility, and sustainable agriculture: current issues and future challenges. *Intl Food Policy Res Inst.*
- Guo, H., X. Pu, H. Jia, Y. Zhou, G. Ye, Y. Yang, T. Na, J. Wang. 2022. Transcriptome analysis reveals multiple effects of nitrogen accumulation and metabolism in the roots, shoots, and leaves of potato (*Solanum tuberosum* L.). *BMC Plant Biol.* 22(1): 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12870-022-03652-3>
- Gutiérrez, A., y Bermejo, P. 2015. *Bioquímica, farmacología y toxicología de Stevia rebaudiana* Bertoni. Tesis de maestría. Universidad Complutense.

- Hajiboland, R., A. Joudmand, N. Aliasghar zad, R. Tolrá, y C. Poschenrieder. 2019. Arbuscular mycorrhizal fungi alleviate low-temperature stress and increase freezing resistance as a substitute for acclimation treatment in barley. *Crop Pasture Sci.* 70(3): 218-233. <https://doi.org/10.1071/CP18385>
- Harborne, J.B., 1973. Nitrogen compounds. In *Phytochemical Methods*. Springer, Dordrecht. pp. 166–211. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-5921-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-009-5921-7_5)
- Harrison, M. J. 2005. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 19-42. [Doi: 10.1146/annurev.micro.58.030603.123749](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123749).
- Hart, R. D. 1987. An ecological systems conceptual framework for agricultural research and development. *Readings in FSR and development*. USAID. 50-65pp.
- Hasanuzzaman, M., M. H. M. Borhannuddin Bhuyan, K. Nahar, M. S. Hossain, M. J. A. Mahmud, M. S. Hossen, A. A. Chowdhury Masud, M. Fujita. 2018. Potassium: a vital regulator of plant responses and tolerance to abiotic stresses. *Agronomy.* 8(3): 31. <https://doi.org/10.3390/agronomy8030031>
- Hashimoto Pinto, J. H. 2016. Efecto de dosis crecientes de elementos mayores en el rendimiento y contenido de esteviosido en (*Stevia rebaudiana*) Bertoni en Trujillo, La Libertad.
- Havlicek, E. 2012. Soil biodiversity and bioindication: from complex thinking to simple acting. *Eur. J. Soil Biol.* 49: 80-84. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2012.01.009>
- Hepper, C. M. 1985. Influence of age of roots on the pattern of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in leek and clover. *New Phytol.* 10: 685–693.
- Hernández, J., M. Combatt E., A. Jarma O., J. Polo S., y L. Rodríguez P. 2016. Rendimiento y calidad de hojas de *Stevia rebaudiana* Bert. Bajo la oferta edafológica y dos niveles de radiación en cinco regiones de Colombia. *Revista U. D. C. A. Actualidad y Divulgación Científica* 19:77-85.
- Hernández V., K., J. Moreno-Romero, M. Hernández de la T, C. Pérez M, D. Ríos L, y J. F. Martínez-García. 2022. Effect of light intensity on steviol glycosides production in leaves of *Stevia rebaudiana* plants. *Phytochemistry.* 194: 113027. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.113027>
- Hernández-Zárate, G. J. Zamora-Castro. 2018. Importancia de la biotecnología en el sector agroambiental y pecuario. *Agroentorno*. N° 179.
- Herrscher, E. G. 2003. *Pensamiento sistémico*. 2a Ed. 267 pp.
- Hijri, M. 2016. Analysis of a large dataset of mycorrhiza inoculation field trials on potato shows highly significant increases in yield. *Mycorrhiza.* 26(3): 209-214. <https://doi.org/10.1007/s00572-015-0661-4>

- Hristozkova, M., M. Geneva, I. Stancheva, M. Boychinova, E. Djonova. 2016. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in attenuation of heavy metal impact on *Calendula officinalis* development. *Appl. Soil Ecol.* 101: 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.01.008>
- Igiehon, N. O., y O. O. Babalola. 2017. Biofertilizers and sustainable agriculture: exploring arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101(12): 4871-4881. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8344-z>
- IPCC (Grupo Intergubernamental de Expertos Sobre el Cambio Climático). 2013. Cambio climático 2013. Bases físicas. WG1AR5 SummaryVolume FINAL SPANISH.pdf ([ipcc.ch](http://ipcc.ch))
- IPCC. 2018. Global warming of 1.5 °C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5 °C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty, edited by: Masson-Delmotte, V., Zhai, P., Pörtner, H. O., Roberts, D., Skea, J., Shukla, P. R., Pirani, A., Moufouma-Okia, W., Péan, C., Pidcock, R., Connors, S., Matthews, J. B. R., Chen, Y., Zhou, X., Gomis, M. I., Lonnoy, E., Maycock, T., Tignor, M., and Waterfield, T., Cambridge University Press, <https://doi.org/10.1017/9781009157940>.
- Jagiello-Kubiec, K., K. Nowakowska, A. J. Łukaszewska, y A. Pacholczak. 2021. Acclimation to *ex vitro* conditions in ninebark. *J. Agron.* 11(4): 612. <https://doi.org/10.3390/agronomy11040612>
- Janah, I., A. Meddich, A. Elhasnaoui, S. Khayat, M. Anli, A. Boutasknit, S. Aissam, y K. Loutfi. 2021. Arbuscular mycorrhizal fungi mitigates salt stress toxicity in *Stevia rebaudiana* Bertoni through the modulation of physiological and biochemical responses. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 1-11. <https://doi.org/10.1007/s42729-021-00690-y>
- Jarma, A. 2008. Estudios de adaptación y manejo integrado de estevia (*Stevia rebaudiana* Bert.): nueva alternativa agroindustrial del Caribe colombiano. Una revisión. *Rev. Colomb. Cienc. Hortic.* 2(1): 109-120. <https://doi.org/10.17584/rcch.2008v2i1.1176>
- Jarquín-Sánchez, A., S. Salgado-García, D. Jesús. Palma-López, W. Camacho-Chiu, y A. Guerreto-Peña. 2011. Análisis de nitrógeno total en suelos tropicales por espectroscopía de infrarojo cercano (NIRS) y quimiometría. *Agrociencia.* 45(6): 653-662. Recuperado en 02 de noviembre de 2022, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952011000600001&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952011000600001&lng=es&tlng=es).
- Jawad, M., B. Rizwan, M. Jawad, F. Khalid, y A. Ishaq. 2022. A nutraceutical and therapeutic potentials of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Pakistan BioMedical Journal.* 10-22. <https://doi.org/10.54393/pbmj.v5i1.143>

- Jerbi, M., S. Labidi, F. Laruelle, B. Tisserant, Y. Dalpé, A. Lounès-Hadj Sahraoui, y F. Ben Jeddi. 2022. Contribution of native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi in improving the physiological and biochemical response of hullless barley (*Hordeum vulgare* ssp. *nudum* L.) to Drought. *J. Soil Sci. Plant Nutri.* 1-18. <https://doi.org/10.1007/s42729-022-00802-2>
- Johansen B, O. 1993. Introducción a la Teoría General de Sistemas, Editorial Limusa, México, D. F., pp: 160-167.
- Johnston, C., F. Steinberg, R. Rucker. 2007. Ascorbic Acid. En J. Zempleni, R. Rucker, D. McCornick, y J. Suttie, *Handbook of Vitamins (Fourth Edition)* (págs. 489-520). New York: CRC Press, Taylor y Francis Group.
- Juntahum, S., J. Ekprasert, y S. Boonlue. 2022. Efficiency of arbuscular mycorrhizal fungi for the growth promotion of sugarcane under pot conditions. *Sugar Tech.* 1-10. <https://doi.org/10.1007/s12355-022-01129-z>
- Khiraoui, A., A. Hasib, C. Al Faiz, F. Amchra, M. Bakha, A. Boulli. 2017. *Stevia rebaudiana* Bertoni (Honey Leaf): A magnificent natural bio-sweetener, biochemical composition, nutritional and therapeutic values. *J. Nat. Sci. Res.* 7(12): 75-85. <https://www.researchgate.net/publication/319142861>
- Khiraoui, A., M. Bakha, F. Amchra, S. Ourouadi, A. Boulli, C. Al-Faiz, y A. Hasib. 2017. Nutritional and biochemical properties of natural sweeteners of six cultivars of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves grown in Morocco. *Journal of Materials and Environmental Science.* 8(3): 1015-1022.
- Kiers, E. T., C. E. Lovelock, E. L. Krueger, E. A. Herre. 2000. Differential effects of tropical arbuscular mycorrhizal fungal inocula on root colonization and tree seedling growth: implications for tropical forest diversity. *Ecol. Lett.* 3(2): 106-113. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2000.00126.x>
- Khalediyan, N., W. Weisany, P. M. Schenk. 2021. Arbuscular mycorrhizae and rhizobacteria improve growth, nutritional status and essential oil production in *Ocimum basilicum* and *Satureja hortensis*. *Ind Crops Prod.* 160: 113163. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113163>
- Khalil, H. A., A. M. Eissa, S. M. El-Shazly, y A. M. A. Nasr. 2011. Improved growth of salinity-stressed citrus after inoculation with mycorrhizal fungi. *Sci. Hortic.* 130 (3): 624-632. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.08.019>
- Kumar, T., y M. Ghose. 2008. Status of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in the Sundarbans of India in relation to tidal inundation and chemical properties of soil. *Wetl. Ecol. Manag.* 16(6):471-483.
- Kumar, V., S. Pandita, G.P. S. Sidhu, A. Sharma, K. Khanna, P. Kaur, R. Setia. 2021. Copper bioavailability, uptake, toxicity and tolerance in plants: a comprehensive

review. Chemosphere. 262:

127810.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127810>

- Kumari, S., S. Saini, y G. Dhania. 2022. Biotechnological approaches for mitigation and adaptation of climate change. In *Plant Stress Mitigators*. Springer, Singapore. pp. 369-385. DOI: [10.1007/978-981-16-7759-5\\_17](https://doi.org/10.1007/978-981-16-7759-5_17)
- Kunová, G., V. Rada, A. Vidailac, y I. Lisova. 2014. Utilisation of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* (Bertonii) by lactobacilli and bifidobacteria *in vitro* conditions. 59(3): 251-255. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0291-1>
- Lai, L., X. Huang, H. Wang, Y. Dong, y S. Xiao. 2009. Estimation of environment cost of fertilization in China. *Acta Pedol. Sin.* 46 (1): 63–69.
- Lapointe, L., y J. Molard. 1997. Costs and benefits of mycorrhizal infection in a spring ephemeral, *Erythronium americanum*. *New Phytol.* 135: 491–500.
- Latridis, N., A. Kougioumtzi, K. Vlataki, S. Papadaki y A. Magklara. 2022. Anti-cancer properties of *Stevia rebaudiana*; more than a sweetener. *Molecules.* 27(4): 1362. <https://doi.org/10.3390/molecules27041362>
- Lemus-Mondaca, R., A. Vega-Gálvez, L. Zura-Bravo, y K. Ah-Hen. 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food chem.* 132(3): 1121-1132. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.140>
- Lenoir, I., J. Fontaine, y A. L. H. Sahraoui. 2016. Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: a review. *Phytochemistry.* 123: 4-15.
- Levis, J. W., M. A. Barlaz, A. Tayebali, y S. R. Ranjithan. 2011. Quantifying the greenhouse gas emission reductions associated with recycling hot mix asphalt. *Road Mater. Pavement Des.* 12(1): 57-77. <https://doi.org/10.1080/14680629.2011.9690352>
- Levitus G., V. Echenique, C. Rubintein, E. Hopp, y A. Mroginski. 2010. Biotecnología y mejoramiento vegetal II ediciones instituto nacional de tecnología agropecuaria. consejo argentino para la información el desarrollo de la biotecnología. Argentina.
- Li, Y., N. He, J. Hou, L. Xu, C. Liu, J. Zhang, y X. Wu. 2018. Factors influencing leaf chlorophyll content in natural forests at the biome scale. *Front. Ecol. Evol.* 6: 64. DOI: [10.3389/fevo.2018.00064](https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00064)
- Liu, L., D. Li, Y. Ma, H. Shen, S. Zhao, y Y. Wang. 2021. Combined application of arbuscular mycorrhizal fungi and exogenous melatonin alleviates drought stress and improves plant growth in tobacco seedlings. *J. Plant Growth Regul.* 40: 1074–1087. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10165-6>

- Lotfi, M., K. Fernandez, P. Vermeir, M. Mars, S. Werbrouck. 2019. In *vitro* mycorrhization of pear (*Pyrus communis*). *Mycorrhiza*. 29: 607–614. <https://doi.org/10.1007/s00572-019-00919-w>
- Loyola-Vargas, V. M., y N. Ochoa-Alejo. 2018. An introduction to plant tissue culture: advances and perspectives. *Methods in molecular biology*. Plant cell culture protocols 1815: 3-13. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_1)
- Lozano-Contreras., M.G y Ramírez-Jaramillo, G. 2022. Estevia, una alternativa dulce y saludable. [http://www.cicy.mx/sitios/desde\\_herbario/](http://www.cicy.mx/sitios/desde_herbario/)
- Luo, J., Yan, Q., Yang, G., Wang, Y., 2022. Impact of the arbuscular mycorrhizal fungus *Funneliformis mosseae* on the physiological and defence responses of *Canna indica* to copper oxide nanoparticles stress. *J. Fungi*. 8(5): 513. <https://doi.org/10.3390/jof8050513>
- Malakar, M., M. Beruto, y R. Barba-González. 2022 Biotechnological approaches to overcome hybridization barriers and use of micropropagation tool for further improvement in Heliconia: a review. *Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC)*.149: 503-522. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02300-w>
- Malyan, S. K., A. Kumar, S. Baram, J. Kumar, S. Singh, S. S. Kumar, y A. N. Yadav. 2019. Role of fungi in climate change abatement through carbon sequestration. In *Recent advancement in white biotechnology through fungi*. Springer, Cham. pp. 283-295. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-25506-0\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-25506-0_11)
- Martínez-Cruz, M. 2015. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Una revisión. *Cultivos tropicales*. 36: 5-15. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193243640001>
- Martínez-Dávila, J. P., y L. Casanova-Pérez. 2018. Epistemic and conceptual orphanhood in the sustainability of agroecosystems. *Sustainability of Agroecosystems*. 1(1): 1-16. <https://doi.org/10.5772/intechopen.74110>
- Marques, D. M., V. Veroneze Júnior, A. B. Da Silva, J. R. Mantovani, P. C. Magalhães, T. C. De Souza. 2018. Copper toxicity on photosynthetic responses and root morphology of *Hymenaea courbaril* L. (Caesalpinioideae). *Wat. Air and Soil Poll.* 229 (5): 138. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3769-2>
- Mathur, S., M.P. Sharma, y A. Jajoo. 2018. Improved photosynthetic efficacy of maize (*Zea mays*) plants with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) under high temperature stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 180: 149-154. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.02.002>
- Meddich, A., Y. Ait Rahou, A. Boutasknit, M. Ait-EI-Mokhtar, A. Fakhech, S. Lahbouki, S. Wahbi, S. 2021. Role of mycorrhizal fungi in improving the tolerance of melon (*Cucumis melo*) under two water déficit partial root drying and regulated deficit

- Merlos, M. A., O. Zitka, A. Vojtech, C. Azcón-Aguilar, N. Ferrol. 2016. The arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* differentially regulates the copper response of two maize cultivars differing in copper tolerance. *Plant Sci.* 253: 68-76. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.09.010>
- Meza, R., Barrientos-Gutierrez, T., R. Rojas-Martinez, N. Reynoso-Noverón, L. S. Palacio-Mejia, E. Lazcano-Ponce, M. Hernández-Ávila. 2015. Burden of type 2 diabetes in Mexico: past, current and future prevalence and incidence rates. *Preventive Medicine*, 81, 445–450. doi:10.1016/j.ypmed.2015.10.015
- Miller, R. M. y M. Kling. 2000. The importance of integration and scale in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil.* 226: 295–309.
- Miransari, M. 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen uptake. *Arch. Microbiol.* 193(2): 77-81. <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0657-6>
- Mitalipov, S., y D. Wolf. 2009. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 114 :185-199. doi: 10.1007/10\_2008\_45
- Molinari, S., M. Akbarimotlagh, P. Leonetti. 2022. Tomato root colonization by exogenously inoculated arbuscular mycorrhizal fungi induces resistance against root-knot nematodes in a dose-dependent manner. *Int. J. Mol. Sci.* 23(16): 8920. <https://doi.org/10.3390/ijms23168920>
- Moreno-Hernández, M del R., J. L. Spinoso-Castillo, L. Sánchez-Segura, R. Sánchez-Páez, J.J. Bello-Bello. 2022. Arbuscular mycorrhizal fungi: inoculum dose affects plant development and performance of sugarcane (*Saccharum* spp.) Plantlets during acclimatization stage. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* pp 1-10. <https://doi.org/10.1007/s42729-022-00964-z>
- Nahuelcura, J., A. Ruiz, F. Gómez, y P. Cornejo. 2022. The effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the phenolic compounds profile, antioxidant activity and grain yields in wheat cultivars growing under hydric stress. *J. Sci. Food. Agric.* 102(1): 407-416.
- Nanjundappa, A., D. J. Bagyaraj, A. K. Saxena, M. Kumar, y H. Chakdar. 2019. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Bacillus* spp. in soil enhancing growth of crop plants. *Fungal Biol. Biotechnol.* 6(1): 1-10.
- Németh, Á., y Jánosi, S. 2019. Extraction of steviol glycosides from dried *Stevia rebaudiana* by pressurized hot water extraction. *Acta Aliment.* 48(2): 241-252. <https://doi.org/10.1556/066.2019.48.2.12>

- Newton, A. C. 1991. Mineral nutrition and mycorrhizal infection of seedling oak and birch III. Epidemiology aspects of ectomycorrhizal infection, and the relationship with seedling growth. *New Phytol.* 117: 53–60.
- Oerke, E.C. Crop losses to pests. 2006. *J. Agri. Sci.* 144: 31–43. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0021859605005708>
- Oliva, Y., A. Oleas, y J. Tigrero. 2009. *Stevia rebaudiana* Bertoni,
- Olmos, A. 2022. [Estados productores de stevia en México \(blogagricultura.com\)](https://blogagricultura.com)
- Olsson, P. A., E. C. Hammer, H. Wallander, J. Pallon. 2008. Phosphorus availability influences elemental uptake in the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*, as revealed by particle-induced X-ray emission analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(13): 4144-4148. Doi:10.1128/AEM.00376-08
- Orozco, C. 2004. Situación Actual de la Biotecnología en Guatemala. Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP). Documento Técnico N° 17 (06-2004).
- Osman, K. T. 2013. Plant nutrients and soil fertility management. In *Soils*. Springer, Dordrecht. pp. 129-159. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-5663-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5663-2_10)
- Ostadi, A., A. Javanmard, M. Amani Machiani, A. Sadeghpour, F. Maggi, M. Nouraein, M. R. Morshedloo, Lorenzo, J. M. 2022. Co-Application of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles and Arbuscular Mycorrhizal Fungi Improves Essential Oil Quantity and Quality of Sage (*Salvia officinalis* L.) in Drought Stress Conditions. *Plants.* 11(13): 1659. <https://doi.org/10.3390/plants11131659>
- Pallon, J., H. Wallander, E. Hammer, N. A. Marrero, V. Auzelyte, M. Elfman, P. Kristiansson, C. Nilsson, M. Wegdén. 2007. Symbiotic fungi that are essential for plant nutrient uptake investigated with NMP. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms.* 260(1): 149-152. <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2007.02.018>
- Pandino, G., S. Lombardo, A. Lo Monaco, C. Ruta, G. Mauromicale. 2022. Mycorrhizal inoculation improves plant growth and yield of micropropagated early globe artichoke under field Conditions. *Agriculture.* 12: 114. <https://doi.org/10.3390/agriculture12010114>
- Panwar, J., R. S. Yadav, B. K. Yadav, y J. C. Tarafdar. 2008. Arbuscular mycorrhizae: a dynamic microsymbiont for sustainable agriculture. In *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry* (pp. 159-176). Springer, Dordrecht.
- Paredes-Suarez, P. D. C., A. Bautista-Galvez, M. E. Ortega-Ramirez, R. Jimenez-Vera, M. Benitez-Mandujano y N. Gonzalez-Cortes. 2021. Rooting of *Stevia rebaudiana* bertoni mini-cuttings with indole butyric acid in hydroponics. *Rev. Fitotec.* 44(3): 367-372.

- Parkash, V., A. Aggarwal, V. Sharma. 2011. Rhizospheric effect of vesicular arbuscular mycorrhizal inoculation on biomass production of *Ruta graveolens* L: a potential medicinal and aromatic herb. *J. Plant Nutr.* 34: 1386–1396.
- Pathan, S. I., M.T. Ceccherini, F. Sunseri, y A. Lupini. 2020. Rhizosphere as hotspot for plant-soil-microbe interaction. In *Carbon and Nitrogen Cycling in Soil*. pp. 17-43 [https://doi.org/10.1007/978-981-13-7264-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-13-7264-3_2).
- Pérez. E. M., R. Ramírez, M. H. Gordon y N. Ochoa. 1999. *Introducción Al Cultivo De Tejidos Vegetales*. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Primera edición México.
- Pérez-Velasco, E. A., R. Mendoza-Villarreal, A. Sandoval-Rangel, M. Cabrera-de la Fuente, V. Robledo Torres., L. A. Valdez-Aguilar. 2019. Evaluación del uso de endomicorrizas y *Azospirillum* sp. en la productividad y calidad nutracéutica de chile morrón (*Capsicum annuum*) en invernadero. *ITEA-Información Técnica Económica Agraria* 115 (1): 18-30. <https://doi.org/10.12706/itea.2018.029>
- Peteliuk, V., L. Rybchuk, M. Bayliak, K. B. Storey, y O. Lushchak. 2021. Natural sweetener *Stevia rebaudiana*: Functionalities, health benefits and potential risks. *EXCLI journal*. 20: 1412. [doi: 10.17179/excli2021-4211](https://doi.org/10.17179/excli2021-4211)
- Phillips, G. C., y M. Garda. 2019. Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 55(3): 242-257. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09983-5>
- Pinos, N. Q., R. L. Louro-Berbara, S. S. Elias, T. A. Van Tol de Castro, y A. C. García. 2019. Combination of humic substances and arbuscular mycorrhizal fungi affecting corn plant growth. *J. Environ. Qual.* 48 (6): 594-1604.
- Platas-Rosado, D. E., J. Vilaboa-Arroniz, L. González-Reynoso, V. H. Severino-Lendechy, G. López-Romero, y I. Vilaboa-Arroniz. 2017. A theoretical analysis for the study of agroecosystems. *Trop. Subtrop. Agroecosystems*. 20(3). <http://www.revista.ccba.uady.mx/urn:ISSN:1870-0462-tsaes.v20i3.2019>
- Pronaces-Conacyt, 2022. [¿QUÉ SON LOS PRONACES? | Conacyt](#)
- Ramírez, J. G., B.W. Avilés, O.Y. Moguel, G. S. Góngora, L. C. May. 2011. *Estevia (Stevia rebaudiana, Bertoni)*, un cultivo con potencial productivo en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigaciones Regional Sureste.
- Ramírez-Jaramillo, G., y M. G. Lozano-Contreras. 2017. *Stevia rebaudiana* Bertoni production in Mexico. *Agroproductividad*. 10(8): 84-90.
- Rasouli, F., T. Amini, M. Asadi, M. B. Hassanpouraghdam, M.A, Aazami, S. Ercisli, S. Skrovankova, J. Mlcek. 2022. Growth and antioxidant responses of lettuce (*Lactuca sativa* L.) to arbuscular mycorrhiza inoculation and seaweed extract foliar application. *Agronomy*. 12(2): 401. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020401>

- Reynolds, H.L., Hartley, A.E., Vogelsang, K.M., Bever, J.D., Schultz, P.A., 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi do not enhance nitrogen acquisition and growth of old-field perennials under low nitrogen supply in glasshouse culture. *New Phytol.* 167(3): 869–880. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01455.x>
- Rippe, J. M., T. J. Angelopoulos. 2016. Relationship between Added Sugars Consumption and Chronic Disease Risk Factors: Current Understanding. *Nutrients.* 8: 697. <https://doi.org/10.3390/nu8110697>
- Roca, W. M., L. A. Mroginski. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. 969 p. (Publicación CIAT no. 151).
- Roca, W. M., y Ramírez, H. 2000. Introducción a la biotecnología vegetal. CEDAF. [BIOTECNOLOGIA-with-cover-page-v2.PDF \(d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net\)](https://doi.org/10.3390/nu8110697)
- Rodríguez, R. J., R. S. Redman, J. M. Henson. 2004. The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments. Mitigation and adaptation strategies for global change. 9(3): 261-272.
- Ruiz-Ruiz, J. C., Moguel-Ordoñez, Y. B, Basto, Á. M, y Segura-Campos, M. R. 2015. Antioxidant capacity of leaf extracts from two *Stevia rebaudiana* Bertoni varieties adapted to cultivation in Mexico. *Nutr. Hosp.* 31(3): 1163-1170.
- Ruiz-Ruiz, J. C., Moguel-Ordoñez, Y. B., y Segura-Campos, M. R. 2017. Biological activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni and their relationship to health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57(12): 2680-2690.
- Ryan M. Warner. 2021. Influence of environmental parameters, pinching, and ethephon application on growth and branching of potted stevia. *HortScience.* 57(1):81–84. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI16241-21>
- Sales, F. R., A. O. Silva, L. R. Sales, T. L. Rodrigues, F. M. de Souza Moreira, M. A. C. Carneiro, M. A. C. 2021. Native arbuscular mycorrhizal fungi exhibit biotechnological potential in improvement of soil biochemical quality and in increasing yield in sugarcane cultivars. *Sugar Tech.* 23(6): 1235-1246. [Doi:10.1007/s12355-021-01016-z](https://doi.org/10.1007/s12355-021-01016-z)
- Sales, L. R., G. N. D. Silva, R. H. D. S. Siqueira, M. A. C. Carneiro, V. Faquin. 2018. Arbuscular mycorrhizal fungi on the biomass and nutrition of *Urochloa decumbens* at different soil densities. *Pesq. Agropec. Bras.* 53: 943-951. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2018000800009>
- Salud-Conacyt. 2022. [Salud – Conacyt](https://doi.org/10.2134/1980.roleofphosphorus.c18)
- Sánchez, P. A., y G. Uehara. 1980. Management considerations for acid soils with high phosphorus fixation capacity. The role of phosphorus in agriculture. *Agronomy.* 471-514. <https://doi.org/10.2134/1980.roleofphosphorus.c18>

- Sánchez, P. A., y T.J. Logan. 1992. Myths and science about the chemistry and fertility of soils in the tropics. *Myths and Science of Soils of the Tropics*. 29: 35-46. <https://doi.org/10.2136/sssaspecpub29.c3>
- Sangiorgio, D., A. Cellini, I. Donati, C. Pastore, C. Onofrietti, y F. Spinelli. 2020. Facing climate change: application of microbial biostimulants to mitigate stress in horticultural crops. *Agronomy*. 10(6): 794.
- Sarandón, S. J. 2002. El agroecosistema: un sistema natural modificado. *Agroecología: El camino para una agricultura sustentable*. Ediciones Científicas Americanas, La Plata, Argentina. [Microsoft Word - Cap4-Agroecosistemas \(unlp.edu.ar\)](https://www.unlp.edu.ar/microsof-word-cap4-agroecosistemas)
- Sasson, A. 1989. Biotechnologies and developing countries: present and future. *Plant Biotechnol.* pp 806.
- Schipanski, M. E., y E. M. Bennett. 2021. The Phosphorus Cycle. In *Fundamentals of Ecosystem Science*. 189-213. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812762-9.00009-5>
- Schmer, M. R., K. P. Vogel, R. B. Mitchell, y R. K. Perrin. 2008. Net energy of cellulosic ethanol from switchgrass. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(2): 464-469. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704767105>
- Schlesinger, W. H. 2021. Some thoughts on the biogeochemical cycling of potassium in terrestrial ecosystems. *Biogeochemistry*. 154 (2): 427-432. <https://doi.org/10.1007/s10533-020-00704-4>
- Selosse, M. A., y F. Le Tacón. 1998. The land flora: a phototroph–fungus partnership. *Tree Ecol. Evol.* 13 (1): 15–20.
- Sharma, S. B., R. Z. Sayyed, M. H. Trivedi, y T. A. Gobi. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*. 2(1): 1-14.
- Shuqin, J., y Z. Fang. 2018. Zero Growth of Chemical Fertilizer and Pesticide Use: China's Objectives, Progress and Challenges. *J. Resour. Ecol.* 9 (1): 50–58. Doi: 10.5814/j.issn.1674-764x.2018.01.006
- Shumway, D. L., y R. T. Koide. 1995. Size and reproductive inequality in mycorrhizal and nonmycorrhizal populations of *Abutilon theophrasti*. *J. Ecol.* 83: 613–620.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2020. [Estadísticas de producción de stevia en México \(blogagricultura.com\)](https://blogagricultura.com)
- Siddiqui, Z. A., y J. Pichtel. 2008. Mycorrhizae: an overview. *Mycorrhizae: sustainable agriculture and forestry*, 1-35.
- Sidhu, S. S. y P. Chakravarty. 1990. Effect of selected forestry herbicides on ectomycorrhizal development and seedling growth Diversity and classification of

- mycorrhizal associations 493 of lodgepole pine and white spruce under controlled and field environment. *Eur. J. For. Pathol.* 20: 77–94.
- Sinclair, T. R., y V. Vadez. 2002. Physiological traits for crop yield improvement in low N and P environments. *Plant Soil.* 245(1): 1-15. <https://doi.org/10.1023/A:1020624015351>
- Siqueira J. O., y O. J. Saggin-Júnior. 2001. Dependency on arbuscular mycorrhizal fungi and responsiveness of some Brazilian native woody species. *Mycorrhiza.* 11: 245–255.
- Smith, S. E., D. J. Read. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*, 2nd Edn. Academic Press, London.
- Soejarto, D. D. 2001. Botany of *Stevia* and *Stevia rebaudiana*. In *Stevia*. CRC Press. pp. 18-39.
- Soejarto, D. D., E. M. Addo, y A. D. Kinghorn. 2019. Highly sweet compounds of plant origin: From ethnobotanical observations to wide utilization. *J. Ethnopharmacol.* 243. 12056. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112056>
- Sofo, A., A. Zanella, y J. F. Ponge. 2022. Soil quality and fertility in sustainable agriculture, with a contribution to the biological classification of agricultural soils. *Soil Use Manag.* 38(2): 1085-1112. <https://doi.org/10.1111/sum.12702>
- Soulas, M. L., B. Le, P. Camporota, C. Jarosz, M. I. Salerno, y R. Perrin. 1997. Solarization in a forest nursery: effect on ectomycorrhizal soil infectivity and soil receptiveness to inoculation with *Laccaria bicolor*. *Mycorrhiza.* 7: 95–100.
- Sun, J., L. Yang, X. Yang, J. Wei, L. Li, E. Guo y Y. Kong. 2021. Using Spectral Reflectance to Estimate the Leaf Chlorophyll Content of Maize Inoculated With Arbuscular Mycorrhizal Fungi Under Water Stress. *Front. Plant Sci.* 12: 646173. [doi: 10.3389/fpls.2021.646173](https://doi.org/10.3389/fpls.2021.646173)
- Sun, T., S. Rao, X. Zhou, L. Li. 2022. Plant carotenoids: recent advances and future perspectives. *Mol. Hortic.* 2(3): 1-21. <https://doi.org/10.1186/s43897-022-00023-2>
- Tahat, M., K. Alananbeh, Y. Othman y D. Leskovar. 2020. Soil health and sustainable agriculture. *Sustainability.* 12(12): 4859. <https://doi.org/10.3390/su12124859>
- Tamura, Y., S. Nakamura. H. Fukui, and M. Tabata. 1984. Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni by stem-tips culture. *Plant Cell Rep.* 3: 183-185. <https://doi.org/10.1007/BF00270195>
- Tauler, M., y E. Baraza. 2015. Improving the acclimatization and establishment of *Arundo donax* L. plantlets, a promising energy crop, using a mycorrhiza-based biofertilizer. *Ind. Crops Prod.* 66. 299-304.

- Tavarini, S., B. Passera, A. Martini, L. Avio, C. Sbrana, M. Giovannetti, y L. G. Angelini. 2018. Plant growth, steviol glycosides and nutrient uptake as affected by arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorous fertilization in *Stevia rebaudiana* Bert. Ind. Crops Prod. 111: 899-907. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.055>
- Termsung, N., R. Cheewangkoon, K. Kunasakdakul. 2021. First report of *septoria steviae* causing stevia leaf spot in Thailand. J. Phytopathol. 16(4): 260-268. <https://doi.org/10.1111/jph.12983>
- Thomson, B. D., T. S. Grove, N. Malajczuk y G. E. ST. J. Hardy. 1996. The effect of soil pH on the ability of ectomycorrhizal fungi to increase the growth of *Eucalyptus globulus* Labill. Plant Soil. 178: 209–214.
- Trinidad-Cruz, J. R., E. E. Quiñones-Aguilar, G. Rincón-Enríquez, L. López-Pérez, y L. V. Hernández-Cuevas. 2017. Mycorrhization of *Agave cupreata*: Biocontrol of *Fusarium oxysporum* and plant growth promotion. Rev. mex. fitopatol. 35 (2): 151-169. Doi:10.18781/r.mex.fit.1607-5. [Doi:10.18781/r.mex.fit.1607-5](https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1607-5).
- Tshibangu Kazadi, A., J. Lwalaba wa Lwalaba, B. Kirika Ansey, J. Mavungu Muzulukwau, G. Manda Katabe, M. Iband Karul, G. Baert, G. Haesaert, R. P. Mukobo Mundende. 2022. Effect of phosphorus and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculation on growth and productivity of maize (*Zea mays* L.) in a tropical ferralsol. Gesunde Pflanz. 74(1): 159-165. <https://doi.org/10.1007/s10343-021-00598-8>
- Unar-Munguía, M., Flores, E. M., y Colchero, M. A. 2019. Apparent consumption of caloric sweeteners increased after the implementation of NAFTA in Mexico. *Food Policy*, 84, 103-110. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2019.03.004>
- Vafadar, F., R. Amooaghaie, y M. Otroshy. 2014. Effects of plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungus on plant growth, stevioside, NPK, and chlorophyll content of *Stevia rebaudiana*. J. Plant Interact. 9(1): 128-136. <https://doi.org/10.1080/17429145.2013.779035>
- Vanegas García, J. H. y L. M. Gil Obando. 2007. La discapacidad, una mirada desde la teoría de sistemas y el modelo biopsicosocial. Revista Hacia Promoción de la Salud. 12: 51-61. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=309126689005>
- Vázquez-Baxcajay, L., A. Robledo-Paz, A. Muratalla-Lúa, V. Conde-Martínez. 2014. Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni y detección de steviósidos. Bioagro. 26(1): 49-56. Recuperado en 26 de octubre de 2022, de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1316-33612014000100006&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612014000100006&lng=es&tlng=es).
- Verdin, A., A. Lounès-Hadj Sahraoui, J. Fontaine, A. Grandmougin-Ferjani, y R. Durand. 2006. Effects of anthracene on development of an arbuscular mycorrhizal fungus and contribution of the symbiotic association to pollutant dissipation. Mycorrhiza. 16(6): 397-405. <https://doi.org/10.1007/s00572-006-0055-8>

- Vilaboa Arroniz., J. 2013. La ganadería doble propósito desde una visión agroecosistémica. *Agro Productividad*. 6 (6): 9-16. <https://mail.revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/489>
- Vishwakarma, S. K., T. Ilyas, D. Malviya, Z. Shafi, M. Shahid, B. Yadav y H. V. Singh. 2022. Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) as Potential Biocontrol Agents. In *Rhizosphere Microbes*. Springer, Singapore. 40 :197-222. [https://doi.org/10.1007/978-981-19-5872-4\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-19-5872-4_10)
- Vosátka, M. y J. Albrechtová. 2009. Beneficios de los hongos micorrízicos arbusculares para la producción sostenible de cultivos. En *Microbial strategies for crop improvement*. Springer, Berlín, Heidelberg. 205-225. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-01979-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-642-01979-1_10)
- Walder, F., y M. G. Van Der Heijden. 2015. Regulation of resource exchange in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nat. Plants*. 1(11): 1-7.
- Wallander, H., L. O. Nilsson, D. Hagerberg, y E. BA°A°TH. 2001. Estimation of the biomass and seasonal growth of external mycelium of ectomycorrhizal fungi in the field. *New Phytol*. 151: 753–760.
- Wang, C., B. Tian, Z. Yu, y J. Ding, 2020. Effect of different combinations of phosphorus and nitrogen fertilization on arbuscular mycorrhizal fungi and aphids in wheat. *Insects*.11(6): 365.
- Wang, F., X. Zhang, S. Zhang, S. Zhang, y Y. Sun. 2020. Interactions of microplastics and cadmium on plant growth and arbuscular mycorrhizal fungal communities in an agricultural soil. *Chemosphere*. 254: 126791. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126791>
- Wang, M., Q. Zheng, Q. Shen y S. Guo. 2013. The critical role of potassium in plant stress response. *Int J Mol Sci*. 14(4): 7370-7390.
- Wang, Y., M. Wang, Y. Li, A. Wu, J. Huang. 2018. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nitrogen uptake of *Chrysanthemum morifolium* under salt stress. *PLOS ONE*. 13 (4): e0196408. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196408>
- White, P. J., M. R. Broadley. 2003. Calcium in plants. *Ann. Bot*. 92(4), 487-511. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq164>
- Wilson., G. W. T. y D. C. Hartnett. 1998. Interspecific variation in plant responses to mycorrhizal colonization in tallgrass prairie. *American Journal of Botany*. 85: 1732–1738.
- Wu, M., Y. Yan, Y. Wang, Q. Mao, Y. Fu, X. Peng, X., Z. Yang, J. Ren, A. Liu, S. Chen, y G. J. Ahammed. 2021. Arbuscular mycorrhizal fungi for vegetable (VT) enhance resistance to *Rhizoctonia solani* in watermelon by alleviating oxidative stress. *Biol. Control*. 152: 104433. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104433>

- Wu S, Shi Z, Chen X, Gao J, Wang X. 2022. Arbuscular mycorrhizal fungi increase crop yields by improving biomass under rainfed condition: a meta-analysis. *PeerJ*. 10: e12861. <https://doi.org/10.7717/peerj.12861>
- Xing G. X., y Zhu Z. X. 2000. An assessment of N loss from agricultural fields to the environment in China. *Nutr. Cycling Agroecosys*. 57(1): 67–73.
- Yadav, A. K., S. Singh, D. Dhyani, D y P. S. Ahuja. 2011. A review on the improvement of stevia (*Stevia rebaudiana* (Bertoni)). *Can. J. Plant. Sci*. 91(1): 1-27. <https://doi.org/10.4141/cjps10086>
- Yadav, K., A. Aggarwal, y N. Singh. 2012. Actions for *ex situ* conservation of *Gloriosa superba* L. an endangered ornamental cum medicinal plant. *J. Crop. Sci. Biotechnol*. 15(4): 297-303. <https://doi.org/10.1007/s12892-012-0045-7>
- Yadav, K., A. Aggarwal, y N. Singh. 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) induced acclimatization, growth enhancement and colchicine content of micropropagated *Gloriosa superba* L. plantlets. *Ind. Crops Prod*. 45: 88-93. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.12.001>
- Yan, Z., T. Ma, S. Guo, R. Liu, y M. Li. 2021. Leaf anatomy, photosynthesis and chlorophyll fluorescence of lettuce as influenced by arbuscular mycorrhizal fungi under high temperature stress. *Sci. Hortic*. 280: 109933. [doi:10.1016/j.scienta.2021.109933](https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.109933)
- Yano-Melo, A. M., L. C. Maia, Jr. O. J. Saggin, J. M. Lima-Filho y N. F. Melo. 1999. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the acclimatization of micropropagated banana plantlets. *Mycorrhiza*. 9 (2): 119-123. DOI: [10.1007/s005720050009](https://doi.org/10.1007/s005720050009)
- Ye, L., X. Zhao, E. Bao, K. Cao, y Z. Zou. 2019. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on watermelon growth, elemental uptake, antioxidant, and photosystem II activities and stress-response gene expressions under salinity-alkalinity stresses. *Front. Plant. Sci*. 10: 863. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00863>
- Yildiz, M., y Karhan, M. 2021. Characteristics of some beverages adjusted with stevia extract, and persistence of steviol glycosides in the mouth after consumption. *Int. J. Gastron. Food Sci*. 24: 100326. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2021.100326>
- Zewail Y, R. M., M. Ali, I. S. H. El-Gamal., S. H. A. Al-Maracy., K. R. Islam., M. Elsadek, E. Azab, A. A. Gobouri., N. ElNahas, M. H. M. Mohamed., y H. S. El-Desouky. 2021. Interactive effects of arbuscular mycorrhizal inoculation with nano boron, zinc, and molybdenum fertilization on stevioside contents of stevia (*Stevia rebaudiana*, L.) plants. *Horticulturae*. 7(8): 260. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7080260>
- Zhang, Y., Y. Li, L. Jiang, C. Tian, J. Li, y Z. Xiao. 2011. Potential of perennial crop on environmental sustainability of agriculture. *Procedia Environ. Sci*. 10: 1141-1147. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2011.09.182>

Zubelzu, S., R. Sánchez-Calvo, D. S. Cardozo, F. C. Ide y L. Rodríguez-Sinobas. 2022. Suitability of sustainable agricultural drainage systems for adapting agriculture to climate change. *Sci. Total Environ.* 805: 50319.