

EFFECTIVIDAD DE BIOFERTILIZANTES Y BRASINOESTEROIDE EN *Stevia rebaudiana* Bert.

EFFECTIVENESS OF BIOFERTILIZERS AND BRASSINOSTEROIDS IN *Stevia rebaudiana* Bert.

Juan F. Aguirre-Medina¹, Francisco O. Mina-Briones¹, Jorge Cadena-Iníguez^{2*}, Ramón M. Soto-Hernández³

¹Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma de Chiapas. Entronque carretera costera y Estación Huehuetán. 30660. Huehuetán, Chiapas, México. (juanf56@prodigy.net.mx); (chico_apodaca@hotmail.com). ²Postgrado en Innovación en Manejo de Recursos Naturales, Campus San Luis Potosí, Colegio de Postgraduados. 78620. Iturbide No. 73, Col. Centro, Salinas Hidalgo, SLP. (jocadena@colpos.mx). ³Postgrado en Botánica, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. 56230. km 36.5 carretera México-Texcoco, Montecillo, Estado de México. México. (msoto@colpos.mx).

RESUMEN

La demanda de productos bajos en calorías ha aumentado. Uno de ellos es un producto natural extraído de la stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) cuyos glucósidos diterpénicos generan poder edulcorante sobresaliente. El cultivo orgánico de esta especie tiende a incrementarse en la región sur de Chiapas, México, pero su establecimiento asexual mediante esquejes presenta limitantes agronómicas. Esto puede mejorarse con la incorporación de biofertilizantes. Es el caso de la eficiencia en la fijación de N por *Azospirillum brasilense* y el hongo endomicorrízico *Rhizophagus intraradices* que mejoran el transporte de nutrimentos y agua a la planta hospedante. Estos microorganismos se han utilizados en programas de inducción de los biofertilizantes en cultivos anuales y perennes en México. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de *R. intraradices* (Schenck & Sm.) Walker & Schüßler y *A. brasilense* Tarrand, Krieg & Döbereiner en interacción con brasinoesteroide en plantas de *S. rebaudiana* Bert. mediante cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos. El cv Morita 2 se estableció en un vivero, en bolsas de plástico con 6 kg de suelo fluvisol-eútrico más arena de río lavada (1:1) y 4 g de cada inoculante al momento del trasplante. La concentración de *A. brasilense* fue 9×10^6 bacterias g^{-1} y la de *R. intraradices* 40 esporas g^{-1} de suelo con 95 % de colonización al sistema radical. El brasinoesteroide (CIDEF-4, Natura del Desierto, S. A. de C.V., contenido esteroideal 80 % con 10 % i.a.) (2 mg L^{-1} de agua) se asperjó al follaje a los 28 d de la siembra, más tres aplicaciones posteriores con frecuencia de 14 d. El diseño experimental fue completamente al azar con siete repeticiones;

ABSTRACT

The demand for low-calorie products has increased. One of them is a natural product extracted from stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) whose diterpene glucosides generate outstanding sweetening power. The organic cultivation of this species is increasing in the southern region of Chiapas, México, but its asexual establishment through cuttings presents agronomic limitations. This can be improved with the incorporation of biofertilizers. It is the case of the efficiency in N fixation by *Azospirillum brasilense* and the endomycorrhizae *Rhizophagus intraradices*, which improve the transport of nutrients and water to the host plant. These microorganisms have been used in biofertilizer induction programs in annual and perennial crops in México. The objective of this study was to evaluate the effect of *R. intraradices* (Schenck & Sm.) Walker & Schüßler and *A. brasilense* Tarrand, Krieg & Döbereiner in interaction with brassinosteroids in *S. rebaudiana* Bert. plants through morphological, physiological and biochemical changes. The cv Morita 2 was established in a greenhouse, in plastic bags with 6 kg of fluvisol-euthric soil plus washed river sand (1:1) and 4 g of each inoculant at the moment of transplant. The concentration of *A. brasilense* was 9×10^6 bacteria g^{-1} and that of *R. intraradices* 40 spores g^{-1} of soil with 95 % colonization of the root system. The brassinosteroid (CIDEF-4, Natura del Desierto, S. A. de C.V., steroid content 80 % with 10 % i.a.) (2 mg L^{-1} of water) was sprayed on the foliage after 28 d of sowing, plus three later applications with frequency of 14 d. The experimental design was completely random with seven repetitions; the treatments were the microorganisms and the brassinosteroid applied individually and combined, and the control without application or with inoculum. The experimental unit was one pot. The variables recorded were yield, percentage of mycorrhizae

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: marzo, 2017. Aprobado: febrero, 2018.

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 52: 609-621. 2018.

los tratamientos fueron los microorganismos y el brasinoesteroide aplicados individualmente y combinados, y el testigo sin aplicación o con inoculo. La unidad experimental fue una maceta. Las variables registradas fueron rendimiento, porcentaje de colonización radical micorrízica, contenido de edulcorantes en hojas y de N y P en vástago 90 d después de la siembra. Las plantas inoculadas y tratadas con brasinoesteroide en diferente modalidad incrementaron el área foliar (1728 cm^2 por planta), contenido de estevósido (35.8 mg g^{-1}), rebaudiósido (29.5 mg g^{-1}) y esteviol (5 mg g^{-1}) con respecto al testigo ($p \leq 0.05$). El contenido de N y P aumentó con la aplicación de *R. intraradices* solo y combinado con brasinoesteroide.

Palabras claves: *Rhizophagus intraradices*, *Azospirillum brasilense*, brasinoesteroide, estevósidos, nitrógeno y fósforo.

INTRODUCCIÓN

Stevia rebaudiana es una planta de la selva subtropical del alto Paraná, nativa de las laderas montañosas de Paraguay, donde los pobladores la han utilizado como edulcorante y en herbolaria (Dacome *et al.*, 2005; Prakash *et al.*, 2008; Anton *et al.*, 2010). El sabor dulce intenso en las hojas de esa especie se debe a la presencia de glucósidos diterpenoides, de los cuales estevósido y rebaudiósido A están en proporción mayor. El poder endulzante de estos compuestos es 150 a 300 veces mayor que la sacarosa (Midmore y Rank, 2002; Liu *et al.*, 2010) y sin contenido calórico (Anton *et al.*, 2010). Por esto, su demanda para endulzar alimentos y bebidas ha aumentado (Brandle y Telmer, 2007; Durán *et al.*, 2012). En México existen condiciones ambientales para el cultivo de *S. rebaudiana* (Ramírez-Jaramillo *et al.*, 2011) y puede ser rentable.

Los estudios sobre nutrición mineral de estevia son escasos (Das *et al.*, 2007); las investigaciones han evaluado la fertilización química (Jaitak *et al.*, 2008; Jarma *et al.*, 2010). Los sustratos con contenido alto de materia orgánica e inoculación de microorganismos aumentan los metabolitos secundarios (Brandt, y Møgaard, 2001) y mejoran el crecimiento de las plantas. El aumento del uso de los biofertilizantes (principalmente con microorganismos) ha permitido disminuir el uso de hasta 69 589 t de fertilizantes químicos, lo que redujo 22.7 mil t de CO_2 entre 2014 y 2015 (SAGARPA, 2016).

La hoja de estevia es el órgano con mayor concentración de estevósidos (Gardana *et al.*, 2010) y su

root colonization, content of sweetener in leaves, and of N and P in shoots 90 d after sowing. The inoculated plants and treated with brassinosteroid in different modality increased the leaf area (1728 cm^2 per plant), content of stevioside (35.8 mg g^{-1}), rebaudioside (29.5 mg g^{-1}) and steviol (5 mg g^{-1}) compared to the control ($p \leq 0.05$). The content of N and P increased with the application of *R. intraradices* alone and combined with brassinosteroid.

Keywords: *Rhizophagus intraradices*, *Azospirillum brasilense*, brassinosteroid, steviosides, nitrogen and phosphorus.

INTRODUCTION

Stevia rebaudiana is a plant from the subtropical forest of high Paraná, native of the mountainous hills of Paraguay, where the inhabitants have used it as sweetener and in herbal medicine (Dacome *et al.*, 2005; Prakash *et al.*, 2008; Anton *et al.*, 2010). The intense sweet taste in the leaves of this species is due to the presence of diterpene glucosides, of which stevioside and rebaudioside A, are in greater proportion. The sweetening power of these compounds is 150 to 300 times higher than sucrose (Midmore and Rank, 2002; Liu *et al.*, 2010) and without caloric content (Anton *et al.*, 2010). Therefore, its demand to sweeten foods and drinks has increased (Brandle and Telmer, 2007; Durán *et al.*, 2012). In México there are environmental conditions for the cultivation of *S. rebaudiana* (Ramírez-Jaramillo *et al.*, 2011) and it can be profitable.

Research about mineral nutrition of stevia is scarce (Das *et al.*, 2007); the studies have evaluated chemical fertilization (Jaitak *et al.*, 2008; Jarma *et al.*, 2010). The substrates with high content of organic matter and inoculation by microorganisms increase secondary metabolites (Brandt and Møgaard, 2001) and improve plant growth. The increase in use of biofertilizers (mainly with microorganisms) has allowed decreasing the use of up to 69 589 t of chemical fertilizers, which allowed reducing 22.7 mil t of CO_2 between 2014 and 2015 (SAGARPA, 2016).

The stevia leaf is the organ with highest concentration of steviosides (Gardana *et al.*, 2010) and its content is influenced primarily by the light hours, phenological stage, and cultivar (Madan *et al.*, 2010). Certain agricultural practices, such as fertilization (Das *et al.*, 2007) and application of endomycorrhizae microorganisms (Portugal *et al.*,

contenido está influido principalmente por las horas luz, etapa fenológica y cultivar (Madan *et al.*, 2010). Ciertas prácticas agronómicas, como la fertilización (Das *et al.*, 2007) y aplicación de microorganismos endomicorrízicos (Portugal *et al.*, 2006), incrementan la absorción de nutrimentos, principalmente P, mejoran la síntesis de metabolitos secundarios (Riipi *et al.*, 2002) y pueden afectar la concentración de flavonoides e isoflavonoides (Das *et al.*, 2008; Hanan *et al.*, 2008).

Las condiciones ambientales de la costa de Chiapas, México, difieren de las del sitio de origen de *Stevia* y su persistencia como cultivo tiende a disminuir. Así, surge la posibilidad de aplicar brasinoesteroide exógeno, que es una hormona que induce diversas respuestas en las plantas, como favorecer la polarización de la membrana celular y aumentar la resistencia al estrés biótico y abiótico (Singh y Shono, 2005; Reyes *et al.*, 2008).

Esta investigación tuvo como objetivo identificar la influencia de *Rhizophagus intraradices* y *Azospirillum brasilense* combinados con brasinoesteroide en los cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos de *Stevia rebaudiana* Bert.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del experimento

La investigación se desarrolló en un vivero en la primavera de 2015, en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agrícolas, *Campus* IV, Huehuetán, Chiapas, localizado en el entronque carretera costera y Estación Huehuetán, municipio de Huehuetán, Chiapas (15° 00' y 15° 30' N, 94° 30' y 95° 00' O, altitud de 44 m y temperatura mínima y máxima de 15 y 38 °C). El suelo usado, del grupo de los fluvisoles eútricos, se mezcló con arena de río lavada (1:1). La textura del sustrato fue areno-migajosa (Bouyoucos, 1962), con 80.7 % arena, 13.3 % limo, 5.8 % arcilla, 2.6 % materia orgánica (Walkley-Black, 1934), conductividad eléctrica de 0.05 ds m⁻¹, 5 Meq 100g⁻¹ de capacidad de intercambio catiónico, pH 5.7, 0.13 % de N (cuantificado con Micro-Kjeldahl; Irigoyen *et al.*, 1992), P 14.2 mg kg⁻¹ (evaluado por colorimetría), K⁺⁺ 64.2 mg kg⁻¹, Ca⁺⁺ 474 mg kg⁻¹ (determinados por espectrofotometría atómica, Thermo Fisher Scientific, modelo 400 ¼), Mg⁺⁺ 58.0 mg kg⁻¹ y Na⁺⁺ 102.5 mg kg⁻¹.

Esquejes de *S. rebaudiana* Bert. de la variedad Morita 2 se obtuvieron de una plantación, a 10 km del sitio experimental, de plantas vigorosas y sin daños aparentes por insectos o enfermedad. Los esquejes con longitud de 10±2 cm y 60 d de edad

2006), increase nutrient absorption, mainly of P, improve the synthesis of secondary metabolites (Riipi *et al.*, 2002), and can impact the concentration of flavonoids and isoflavonoids (Das *et al.*, 2008; Hanan *et al.*, 2008).

The environmental conditions of the coast of Chiapas, México, differ from those of the place of origin of *Stevia* and its persistence as a crop tends to decrease. Thus, the possibility of applying exogenous brassinosteroid emerges, which is a hormone that induces diverse responses in the plants, such as favoring the polarization of the cell membrane and increasing the resistance to biotic and abiotic stress (Singh and Shono, 2005; Reyes *et al.*, 2008).

This study had the objective of identifying the influence of *Rhizophagus intraradices* and *Azospirillum brasilense* combined with brassinosteroid on the morphological, physiological and biochemical changes of *Stevia rebaudiana* Bert.

MATERIALS AND METHODS

Experiment description

The study was carried out in a nursery during the spring of 2015, in the Experimental Field of the Agricultural Sciences School, *Campus* IV, Huehuetán, Chiapas, located in the junction of the coastal road and Estación Huehuetán, municipality of Huehuetán, Chiapas (15° 00' and 15° 30' N, 94° 30' and 95° 00' W, altitude of 44 m and minimum and maximum temperature of 15 and 38 °C). The soil used, from the group of the eutric fluvisols, was mixed with washed river sand (1:1). The texture of the substrate was sandy-loam (Bouyoucos, 1962), with 80.7 % sand, 13.3 % loam, 5.8 % clay, 2.6 % organic matter (Walkley-Black, 1934), electric conductivity of 0.05 ds m⁻¹, 5 Meq 100g⁻¹ of cationic exchange capacity, pH 5.7, 0.13 % of N (quantified with Micro-Kjeldahl; Irigoyen *et al.*, 1992), P 14.2 mg kg⁻¹ (evaluated by colorimetry), K⁺⁺ 64.2 mg kg⁻¹, Ca⁺⁺ 474 mg kg⁻¹ (determined through atomic spectrophotometry, Thermo Fisher Scientific, model 400 ¼), Mg⁺⁺ 58.0 mg kg⁻¹ and Na⁺⁺ 102.5 mg kg⁻¹.

Cuttings of *S. rebaudiana* Bert. of the Morita 2 variety, were obtained from a plantation, 10 km from the experimental site, from vigorous plants without apparent damage by insects or disease. The cuttings with longitude of 10±2 cm and 60 d of age were obtained from the upper third of the plant and once obtained they were transported in sterile water for their sowing. Six kg of the soil mixture, without sterilization, was placed in black plastic bags (caliber 700) with perforations on

se obtuvieron del tercio superior de la planta y se transportaron sumergidos en agua estéril para su siembra. Seis kg de la mezcla de suelo, sin esterilizar, se colocó en bolsas de plástico negro (calibre 700) con perforaciones en la base para drenaje. Los tratamientos fueron: 1) *A. brasilense*, 2) *R. intraradices*, 3) *A. brasilense* más *R. intraradices*, 4) Brasinoesteroide, 5) *R. intraradices* más brasinoesteroide, 6) *A. brasilense* más brasinoesteroide, 7) *A. brasilense*, *R. intraradices* más brasinoesteroide y 8) testigo (solo suelo). Cuatro g del inóculo de cada microorganismo, en dependencia del tratamiento, se depositaron en la cavidad donde se colocaría el esqueje al momento del trasplante. El brasinoesteroide (2 mg L^{-1}) se aplicó 28 d después de la siembra y luego cada 14 d.

La planta hospedante de *R. intraradices* fue *Brachiaria decumbens* Stapf en suelo estéril, la colonización alcanzó 95 % en raíces y suelo. Este sustrato se usó como inóculo; cuando se aplicó contenía 40 esporas g^{-1} de suelo más propágulos. El inóculo de *A. brasilense* se obtuvo del Laboratorio de Microbiología de Suelos de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (México), al momento de la inoculación presentaba 9×10^6 células g^{-1} , este se impregnó en la turba como sustrato. El brasinoesteroide CIDEF-4 soluble (Natura del Desierto, S. A. de C. V. en México) tenía 80 % de contenido esteroideal y 10 % i.a., no es tóxico y es compatible con fertilizantes, insecticidas y fungicidas.

El diseño experimental fue completamente al azar con siete repeticiones por tratamiento. La unidad experimental fue una maceta con una planta. Los análisis de N, P, rebaudiosido A y esteviosido se determinaron en hojas deshidratadas con cuatro repeticiones. Los riegos se hicieron con agua destilada. Noventa días después de la siembra se cosecharon las hojas y se determinó su biomasa y contenido de N, P y edulcorantes.

Número de hojas, número de ramas, biomasa y área foliar

El número de hojas y ramas totales se contabilizó; la biomasa seca de las estructuras de la planta se midió en balanza analítica (0.1 mg; Ohaus, NJ, USA), después de deshidratarlos en una estufa, con aire circulante, a 75-80 °C. El área foliar se registró en cm^2 con un integrador de área foliar (LI-COR, LI 3100, USA).

Contenido de edulcorantes en hoja

Los esteviosidos, rebaudiosido A y esteviol se extrajeron de hojas deshidratadas a 60 °C y trituradas en un molino eléctrico. Los compuestos se determinaron por HPLC (Agilent Technologies 1200 Series, California, USA), en columna Zorbax CDB C-18 analítica de 4.6×150 mm y 5 μm de tamaño de partícula, según el método descrito por Hashimoto y Moriyasu (1978), en el

the base for drainage. The treatments were: 1) *A. brasilense*, 2) *R. intraradices*, 3) *A. brasilense* plus *R. intraradices*, 4) Brasinoesteroide, 5) *R. intraradices* plus brassinosteroid, 6) *A. brasilense* plus brassinosteroid, 7) *A. brasilense*, *R. intraradices* plus brassinosteroid and 8) control (only soil). Four g of the inoculum from each microorganism, depending on the treatment, were deposited in the cavity where the cutting would be placed at the time of transplant. The brassinosteroid (2 mg L^{-1}) was applied 28 d after sowing and then every 14 d.

The host plant of *R. intraradices* was *Brachiaria decumbens* Stapf in sterile soil, the colonization reached 95 % in roots and the soil. This substrate was used as inoculum; when it was applied it contained 40 spores g^{-1} of soil plus propagules. The inoculum of *A. brasilense* was obtained from the Soil Microbiology Laboratory of the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (México), at the time of the inoculation presented 9×10^6 cells g^{-1} , and this was impregnated in the peat as substrate. The soluble brassinosteroid CIDEF-4 (Natura del Desierto, S. A. de C. V. in México) had 80 % of the steroidal content and 10 % i.a., is not toxic and is compatible with fertilizers, insecticides and fungicides.

The experimental design was completely random with seven repetitions per treatment. The experimental unit was a pot with one plant. The analysis of N, P, rebaudioside A, and stevioside was determined in dehydrated leaves with four repetitions. The irrigation events were carried out with distilled water. Ninety days after sowing, the leaves were harvested and their biomass and content of N, P and sweeteners were determined.

Number of leaves, number of branches, biomass and leaf area

The total number of leaves and branches was counted; the dry biomass of the plant structures was obtained in an analytical scale (0.1 mg; Ohaus, NJ, USA), after being dehydrated in a stove, with circulating air, at 75-80 °C. The foliar area was recorded in cm^2 with an integrator of foliar area (LI-COR, LI 3100, USA).

Content of sweeteners in leaf

The steviosides, rebaudioside A and steviol were extracted from dehydrated leaves at 60 °C and crushed in an electric mill. The compounds were determined by HPLC (Agilent Technologies 1200 Series, California, USA), in an analytical Zorbax CDB C-18 column of 4.6×150 mm and 5 μm of particle size, according to the method described by Hashimoto and Moriyasu (1978), in the Plant Chemistry Laboratory at Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.

Laboratorio de Fitoquímica del Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.

Contenido de N y P

El contenido de N y P se determinó en el vástago, el N con el método Microkjeldahl y el P con el método de Olsen *et al.* (1954) en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific Modelo 400 ¼), en el laboratorio de Suelo, Agua y Planta de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Chiapas, Huehuetán Chiapas, México.

Colonización micorrízica en raíz

La colonización se cuantificó únicamente en los tratamientos con *R. intraradices*, con la técnica de Phillips y Hayman (1970) en 100 segmentos de raíz, con 1.5-1.6 cm de longitud, y en microscopio óptico con objetivo de inmersión (100 X).

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar y los datos se analizaron mediante ANDEVA, con el procedimiento GLM de SAS (versión 9.0), y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Los valores en porcentaje se transformaron a arco-seno para el análisis estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El número mayor de hojas ($p \leq 0.05$) se registró con la mezcla de *R. intraradices* y brasinoesteroide. La inoculación de los dos microorganismos solos y coinoculados más brasinoesteroide aumentó entre 5 y 13 % el número de hojas respecto al testigo. Los microorganismos y el brasinoesteroide separados no modificaron el número de hojas respecto al testigo (Cuadro 1).

El aumento en el número de hojas por inoculación con *R. intraradices* permite sugerir que la absorción de nutrimentos y agua por el sistema radical incrementó, ya que al aumentar el crecimiento del micelio de estos hongos les permite actuar como extensión de la raíz (Leigh *et al.*, 2009) y favorecer cambios en su fisiología (Barea *et al.*, 2002). El incremento en el número de hojas coincidió con el observado en especies perennes, como *Theobroma cacao* L. (Aguirre-Medina *et al.*, 2007), *Coffea arabica* L. (Sánchez *et al.*, 2005), *Coffea canephora* (Pierre) ex Froehner (Ibarra-Puón *et al.*, 2014) y *Tabebuia donnell-smithii* Rose (Aguirre-Medina *et al.*, 2014).

Content of N and P

The content of N and P was determined in the shoot, the N with the Microkjeldahl method and the P with the Olsen *et al.* (1954) method in a spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Model 400 ¼), at the Soil, Water and Plant Laboratory of the Agricultural Sciences School in Universidad Autónoma de Chiapas, Huehuetán Chiapas, México.

Mycorrhizae colonization in root

The colonization was quantified solely in the treatments with *R. intraradices*, with the Phillips and Hayman (1970) technique in 100 segments of root, with 1.5-1.6 cm length, and in optic microscope with immersion objective (100 X).

Statistical analysis

The experimental design was completely random and the data were analyzed through ANDEVA, with the SAS (version 9.0) GLM procedure, and the means were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$). The values in percentage were transformed to arcus-sine for the statistical analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

The highest number of leaves ($p \leq 0.05$) was found with the mixture of *R. intraradices* and brassinosteroid. The inoculation of the two microorganisms alone and co-inoculated plus brassinosteroid increased between 5 and 13 % the number of leaves compared to the control. The microorganisms and the brassinosteroid separated did not modify the number of leaves with regard to the control (Table 1).

The increase in the number of leaves from inoculation with *R. intraradices* allows suggesting that the absorption of nutrients and water through the radical system increased, since when increasing the growth of the mycelium of these fungi it allows them to act as an extension of the root (Leigh *et al.*, 2009) and to favor changes in their physiology (Barea *et al.*, 2002). The increase in the number of leaves coincided with what was observed in perennial species like *Theobroma cacao* L. (Aguirre-Medina *et al.*, 2007), *Coffea arabica* L. (Sánchez *et al.*, 2005), *Coffea canephora* (Pierre) ex Froehner (Ibarra-Puón *et al.*, 2014) and *Tabebuia donnell-smithii* Rose (Aguirre-Medina *et al.*, 2014).

The brassinosteroid also favored the growth of the leaf and the number of branches. This seems due to

Cuadro 1. Características de desarrollo de plantas de *Stevia rebaudiana* Bert. inoculadas con microorganismos más brasinoesteroides, cultivadas en un suelo fluvisol-eútrico del Soconusco, Chiapas, México.
Table 1. Development characteristics of *Stevia rebaudiana* Bert. plants inoculated with microorganisms plus brassinosteroid, cultivated in fluvisol-euthric soil from del Soconusco, Chiapas, México.

Tratamiento	Número		Peso seco (g planta ⁻¹)			Área foliar (cm ² planta ⁻¹)
	Hojas	Ramas	Raíz	Tallo y ramas	Lámina foliar	
<i>R. intranadices</i>	317±7.8 c	6.71±0.35 bc	1.57±0.08 bcd	4.43±0.05 e	4.76±0.14 cd	1173±47 cd
<i>A. brasilense</i>	310±10.7 c	5.86±0.26 bc	1.75±0.05 abc	4.98±0.18 cde	5.33±0.20 bc	1084±23 d
<i>R. intranadices</i> × <i>A. brasilense</i>	373±9.9 b	6.00±0.30 bc	1.95±0.10 ab	6.22±0.15 b	5.97±0.17 ab	1390±48 b
Brasino-esteroide [†]	339±9.9 bc	5.71±0.47 cd	1.94±0.10 abc	5.88±0.19 bc	4.70±0.19 cde	1179±30 cd
Brasino-esteroide× <i>R. intranadices</i>	516±9.0 a	11.29±0.42 a	2.05±0.08 a	7.31±0.22 a	6.21±0.18 a	1728±58 a
Brasino-esteroide× <i>A. brasilense</i>	246±6.1 d	3.86±0.26 d	1.52±0.12 cd	4.99±0.11 cde	3.91±0.15 e	1151±20 d
Brasino-esteroide× <i>R. intranadices</i> × <i>A. brasilense</i>	344±8.1 bc	7.71±0.56 b	1.64±0.10 abc	5.57±0.30 bcd	5.00±0.25c	1356±50 bc
Testigo	328±10.5 c	6.57±0.57 bc	1.15±0.07 d	4.72±0.29 ed	4.11±0.17 de	1152±54 d
CV [‡]	6.9	16.5	14.6	9.8	9.9	9.1

[†]Brasinoesteroide CIDEF-4. [‡]CV: coeficiente de variación (%). Medias con distinta letra en una hilera son estadísticamente diferentes (Tukey, p≤0.05). [‡]Brassinosteroid CIDEF-4. [‡]CV: coefficient of variation (%). Means with different letter in a line are statistically different (Tukey, p≤0.05).

El brasinoesteroide también favoreció el crecimiento de la hoja y el número de ramas. Esto se debería a cierto estrés, de acuerdo con Núñez y Mazorra (2001) quienes registraron esta respuesta en otras especies en temperaturas tropicales. En nuestro estudio el estrés pudo deberse al cambio de temperatura del sitio de origen austral de estevia (15 y 30 °C) y la del sitio de estudio (hasta 38 °C). El brasinoesteroide es promotor del crecimiento mediante el aumento de la elongación y división celular (Salgado *et al.*, 2008; Clouse, 2011), inductor de termo-tolerancia en *Bromus inermis* (Wilén *et al.*, 1995) y en tomate (*Solanum lycopersicum* Lam.) (Sing y Shono, 2005).

La micorrización de *R. intraradices* en combinación con el brasinoesteroide promovió ($p \leq 0.05$) la acumulación de biomasa respecto a los otros tratamientos; fue 44 y 24 % mayor que en el tratamiento con *R. intraradices* y con brasinoesteroide. La micorrización se ha relacionado con el transporte de nutrientes y agua de lugares donde la raíz no puede explorar (Sylvia, 2005). La inoculación con *R. intraradices* en asociación con brasinoesteroide incrementó el área foliar ($1728 \pm 58 \text{ cm}^2$ por planta) más que el tratamiento con *R. intraradices* más *A. brasilense* ($1390 \pm 48 \text{ cm}^2$ por planta) y que con brasinoesteroide más *R. intraradices* más *A. brasilense* ($1356 \pm 50 \text{ cm}^2$ por planta); estos resultados contrastaron con los valores del testigo ($1152 \pm 54 \text{ cm}^2 \text{ planta}^{-1}$). El número de ramas y el peso de raíz mostraron coeficientes de variación mayores que las demás variables; pero no alcanzaron el 20 % permisible estadísticamente en estudios en campo. Esto indica que el uso de microorganismos y la aplicación de esteroide son eficientes para modificar la fisiología de estevia.

El crecimiento de las plantas aumenta al combinar las bacterias asociativas, como *Azospirillum*, y los hongos micorrízicos (Miller y Jastrow 2000). Este efecto se observó en parcelas de validación de maíz y frijol en México (Aguirre-Medina, 2006; Trabelsi y Mhamdi, 2013). El testigo tuvo la biomasa menor, fue 55 % menor que la del mejor tratamiento.

El incremento inicial de la biomasa en la hoja de *S. rebaudiana* con *R. intraradices* influyó en el aumento en la biomasa total durante todo su desarrollo. Las hojas son fuente principal de fotosintatos para otros órganos de la planta, por lo que su incremento y persistencia favorecen la tasa de asimilación neta y relativa de crecimiento. Cuando los hongos micorrízicos

some stress, according to Núñez and Mazorra (2001) who recorded this response in other species in tropical temperatures. In our study the stress could be due to the change in temperature of the austral place of origin of stevia (15 and 30 °C) and of the study site (up to 38 °C). The brassinoesteroid is a growth promotor through the increase in elongation and cell division (Salgado *et al.*, 2008; Clouse, 2011), thermo-tolerance inductor in *Bromus inermis* (Wilén *et al.*, 1995) and in tomato (*Solanum lycopersicum* Lam.) (Sing and Shono, 2005).

The mycorrhization of *R. intraradices* in combination with the brassinosteroid promoted ($p \leq 0.05$) the accumulation of biomass with regard to the other treatments; it was 44 and 24 % higher than in the treatment with *R. intraradices* and with brassinosteroid. The mycorrhization has been related to the transport of nutrients and water to places where the root cannot be explored (Sylvia, 2005). The inoculation with *R. intraradices* in association with brassinosteroid increased the foliar area ($1728 \pm 58 \text{ cm}^2$ per plant) more than the treatment with *R. intraradices* plus *A. brasilense* ($1390 \pm 48 \text{ cm}^2$ per plant) and with brassinosteroid plus *R. intraradices* plus *A. brasilense* ($1356 \pm 50 \text{ cm}^2$ per plant); these results contrasted with the values of the control ($1152 \pm 54 \text{ cm}^2 \text{ plant}^{-1}$). The number of branches and the root weight showed higher coefficients of variation than the other variables, although they did not reach the statistically permissible 20 % in field studies. This indicates that the use of microorganisms and the application of steroids are efficient to modify the physiology of stevia.

Plant growth is increased when combining associative bacteria, such as *Azospirillum*, and mycorrhizae fungi (Miller and Jastrow 2000). This effect was observed in validation plots of maize and bean in México (Aguirre-Medina, 2006; Trabelsi and Mhamdi, 2013). The control had 55 % lower biomass than that of the best treatment.

The initial increase of biomass in the leaf of *S. rebaudiana* with *R. intraradices* influenced the increase in total biomass during its whole development. The leaves are a principal source of photosynthates for other organs of the plant, which is why their increase and persistence favor the net rate of assimilation and relative rate of growth. When the mycorrhizae fungi favor the nutrition of plants, the photosynthetic rate improves (Wright *et al.*, 2005). This fact, according to

favorecen la nutrición de las plantas la tasa fotosintética mejora (Wright *et al.*, 2005). Este hecho, según Milthorpe y Moorby (1982), establece una relación positiva entre el suministro de nutrientes minerales y la tasa de fotosíntesis, la cual influye en todo el complejo fotosintético.

Contenido de edulcorantes

Las plantas de *S. rebaudiana* inoculadas con *R. intraradices* en presencia de brasinoesteroide presentaron significativamente ($p \leq 0.05$) más esteviosido (35.8 ± 1.76) que los otros tratamientos. En el mismo grupo estadístico estuvieron el tratamiento con los dos microorganismos más el brasinoesteroide (32.2 ± 1.12) y con *A. brasilense* sin combinar (29.7 ± 1.28). (Cuadro 2). Los hongos micorrízicos arbusculares incrementan la absorción de nutrientes, principalmente P, que es parte esencial de moléculas como uridin difosfato glucosa que es donadora de glucosa en la síntesis de los glucósidos de diterpeno (Shibata *et al.*, 1995; Richardson *et al.*, 2009).

Azospirillum aumenta el desarrollo radical de la planta hospedante mediante las hormonas producidas y la fijación del N (Bashan y De Bashan, 2010) necesario para el crecimiento normal de las plantas (Jarma *et al.*, 2010).

Las plantas en presencia de los hongos endomicorrízicos pueden modificar su contenido de esteviosidos

Milthorpe and Moorby (1982), establishes a positive relationship between the supply of mineral nutrients and rate of photosynthesis, which influences the whole photosynthetic complex.

Content of sweeteners

The *S. rebaudiana* plants inoculated with *R. intraradices* in presence of brassinosteroid presented significantly ($p \leq 0.05$) more stevioside (35.8 ± 1.76) than the other treatments. The treatment with the two microorganisms plus the brassinosteroid (32.2 ± 1.12), and with *A. brasilense* without combining (29.7 ± 1.28) were in the same statistical group (Table 2). The arbuscular mycorrhizae fungi increase the absorption of nutrients, primarily P, which is an essential part of molecules like uridine diphosphate glucose which is a glucose donator in the synthesis of diterpene glucosides (Shibata *et al.*, 1995; Richardson *et al.*, 2009).

Azospirillum increases the root development of the host plant through the hormones produced and N fixation (Bashan and De Bashan, 2010), something necessary for the normal growth of plants (Jarma *et al.*, 2010).

The plants in presence of endomycorrhizae fungi can modify their content of steviosides and isoflavonoids (Hanan *et al.*, 2008). Portugal *et al.* (2006) observed a higher concentration of stevioside (72 mg per plant) in stevia plants inoculated with

Cuadro 2. Contenido de edulcorantes en hojas de *Stevia rebaudiana* Bert. inoculada con *R. intraradices*, *A. brasilense* y aspersión foliar de brasinoesteroide.

Table 2. Content of sweeteners in *Stevia rebaudiana* Bert. leaves inoculated with *R. intraradices*, *A. brasilense* and leaf spraying with brassinosteroid.

Tratamientos	Mg g de peso seco ⁻¹			
	Esteviosido	Rebaudiósido A	Esteviol	Total edulcorantes
<i>R. intraradices</i>	21.5±0.76 d	17.7±0.90 a	1.6±0.12 a	40.9±1.47 b
<i>A. brasilense</i>	29.7±1.28 abc	26.3±6.66 a	1.1±0.66 a	57.2±7.78 ab
<i>R. intraradices</i> × <i>A. brasilense</i>	25.8±1.56 cd	17.4±3.19 a	5.0±0.98 a	48.2±4.12 ab
Brasinoesteroide [†]	27.2±1.14 bcd	21.9±5.72 a	1.6±0.96 a	50.8±5.32 ab
Brasinoesteroide× <i>R. intraradices</i>	35.8±1.76 a	27.9±2.23 a	4.5±1.20 a	68.4±4.84 a
Brasinoesteroide× <i>A. brasilense</i>	29.4±1.06 bc	29.5±3.61 a	4.2±1.18 a	63.2±5.10 ab
Brasinoesteroide× <i>R. intraradices</i> × <i>A. brasilense</i>	32.2±1.12 ab	35.1±7.84 a	1.5±0.88 a	68.8±9.41 a
Testigo	25.0±1.4 cd	17.8±0.60 a	1.5±0.90 a	44.9±2.00 b
CV [‡]	2.6	37.8	68.9	20.2

[†]Brasinoesteroide CIDEF-4. [‡]CV (%): coeficiente de variación. Medias con distinta letra en una hilera son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). [‡]Brassinosteroid CIDEF-4. [‡]CV (%): coefficient of variation. Means with different letter in a line are statistically different (Tukey, $p \leq 0.05$).

e isoflavonoides (Hanan *et al.*, 2008). Portugal *et al.* (2006) observaron concentración mayor de esteviosido (72 mg por planta) en plantas de estevia inoculadas con *R. intraradices*, en comparación con las plantas testigo (16 mg planta⁻¹) sin inocular. En el presente caso, los valores mayores de esteviosido representaron 50 % con *R. intraradices* más brasinoesteroide.

El coeficiente de variación mostró variabilidad alta del contenido de rebaudiosido A y esteviol y la diferencia entre los tratamientos no sugieren una relación en su biosíntesis; es decir, la correlación del contenido de esteviosidos y el de rebaudiosidos no es significativa, aunque los glucósidos comparten camino metabólico con el rebaudiosido A (Madan *et al.*, 2010). Los contenidos bajos del esteviol mostraron CV alto; pero, resaltaron los contenidos de las plantas inoculadas con microorganismos y brasinoesteroide (5.0 ± 0.98 , 4.5 ± 1.2 , 4.2 ± 1.18).

Las plantas micorrizadas generalmente absorben cantidades mayores de micronutrientes, como Mn (Pacovsky *et al.*, 1985), que es cofactor de enzimas que intervienen en la síntesis del ácido entkaurenoico. Este es el precursor de los principales edulcorantes, como el esteviosido en estevia (Jarma *et al.*, 2010); además, S, Cu, Zn and Fe (Habte y Aziz, 1985).

Jarma *et al.* (2010) señalaron que el esteviosido puede variar de 3 a 8 % en el tejido seco de las hojas de estevia. Las diferencias estadísticas se presentaron solamente con el esteviosido y el valor mayor se registró con la aplicación de brasinoesteroide más *R. intraradices* ($p \leq 0.05$) con los microorganismos inoculados solos, más el brasinoesteroide.

El contenido de edulcorantes, nutrientes y biomasa aumentó con la aplicación de brasinoesteroide. Esto indica la posibilidad de que las plantas de estevia estén estresadas, posiblemente por la temperatura de la región de estudio. Sing y Shono (2005) trataron plantas de jitomate con 24 epibrasinolida y reportan mayor tolerancia a 38 °C y mayor eficiencia fotosintética en comparación con las plantas tratadas a 25 °C.

Contenido de N y P

Las plantas inoculadas con cada microorganismo o su combinación presentaron contenido de N mayor en comparación con las plantas testigo y cuando se aplicó brasinoesteroide (Figura 1). El contenido de N aumentó y fue estadísticamente diferente del testigo ($p \leq 0.05$) al inocular *A. brasilense* más el

R. intraradices, compared to the control plants (16 mg plant⁻¹) without inoculating. In this case, the highest values of stevioside represented 50 % with *R. intraradices* plus brassinosteroid.

The coefficient of variation showed high variability of the content of rebaudioside A and steviol, and the difference between the treatments does not suggest a relation in their biosynthesis; that is, the correlation of the content of steviosides and of rebaudiosides is not significant, although the glucosides share a metabolic path with rebaudioside A (Madan *et al.*, 2010). The low contents of steviol showed high CV, although the contents of the plants inoculated with microorganisms and brassinosteroid stood out (5.0 ± 0.98 , 4.5 ± 1.2 , 4.2 ± 1.18).

Mycorrhizal plants generally absorb higher amounts of micronutrients, such as Mn (Pacovsky *et al.*, 1985), which is a cofactor of enzymes that intervene in the synthesis of entkaurenoic acid. This is the precursor of the main sweeteners, such as stevioside in stevia (Jarma *et al.*, 2010); in addition, S, Cu, Zn and Fe (Habte and Aziz, 1985).

Jarma *et al.* (2010) pointed out that the stevioside can vary from 3 to 8 % in the dry tissue of stevia leaves. The statistical differences were present only with the stevioside and the highest value was found with the application of brassinosteroid plus *R. intraradices* ($p \leq 0.05$) with the inoculated microorganisms alone, plus the brassinosteroid.

The content of sweeteners, nutrients and biomass increased with the application of brassinosteroid. This indicates the possibility of stevia plants being stressed, possibly from the temperature of the study region. Sing and Shono (2005) treated tomato plants with 24 epibrasinolide and reported higher tolerance at 38 °C and higher photosynthetic efficiency in comparison to the plants treated at 25 °C.

Content of N and P

The plants inoculated with each microorganism or their combination presented a higher content of N compared to the control plants and when brassinosteroid was applied (Figure 1). The content of N increased and was statistically different from the control ($p \leq 0.05$) when inoculating *A. brasilense* plus the brassinosteroid. *A. brasilense* induces root growth in the host plant as a result of the production of plant hormones (Hungria *et al.*, 2004), such as indole-

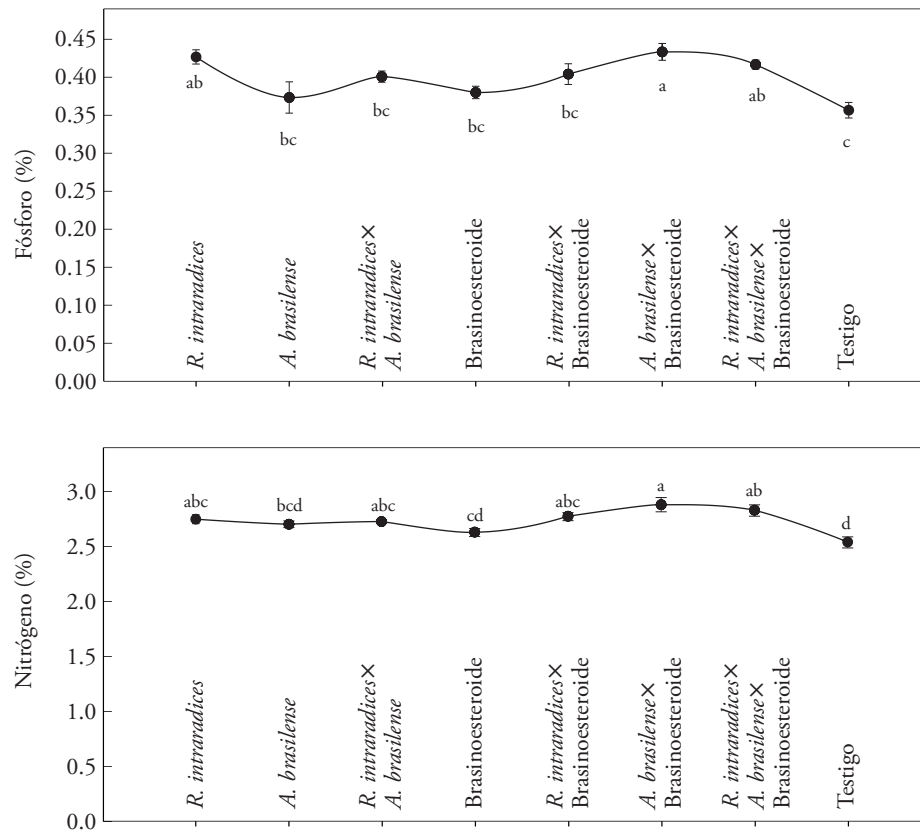


Figura 1. Porcentaje de fósforo (P) y nitrógeno (N) en hojas de *S. rebaudiana* Bert. biofertilizada con *R. intraradices*, *A. brasilense* y aplicación foliar de CIDEF-4 (brasinoesteroid) en condiciones de vivero ($n=4$) $\pm$ error estándar. Letras diferentes en cada tratamiento (N o P) son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). CV=2.6 % para N y CV = 5.8 % para P.

Figure 1. Percentage of phosphorus (P) and nitrogen (N) in *S. rebaudiana* Bert. leaves biofertilized with *R. intraradices*, *A. brasilense* and foliar application of CIDEF-4 (brassinosteroid) under greenhouse conditions ($n=4$) $\pm$ standard error. Different letters in each treatment (N or P) are statistically different ($p \leq 0.05$). CV=2.6 % for N and CV=5.8 % for P.

brasinoesteroid. *A. brasilense* induce crecimiento radical en la planta hospedera como resultado de la producción de fitohormonas (Hungria *et al.*, 2004), como ácido indolacético (Dobbelaere *et al.*, 2003; Bashan y de Bashan, 2010), que modifica la morfología e incrementan la biomasa radical (Lalitha *et al.*, 2011). Los hongos endomicorrízicos transportan N a través de la hifa desde sitios del suelo que son inaccesibles para la raíz (Hodge 2003). La inoculación con hongos endomicorrízicos en cultivo de *Phaseolus* sp., (Tajini y Drevon, 2012), *Coffea arabica* L. (Aguirre-Medina *et al.*, 2011) y *Cedrela odorata* L. (Aguirre-Medina *et al.*, 2014) mostró resultados similares. El contenido mayor de P en el tejido vegetal se registró en el tratamiento con *A. brasilense* y al adicionar brasinoesteroid

acetic acid (Dobbelaere *et al.*, 2003; Bashan and de Bashan, 2010), which modifies the morphology and increases the root biomass (Lalitha *et al.*, 2011). Endomycorrhizae fungi transport N through the hyphae from sites of the soil that are inaccessible for the root (Hodge 2003). The inoculation with endomycorrhizae fungi in crops of *Phaseolus* sp. (Tajini and Drevon, 2012), *Coffea arabica* L. (Aguirre-Medina *et al.*, 2011) and *Cedrela odorata* L. (Aguirre-Medina *et al.*, 2014) showed similar results. The highest content of P in the plant tissue was found in the treatment with *A. brasilense* and when adding brassinosteroid ($p \leq 0.05$). Other studies have shown that mycorrhizal plants absorb the P from the soil efficiently in comparison to non-colonized plants

($p \leq 0.05$). Otros estudios han demostrado que las plantas micorrizadas absorben eficientemente el P del suelo en comparación con las plantas no colonizadas (Andrade *et al.*, 2009) de regiones del suelo más allá de la zona de agotamiento alrededor de la raíz (Wright *et al.*, 2005).

La colonización radical de todas las plantas inoculadas *R. intraradices* fue alta. En promedio, la colonización fue de 83 al 90 %. En el caso del testigo sin aplicación del hongo endomicorrízico la colonización radical fue 52 %. La colonización radical en el tratamiento testigo y en el tratamiento con brasinoesteroide o *A. brasilense* seguramente se debe a micorrizas nativas que se encuentran en el sustrato.

CONCLUSIONES

Plantas de *S. rebaudiana* inoculadas y en presencia de brasinoesteroide, en modalidad diferente de asociación, mostraron cierto aumentos del área foliar y contenido de esteviosido, rebaudiosido y esteviol. El contenido de N y P aumentó con *R. intraradices* inoculado solo y más brasinoesteroide.

LITERATURA CITADA

- Aguirre-Medina, J. F. 2006. Biofertilizantes microbianos: Experiencias agronómicas del programa nacional del INIFAP en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Centro de Investigaciones Regionales Pacífico Sur-Campo Experimental Rosario Izapa. Primera Edición. México. 206 p.
- Aguirre-Medina, J. F., A. Mendoza-López, J. Cadena-Iñiguez, y C. H. Avendaño-Arrazate. 2007. Efecto de la biofertilización en vivero del cacao (*Theobroma cacao*) con *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg & Döbereiner y *Glomus intraradices* Schenk & Smith. Interciencia 32: 541-546.
- Aguirre-Medina, J. F., D. M. Moroyoqui-Ovilla, A. Mendoza-López, J. Cadena-Iñiguez, J., C. H. Avendaño-Arrazate, y J. F. Aguirre-Cadena. 2011. Aplicación de *A. brasilense* y *G. intraradices* a *Coffea arabica* en vivero. Agron. Mesoam. 22: 71-80.
- Aguirre-Medina, J. F., F. O. Mina-Briones, J. Cadena-Iñiguez, J. D. Dardón-Zunún, y D. A. Hernández-Sedas. 2014. Crecimiento de *Cedrela odorata* L. biofertilizada con *Rhizophagus intraradices* y *Azospirillum brasilense* en vivero. Rev. Chapingo Ser. Cienc. For. Ambient. 20: 177-186.
- Andrade, S. A. L., P. Mazzafera, M.A. Schivinato, and A. P. D. Silveira. 2009. Arbuscular mycorrhizal association in coffee. J. Agric. Sci. 147: 105-115.
- Anton, S. D., C. K. Martin, H. Han, S. Coulon, W. T. Cefalu, P. Geiselman, and D. A. Williamson. 2010. Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. Appetite 55: 37-43.
- (Andrade *et al.*, 2009) from soil regions beyond the zone of exhaustion around the root (Wright *et al.*, 2005).
- The root colonization of all plants inoculated with *R. intraradices* was high. In average, the colonization was 83 to 90 %. In the case of the control without application of the endomycorrhizae fungus, the root colonization was 52 %. The root colonization in the control treatment and in the treatment with brassinosteroid or *A. brasilense* is surely due to native mycorrhizae that are found in the substrate.

CONCLUSIONS

S. rebaudiana plants inoculated and in presence of brassinosteroid, in different modes of association, showed certain increases in foliar area and in content of stevioside, rebaudioside and steviol. The content of N and P increased with *R. intraradices* inoculated alone and plus brassinosteroid.

—End of the English version—



- Barea, J. M., R. Azcón, and C. Azcón-Aguilar. 2002. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. Anton. Leeuw. Int. J. G. Molecular Microbiol. 81: 343-351.
- Bashan Y., and E. de-Bashan Luz. 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth —A critical assessment. Adv. Agron. 108: 77-136.
- Bouyoucos, G. J. 1962. Hydrometer method improved for making particle size analysis. Agron. J. 54: 464-465.
- Brandle, J. E., and P. G. Telmer. 2007. Steviol glycoside biosynthesis. Phytochemistry 68: 1855-1863.
- Brandt, K., and J. P. Møgaard. 2001. Organic agriculture: does it enhance or reduce the nutritional value of plant foods? J. Sci. Food Agric. 81: 924-931.
- Clouse, S. D. 2011. Brassinosteroids. In: The Arabidopsis Book. American Society of Plant Biologists. 28 p. doi: 10.1199/tab.0151
- Dacome, A., D. A. C. Silva, D. A. C. Costa, J. Fontana, J. Adelman, and D. A. S. Costa. 2005. Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Berton: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods. Process Biochem. 40: 3587-3594.
- Das, K., R. Dang, T. N. Shivananda, and N. Sekeroglu. 2007. Influence of biofertilizers on the biomass yield and nutrient content in *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bert.) grown in Indian subtropics. J. Med. Plants Res. 1: 5-8.
- Das, K., R. Dang, and T. N. Shivananda. 2008. Influence of biofertilizers on the availability of nutrients (N, P and K) in soil

- in relation to growth and yield of *Stevia rebaudiana* grown in South India. *Int. J. Appl. Res. Nat. Prod.* 1: 20-24.
- Dobbelaere, S., J. Vanderleyden, and Y. Okon, 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit. Rev. Plant Sci.* 22: 107-149.
- Durán, A., S. N. M. Rodríguez, K. A. Cordón, y C. J. Record. 2012. *Estevia (Stevia rebaudiana)*, edulcorante natural y no calórico. *Rev. Chil. Nutr.* 39: 203-206.
- Gardana, C., M. Scaglianti, and P. Simonetti. 2010. Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 8: 1537-1555.
- Habte, M., and T. Aziz. 1985. Response of *Sesbania grandiflora* to inoculation of soil with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 5: 701-703.
- Hanan, A. A. T., R. El-Mergawi, and S. Radwan. 2008. Isoflavonoids, flavonoids, phenolic acids profiles and antioxidant activity of soybean seeds as affected by organic and bioorganic fertilization. *Am.-Eurasian J. Agri. Environ. Sci.* 4: 207-213.
- Hashimoto, Y., and M. Moriyasu. 1978. Determination of sweet components in *Stevia rebaudiana* by high performance liquid chromatography ultraviolet detection. *Shoyakugaku* 32: 209-11.
- Hodge, A. 2003. Plant nitrogen capture from organic matter as affected by spatial dispersion, interspecific competition and mycorrhizal colonization. *New Phytol.* 157: 303-314.
- Hungria, M., R. J. Campo, E. M. Souza, and F. O. Pedrosa. 2004. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 331: 413-425.
- Ibarra-Puón, J. C., J. F. Aguirre-Medina, A. Ley-De Coss, J. Cadena-Itigüez, A. Zavala-Mata. 2014. Inoculación de *Coffea canephora* (Pierre) ex Froehner con *Rhizophagus intraradices* (Schenck et Sm.) Walker et Schuessler y *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg et Döbereiner en vivero. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 20: 201-213.
- Irigoyen, J. J., D. W. Emerich, and M. Sánchez-Díaz. 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugar in nodulate alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiol. Plant.* 84: 55-60.
- Jaitak, V., A. Gupta, V. Kaul y P. Ahuja. 2008. Validated high-performance thin-layer chromatography method for steviol glycosides in *Stevia rebaudiana*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47: 790-794.
- Jarma, A., C. E. M. Combatt, y I. J. A. Cleves. 2010. Aspectos nutricionales y metabolismo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Una revisión. *Agron. Colomb.* 28: 199-208.
- Lalitha, S., K. Rajeshwaran, P. Senthil Kumar, and S. Deepa. 2011. Role of AM fungi and rhizobial inoculation for reclamation of phosphorus deficient soil. *Asian J. Plant Sci.* 10: 227-232.
- Leigh, J., A. Hodge, and A. H. Fitter. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi can transfer substantial amounts of nitrogen to their host plant from organic material. *New Phytol.* 181: 199-207.
- Liu, J., L. Jin-Wei, and T. Jian. 2010. Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from *Stevia rebaudiana* Bertoni and identification of extracts. *Food Bioprod. Process.* 88: 215-221.
- Madan, S., S. Ahmad, G. N. Singh, K. Kohli, Y. Kumar, R. Singh, and M. Garg. 2010. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: A Review. *Indian J. Nat. Products Res.* 1: 267-286.
- Midmore, D. J., and A. H. Rank. 2002. A new rural industry *Stevia* to replace imported chemical sweeteners. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. RIRDC Web Publication No W02/022. Australia. 55 p.
- Miller, R., and J. Jastrow. 2000. Mycorrhizal fungi influence soil structure. In: Kapulnik Y., and D. D. Douds (eds). *Arbuscular Mycorrhizae: Molecular Biology and Physiology*. Kluwer Academic Press. Dordrecht, the Netherlands. pp: 3-18.
- Milthorpe, F. L., y J. Moorby. 1982. Introducción a la Fisiología de los Cultivos. Segunda edición. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires Argentina. 259 p.
- Núñez, M., y L. M. Mazorra. 2001. Los brasinoesteroides y la respuesta de las plantas al estrés. *Cultivos Trop.* 22: 19-26.
- Olsen, S. R., Cole, C.V., Watanabe, F. S., y L. A. Dean. 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. *USDA circ.* 939.
- Pacovsky, R. S., E. A. Paul, and G. J. Bethlenfalvay. 1985. Nutrition of sorghum plants fertilized with nitrogen or inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Plant Soil* 85: 145-148.
- Phillips, J. M., and D. J. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- Portugal, E. P., G. C. Mercuri Quitério, and S. L. Honório. 2006. Seleção de fungos micorrízicos arbusculares para estevia, *Stevia Rebaudiana* (Bert.) Bertoni. *Multiciencia* 7: 1-20.
- Prakash, I., G. E. Dubois, J. F. Clos, K. L. Wilkens, and L.E. Fosdick. 2008. Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener. *Food Chem. Toxicol.* 46: S75-S82.
- Ramírez-Jaramillo, G., B. W. Aviles, O. Y. Moguel, G. S. Góngora, y L. C. May. 2011. *Estevia (Stevia rebaudiana Bertoni)*, un cultivo con potencial productivo en México. Primera edición. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Sureste. Mérida, Yucatán, México. 88 p.
- Reyes, Y., L. M. Mazorra, y M. Núñez. 2008 Aspectos fisiológicos y bioquímicos de la tolerancia del arroz al estrés salino y su relación con los brasinoesteroides. *Cult. Trop.* 29: 67-75.
- Richardson, A. E., J. M. Barea, A. M. Mc Neill y C. Prigent-Combaret. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* 321:305-339.
- Riipi, M., V. Ossipova, K. Lempa, J. Haukioja, S. Ossipova, and K. Pihlaja, 2002. Seasonal changes in birch leaf chemistry: are there tradeoffs between leaf growth and accumulation of phenolics. *Oecologia* 130: 380-390.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2016. Nota de prensa núm. 270. Trabaja SAGARPA para mitigar efectos del cambio climático en México. Fecha de publicación 14 de junio de 2016. <https://www.gob.mx/sagarpa/prensa/trabaja-sagarpa-para-mitigar-efectos-del-cambio-climatico-en-mexico> (Consulta: octubre 2016).
- Salgado G. R., M. A. Cortés R., y R. E. Del Río 2008. Uso de brasinoesteroides y sus análogos en la agricultura. *Biológicas* 10: 18-27,

- Sánchez, L., S. Weidmann, C. Arnould, A. R. Bernard, S. Gianinazzi, S., y V. Gianinazzi-Pearson. 2005. *Pseudomonas fluorescens* and *Glomus mosseae* Trigger DMI3-Dependent activation of genes related to a signal transduction pathway in roots of *Medicago truncatula*. Plant Physiol 139: 1065-1077.
- Shibata, H., Y. Sawa, T. Oka, S. Sonoke, K. Kim, y M. Yoshioka. 1995. steviol and steviol-glycoside: glucosyltransferase activities in *Stevia rebaudiana* Bertono —Purification and partial characterization. Arch. Biochem. Biophys. 321: 390-396.
- Singh, I., and M. Shono. 2005. Physiological and molecular effects of 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, on thermotolerance of tomato. Plant Growth Regul. 47: 111-119.
- Sylvia, M. D. 2005. Mycorrhizal symbioses In: Sylvia, M. D., J. J. Fuhrmann, G. P. Hart, and A. D. Zuberer (eds). Principles and Applications of Soil Microbiology. Second Edition, Pearson Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey, USA. pp: 263-282.
- Tajini, F., and J. J. Drevon. 2012. Phosphorus use efficiency in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as related to compatibility of association among arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia. Afr. J. Biotechnol. 11: 12173-12182.
- Trabelsi, D., and R. Mhamdi. 2013. Microbial inoculants and their impact on soil microbial communities: a review. BioMed Res. Int. ID 863240: 1-11.
- Walkley, A., and I.A. Black, 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Sci. 37: 29-38.
- Wilén, R.W., M. Sacco, V. G. Lawrence, and P. Krishna. 1995. Effects of 24-epibrassinolide on greening and thermo tolerance of brome grass (*Bromus inermis*) cell cultures. Physiol Plantarum 95: 195-202.
- Wright, D. P., J. D. Scholes, D. J. Read, and S. A. Rolfe. 2005. European and African maize cultivars differ in their physiological and molecular responses to mycorrhizal infection. New Phytol. 167: 881-896.