



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES IZTACALA**

**“BACTERIAS PROMOTORAS DE LA GERMINACIÓN
DE *STEVIA SP.*”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO**

PRESENTA: KARLA TERESA LARIOS CASTRO

**DIRECTOR DE TESIS
Dr. Salvador Rodríguez Zaragoza**

Los Reyes Iztacala, Edo. De México, febrero 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme permitido ser parte de ella, ya que gracias a mi estancia durante estos años me forjó el corazón y la mente para esforzarme por ser mejor persona y mejor profesional cada día.

A mi director el Dr. Salvador Rodríguez Zaragoza por su apoyo incondicional, charlas y unos buenos torzones que alentó mi espíritu universitario a nunca darme por vencida y poder terminar el presente trabajo.

Por que como un día me dijo: “Los sueños son para cumplirse.”

Me queda agradecerle por la paciencia, tolerancia y sobre todo por el amor y dedicación a su trabajo que hace mejores seres de nosotros sus pupilos.

Al comité de sinodales que durante este “largo lapso” estuvieron conmigo apoyándome incondicionalmente para que este trabajo llegara a su fin. Su esfuerzo y dedicación de cada uno de ustedes es para mí un gran aprendizaje, así como un honor. Gracias por haber podido trabajar juntos y aceptarme como parte de su equipo.

Con mucho cariño:

MTRO. RAMON VICTOR MORENO TORRES

DRA. TERESA GONZALEZ RUIZ

MTRA. JOSEFINA VAZQUEZ MEDRANO

DR. VICTOR MANUEL RIVERA AGUILAR

DEDICATORIAS

En esta etapa de mi vida he tenido pocos y muchos logros que me han permitido aceptarme y darme cuenta de todos aquellos seres que han estado junto a mí en este camino.

Este trabajo construido con mi esfuerzo y dedicación está dedicado a:

Mi madre María Estela Castro Pérez por su dedicación y perseverancia que siempre tuvo para mí, porque nunca voy a poder agradecer todo el amor que me ha dado, por eso este trabajo también es parte de ella.

A mis hermanos Ricardo Larios y Abraham Larios porque siempre han estado conmigo en mi corazón por ser un ejemplo día con día y a quienes nunca dejare de admirar.

A mi compañero y amor de vida Jaime Esparza y a mi hijo Dante por todos los días darme el amor incondicional, confianza, gratitud, así como enseñarme que el amor es lo mejor en este pequeño momento de vida, gracias por los ánimos de ser una mejor persona, una mejor mujer y sobre todo animarme para superarme profesionalmente. Infinitas gracias por ser mi familia pingüino.

A los profesores que conocí durante toda la carrera porque me enseñaron dedicación, constancia y amor a la biología.

Que con su virtud de enseñar me demostraron el arte de la enseñanza.

Por último, pero no menos importante a mis compañeros de la banda micro por su ayuda y aceptación en el laboratorio.

A mi cómplice y fiel amiga Mariela.

ITZEL Y Karina por ser el mejor equipo de trabajo cuando entré a la facultad.

A la familia Castro y a todos mis amigos que encontré en el camino.

Sin el apoyo de todos ustedes este sueño seguiría siendo solo eso.

Con mucho Cariño y amor.

Karla Larios.

INDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. OBJETIVOS.....	7
3.1 Objetivo general.....	7
3.2 Objetivos particulares.....	7
4. MATERIAL Y MÉTODO.....	8
4.1 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL SUELO.....	8
4.2 OBTENCIÓN DE SEMILLAS DE <i>STEVIA SP.</i>	8
4.3 LIMPIEZA Y SELECCIÓN DE SEMILLAS.....	9
4.4.1 Prueba Preliminar	9
4.4.2 PRUEBA DE TETRAZOLIO.....	9 y 10
4.4.3 Preparación extracto-suelo.....	10
4.4.4 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS U.T.O.S DE BACTERIAS CULTIVABLES.....	10 y 11
4.4.4.1 Conteo de bacterias.....	11
4.4.4.2 Compatibilidad de U.T.O.S.....	11
4.4.4.3 Germinación pruebas con U.T.O.S.....	12
4.4.4.4 TIEMPO MEDIO DE GERMINACIÓN.....	12
4.4.4.4.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA PORCENTAJES DE GERMINACIÓN..	12
5. RESULTADOS.....	13
5.1 Condiciones de inicio (por lote de semillas) Tasa de germinación sin inóculo bacteriano.....	13
5.2 Viabilidad de las semillas no germinadas por lote.....	14
5.3 UNIDADES TAXONOMICAS OPERATIVAS.....	14
5.4 COMPATIBILIDAD BACTERIANA.....	16

5.5 Efecto de las U.T.O.S sobre la germinación.....	17
5.5.1 Efecto de las U.T.O.S combinadas sobre la germinación.....	17
5.5.2 TIEMPO MEDIO DE GERMINACIÓN.....	21
6. DISCUSIÓN.....	23
7. CONCLUSIÓN.....	26
8. BIBLIOGRAFÍA.....	26
9. ANEXOS.....	31
ANEXO 1.....	31
ANEXO 2	34

Amar, amar, amar, amar siempre, con todo
el ser y con la tierra y con el cielo,
con lo claro del sol y lo oscuro del lodo:
Amar por toda ciencia y amar por todo anhelo.

Y cuando la montaña de la vida
nos sea dura y larga y alta y llena de abismos,
Amar la inmensidad que es de amor encendida
¡y arder en la fusión de nuestros pechos mismos!

Rubén Darío

1. Resumen

El cultivo de *Stevia sp.* muestra algunas dificultades tales como el proceso reproductivo y el establecimiento de las plántulas, lo que se agrava con la baja tasa de germinación y la susceptibilidad de la planta a las variaciones del clima. Estas particularidades son de capital importancia para la introducción exitosa de este cultivo económicamente rentable en zonas donde hasta el momento se han mantenido los cultivos tradicionales de maíz.

La diversidad microbiana de suelo juega un papel crítico en el funcionamiento de los ecosistemas porque participan en un gran número de procesos. La actividad de los microorganismos como promotores del crecimiento vegetal (BPCV) está relacionada con una combinación particular de factores físicos y biológicos de los que depende la provisión de servicios indispensables para la agricultura sustentable. Por ello, la inoculación de microorganismos benéficos sobre semillas permitiría mejorar los rendimientos de los cultivos.

Por lo que en este trabajo se abordó la siguiente pregunta ¿Existirán bacterias estimulantes de la germinación de *Stevia sp.* en el suelo de cultivo de temporal de maíz?

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de las diferentes Unidades Taxonómicas

Operativas cultivables de un suelo de maíz en la germinación de *Stevia sp.* Para ello, se inocularon 100 µl de cada U.T.O sola, o 50 µl de cada U.T.O que formaron, parejas inoculadas para conocer si aumentaban el porcentaje de germinación.

La U.T.O 12 aumentó significativamente la germinación. Asimismo, las U.T.O.S 1 y 15 produjeron un porcentaje de germinación significativamente mayor. La U.T.O 14 y la 6 produjeron un porcentaje significativamente mayor. La U.T.O 14 Y 6 redujeron tiempo medio de germinación de *Stevia sp.* Estos resultados indican que el suelo donde se tomaron las muestras podría transformarse a exitosamente en cultivo de *Stevia sp.*

2. Introducción

La productividad de los cultivos está determinada en gran parte por la fertilidad del suelo (Barea 1991); la cual se evalúa con base en sus características físicas, químicas y biológicas que dependen de la interacción con las plantas. Así, las comunidades vegetales son la base de los agrosistemas que contribuyen con la estabilidad del suelo (Mary *et al.*, 1996).

La multifuncionalidad de los microorganismos en los sistemas agrícolas condiciona la composición microbiológica y enmarca la interacción planta-microorganismo y viceversa. Igualmente, los factores abióticos, como el clima y las características físicas y químicas del suelo, modulan la interacción que se dará a nivel microbiano y la expresión de sus efectos benéficos o detrimentales en el desarrollo de las especies vegetales (Marschner y Timonen 2005; Harman 2006; Hoitink *et al.*, 2006; Siddiqui y Akhtar, 2008; Radjacommare *et al.*, 2010).

La actividad de los microorganismos rizosféricos, como agentes de control biológico (ACB) y como promotores del crecimiento vegetal (BPCV), depende de la adecuada combinación de los factores fisicoquímicos y biológicos. Sin embargo, las interacciones entre los microorganismos son complejas y se pueden presentar efectos sinérgicos que potencialicen los beneficios para la planta o, por el contrario, efectos antagónicos al desarrollo vegetal o, simplemente, que no ocurra ningún efecto (Cano, 2011). Así, la diversidad microbiana del suelo juega un papel crítico en el funcionamiento de los ecosistemas porque participa en gran número de procesos (Smit *et al.*; 1997, Duchiacela *et al.*; 2012).

Las comunidades microbianas asociadas con el sistema de raíces desempeñan un papel clave en el desarrollo de prácticas agrícolas benéficas. Sin embargo, la respuesta de las plantas a la inoculación con cepas bacterianas específicas depende de las compatibilidades funcionales de éstas con la fisiología y con la bioquímica desarrollada durante la interacción planta-microorganismo, así como de las interacciones entre los componentes microbianos autóctonos e introducidos. Por ello, puede haber diferentes

respuestas de las plantas cultivadas dependiendo de la combinación de los microorganismos con la calidad de las semillas utilizadas (Vázquez *et al.*, 2000).

Las BPCV pueden mejorar el crecimiento de la planta mediante el aporte de macro y micronutrientes (Jaising *et al.*, 2016; Khan y Bano, 2016), y con la síntesis de hormonas y factores que estimulen el crecimiento vegetal. Así, la inoculación de microorganismos benéficos sobre las semillas permite mejorar el rendimiento del cultivo. Sin embargo, la producción centralizada y el comercio mundial de semillas pueden contribuir a la homogeneidad del microbioma de la planta en escala global y por ello a la simplificación de la biodiversidad de este último. Los análisis de microbiomas son un primer paso para obtener una mejor comprensión de la identidad de los microorganismos benéficos para la germinación de semillas.

Díaz *et.al.* (2001) encontraron que *Pseudomona aeruginosa* redujo la germinación de semillas de lechuga, aunque discuten que esto puede estar relacionado a la dosis de metabolitos secundarios producidos por la bacteria, por lo que las interacciones de estas cepas no necesariamente tienen el mismo efecto en todas las plantas.

Los mecanismos que regulan el inicio de germinación están bajo presiones selectivas. Así la variación de la capacidad germinativa de las semillas se interpreta como una adaptación a las condiciones específicas del hábitat local y regional (Meyer *et al.*, 1997). El proceso germinativo representa la continuación de la dinámica poblacional mediante

el reclutamiento de individuos nuevos.

El genotipo de los organismos involucrados juega un papel importante en la conformación de la asociación entre microorganismos y plantas, y determina el resultado biológico de dicha asociación (Smith y Goodman, 1999). El genotipo también influye en el tiempo durante el cual las semillas pueden permanecer viables, aunque este tiempo es muy variable y depende en gran parte de las condiciones de almacenamiento. Robles (1990) afirma que un gran número de especies presenta latencia, razón por la cual no germinan aun cuando sean viables y se expongan a condiciones “favorables” de germinación.

Es de suma importancia conocer la viabilidad de las semillas para determinar el periodo de tiempo en el que conservan su capacidad para germinar y así lograr una propagación de semillas (Kester *et al.*, 2001)

La viabilidad de la semilla es la capacidad para germinar y generar plántulas normales; mientras que desde la perspectiva fisiológica se refiere al contenido de cualquier tejido con actividad metabólica, y su posesión de reservas energéticas (Moreira *et.al*, 1992).

La dormancia es un mecanismo de sobrevivencia de las plantas que funciona mediante el retraso de la germinación hasta que las condiciones del tiempo sean favorables (Flores, 2011). La dormancia de las semillas es un rasgo muy complejo determinado por diversas características endógenas y factores exógenos, este tema a menudo se ha descrito como uno de los fenómenos menos entendidos en la biología de semillas.

Aún con el escaso entendimiento de este fenómeno, Baskin y Baskin (2004) propusieron un sistema que incluye niveles jerárquicos de dormancia: clase, nivel y tipo:

Dormancia fisiológica (DF): se presenta cuando el embrión que se encuentra en la semilla acaba de completar su desarrollo, pero aún sigue adherido a la planta. Este tipo de dormancia previene la germinación temprana, principalmente, antes de que se desprendan las semillas de la planta madre.

Dormancia morfológica (DM): el embrión es pequeño o poco desarrollado, pero diferenciado (cotiledón, hipocótilo y radícula pueden ser distinguidos). Los embriones en semillas con esta dormancia son fisiológicamente activos, y no requieren un tratamiento previo para romper la dormancia y germinar.

Dormancia Morfofisiológica (DMF): se presenta en un embrión subdesarrollado con un componente de dormancia fisiológica. La germinación requiere un tratamiento previo para romper la dormancia (Baskin y Baskin, 2004).

La mayoría de las herbáceas tienen semillas con dormancia, principalmente fisiológica (Baskin *et al.*, 2014). La ruptura de la dormancia en las especies de la familia *Asteraceae* está determinada por la temperatura (Baskin *et al.*, 2014). Sin embargo, existen aquenios de algunas especies de esta familia que no presentan dormancia, y cuya germinación depende de la humedad en el suelo al momento de la dispersión (Baskin y Baskin, 1998).

Stevia sp. es una planta herbácea y perenne, con hojas simples, inflorescencia capitular y frutos denominados aquenios, crece de manera natural como arbusto silvestre en el suroeste de Brasil y Paraguay (Marín, 2004). Las semillas de *Stevia sp.* están formadas por aquenios oblongos, con vilano pajoso, de color claro u oscuro, siendo las semillas oscuras las que se recomienda sembrar por presentar mayor viabilidad. La testa presenta coloración oscura en forma de retícula. El embrión es alargado y de coloración blanca.

La reproducción sexual de la planta presenta ciertas desventajas como la baja fertilidad de las semillas señalada por algunos autores debido a la autoincompatibilidad esporoéfitica (Maiti y Purohit, 2008) que pueden afectar de forma negativa la eficiencia del cultivo, causar alta heterogeneidad de las poblaciones resultantes; baja eficiencia de germinación, debido al alto porcentaje de semillas estériles y la ineficiencia de la recolección de semillas por la falta de uniformidad en la floración y la maduración de las mismas (Maiti y Purohit, 2008).

Mandal *et al* (2010) señalan que las condiciones ambientales son importantes en la producción de semillas de *Stevia*; así, las lluvias intensas reducen su rendimiento de semillas y su capacidad de germinación. Shock (1982), Duke (1993), y Carneiro *et al.* (1997) han reportado un porcentaje pobre de semillas viables en *Stevia*. La baja tasa de germinación es un problema para el establecimiento a gran escala de este cultivo, lo que implica un alto costo y bajo rendimiento para el agricultor. La alternativa es la reproducción asexual.

Felipe *et al.* (1971), Vargas (1980) y Jordán (1983), mencionan que la recolección de la semilla es lenta y muy difícil, debido a que la floración no es uniforme, lo que afecta a la maduración de la semilla. Además, el porcentaje de germinación es bajo, entre el 10 y 38%.

En cambio, Carneiro (1996) indica que las semillas recolectadas en invernadero tuvieron una tasa de germinación del 90%, mientras que las semillas recolectadas en el campo dieron sólo el 34% de germinación.

Las variaciones ambientales contribuyen a reducir los riesgos de que todas las semillas sean sometidas a condiciones estresantes durante su germinación, dicho desfase germinativo ayuda a reducir la competencia por recursos, aumenta la distribución de edades de las semillas y así se eleva la variación de la estructura poblacional de *Stevia* (Evans y Cabin 1995; Shütz y Rave 2003).

Midmore y Rank (2002) y Yadav *et al.* (2011) mencionan que es posible utilizar métodos de polinización asistida o artificial para producir semillas con alta tasa de germinación.

El problema de la baja tasa de germinación en *Stevia sp.* resalta la importancia de hacer estudios adicionales para determinar los posibles factores que inciden sobre la variabilidad de la germinación y el establecimiento de *Stevia sp.* Se deben buscar alternativas en el cultivo de *Stevia sp.* donde se puedan establecer métodos de germinación que fomenten la producción de la planta y con ello el edulcorante para que su producción alcance precios competitivos en el mercado nacional e internacional.

La producción de *Stevia* muestra algunas dificultades tales como el costo del establecimiento del cultivo, lo que se agrava por la baja tasa de germinación y la susceptibilidad de las plantas a las variaciones del clima. Sin embargo, este cultivo representa una gran oportunidad para mejorar los ingresos de los agricultores mexicanos en diferentes partes del país (SAGARPA 2018); aunque las cifras de producción y comercialización son aún escasas e incipientes. Por ejemplo, el estado de Nayarit produjo 324 toneladas de esta planta en el 2017, lo que representa el 64.7% por ciento de producción a nivel nacional (SAGARPA, Siacon, 2017). Se estima que la *Stevia* representa un mercado mundial de 400 millones de dólares en ventas y constituye el segundo edulcorante más consumido a nivel global.

Por las condiciones de mercado mundial, se prevé que el cultivo y uso de *Stevia sp.* crezca por arriba del 30 por ciento anual y se convierta en un producto fundamental para la agricultura en México (Asociación de *Stevia*, 2016).

Para llegar al punto de establecimiento de cultivo y producción de edulcorante el fomento de la germinación es un paso indispensable, por ello, en el presente proyecto se planteó la siguiente pregunta:

¿Existirán bacterias estimulantes de la germinación de *Stevia sp.* en suelo de cultivo de temporal de maíz?

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de las diferentes Unidades Taxonómicas Operativas cultivables aisladas de un suelo de cultivo de maíz en la germinación de *Stevia sp.*

3.2 Objetivos particulares

- Determinar la tasa de germinación de *Stevia sp.*
- Determinar la viabilidad de semillas no germinadas.
- Caracterizar morfológicamente las Unidades Taxonómicas Operativas obtenidas de un suelo de cultivo de maíz.
- Comparar el efecto de las diferentes Unidades Taxonómicas Operativas Bacterianas en la tasa de germinación de *Stevia sp.*
- Comparar el Tiempo Medio de Germinación de *Stevia sp.* inoculada con cada Unidad Taxonómica Operativa

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL SUELO

El suelo con que se trabajó proviene de Tultitlán, Estado de México, barrio de Belén. Pertenece a un campo de temporal cultivado con maíz. Este suelo tenía las siguientes características: textura (migajón arcilloso), pH (ligeramente alcalino), con alta cantidad de materia orgánica y muy pobre en nitratos y en fósforo disponible. (Tabla 1).

Textura	
	% de arenas = 50
	% de arcillas = 26
	% de limos = 24
	Migajón arcilloso
pH	7.62
M. O. %	7.99 ± 0.85
Amonio	3.1 ± 0.57 NH₄ mg kg⁻¹
Nitratos	2.05 ± 0.206 NO₃ mg kg⁻¹
Fósforo disponible	4.63 ± 0.94 mg kg⁻¹

Tabla 1. Caracterización del suelo temporal de maíz (Ramírez, 2020).

4.2 OBTENCIÓN DE SEMILLAS DE *STEVIA SP.*

Se obtuvieron 5 lotes de semillas en diferente temporalidad, con aproximadamente 1400 semillas cada uno, a través del comercio electrónico. Todos los lotes provenían de la región Huehuetlan el Chico, Puebla. De cada lote se tomaron 200 semillas de manera aleatoria que se utilizaron para las pruebas de germinación.

4.3 LIMPIEZA Y SELECCIÓN DE SEMILLAS

En este trabajo se utilizaron únicamente semillas negras, a las que se les eliminaron todos los materiales que no eran parte de éstas. Las semillas se lavaron con hipoclorito de sodio comercial a una concentración de 1%, durante 5 min y luego se enjuagaron con agua destilada para eliminar cualquier exceso de este compuesto previamente a la prueba de germinación.

GERMINACIÓN

4.4.1 Prueba Preliminar

Para determinar el porcentaje de germinación sin bacterias se utilizaron 200 semillas por cada prueba, con un total de cinco pruebas, de acuerdo con las Normas para Bancos de Genes (FAO/IPGRI, 1994). Se distribuyeron 25 semillas desinfectadas en una lámina de papel filtro absorbente por caja Petri para un total de cinco repeticiones por prueba.

Se registró cada dos días la germinación de las semillas durante un periodo de 14 días, las semillas se consideraron como semillas germinadas cuando emergió la radícula.

4.4.2 PRUEBA DE TETRAZOLIO

La prueba de tetrazolio se utilizó para identificar las semillas viables, dormantes o vanas que no germinaron al final de cada prueba de germinación. El porcentaje de semillas vanas se estimó de acuerdo con una modificación de la metodología de García y Lallana (2014) y Lallana y García (2016).

Estas semillas se colocaron durante 24hrs en agua destilada, posteriormente se limpió el exceso de agua y se colocaron en la solución de tetrazolio al 1% a pH 7 y se mantuvieron en obscuridad total durante 48 hrs.

Después de la tinción las semillas se lavaron varias veces en agua destilada para eliminar el exceso de colorante.

Se evaluó el patrón de tinción de los lotes de semillas mediante la observación en un microscopio óptico (Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8, N. (Rao *et al.*, 2007). Las semillas así tratadas se caracterizaron de la siguiente forma:

Viables:

A) Todo el embrión se tiñó de manera uniforme (Figura 1).

B) Germinables, pero dormantes, cuando una pequeña área permaneció teñida. Presentaron actividad metabólica. (Figura 2).

Las semillas se consideraron inviables cuando:

A) Permanecieron incoloras. (Figura 3).

B) El embrión se tiñó de colores pálidos: rosa o moteado. (Figura 4 y 5)

(Anexo 2).

4.4.3 Preparación extracto-suelo

El medio de cultivo para bacterias se preparó con extracto de suelo con el fin de proveer a las U.T.O.S de las condiciones nutrimentales semejantes al suelo de donde se han desarrollado.

El extracto de suelo (solución madre) se preparó con 200g de suelo, homogenizado en 1 litro de agua destilada. Se colocó en baño maría a 60°C durante 1 h, se filtró y esterilizó. Se almacenó a 4°C para su posterior uso (Mondragón- Camarillo 2011).

4.4.4 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS U.T.O.S DE BACTERIAS CULTIVABLES

La obtención de las U.T.O.S se realizó de la siguiente manera:

Se tomó un gramo de suelo de cultivo de maíz y se prepararon diluciones: 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} y 1×10^{-6} . Se inocularon 20µl de las diluciones de 1×10^{-3} a 1×10^{-6} , por triplicado en cajas Petri de 9-cm de diámetro y se incubaron a 28°C por 15 días, al término de los cuales se determinaron los diferentes tipos coloniales y se contabilizaron para determinar las diluciones en las que eran trabajables las Unidades Taxonómicas Operativas.

Para la purificación de cada U.T.O se hicieron siembras continuas por estría hasta obtener la presencia de un solo tipo de colonia.

La caracterización de las U.T.O. se realizó con base en la morfología colonial: forma, tipo de elevación, borde, color y tinción de gram (+ o -); (Flores Maya *et al*; 2012).

Una vez aislada y purificada cada U.T.O se cultivó en caldo nutritivo y se incubó a 28°C por 24hrs. Posteriormente, se ajustó el volumen de cada U.T.O a 100µL, las cuales se utilizaron para inocular las semillas durante la prueba de germinación.

Una vez comprobado el crecimiento bacteriano (por la opacidad del medio) se realizaron diluciones de 100µL de medio con bacteria en 900µL de extracto de suelo, para obtener diluciones 1×10^{-3} , 1×10^{-4} , 1×10^{-5} .

Lo anterior con el objetivo de poder disminuir la concentración bacteriana y tener una mejor estimación de la cantidad de bacterias inoculadas con las semillas. Para ello, se tomaron 20µL de las diluciones y se inocularon en una caja Petri marcada por triplicado para dar un total de 60µL por dilución. Las cajas se contaron después de 48 h para estimar la densidad poblacional de cada una.

4.4.4.1 Conteo de bacterias

Para calcular el número de UFC/ml en cada una de las muestras, se obtuvo la media geométrica de las estimaciones por cada dilución de 20µL, una vez obtenido el promedio se proyectó a 100µL para determinar la densidad de bacterias, posteriormente se multiplicó por el factor dilución, y se sacó el anti-log para conocer el valor equivalente al número de UFC/ml en promedio por volumen de las gotas.

4.4.4.2 Compatibilidad de U.T.O.S

La compatibilidad de las U.T.O.S se evaluó de acuerdo con su crecimiento. Se consideró compatible una con respecto de la otra cuando el crecimiento de una colonia no inhibía el crecimiento o no presentaban un halo de inhibición.

Para determinar la compatibilidad de las U.T.O.S, se preparó un cultivo con extracto de suelo y agar bacteriológico con el fin de hacerlas crecer en las condiciones de su ambiente de origen (Nerad et al. 1992). Para realizar la prueba se marcaron cuadros en las cajas dentro de los cuales se sembraron las U.T.O.S dejando 0.5 cm entre cada una quedando paralelas por punción y se dejaron incubar por 3 días a temperatura ambiente.

Las parejas se formaron con base en la matriz de combinaciones posibles entre las 18 U.T.O.S.

4.4.4.3 Germinación pruebas con U.T.O.S

Para cada U.T.O se procedió a preparar 4 cajas Petri con papel filtro con 25 semillas; dando un total de 100 semillas por prueba. Posteriormente las semillas se inocularon con 100µl de diferentes concentraciones bacterianas a 28°C por 14 días. La germinación de *Stevia sp.* se registró cada dos días por cada U.T.O.

4.4.4.4 TIEMPO MEDIO DE GERMINACIÓN

El tiempo medio de germinación (TMG) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$TMG = \frac{((x_1 d_1) + (x_2 d_2) + \dots (x_n d_n))}{X_n}$$

T = tiempo germinación,

n = día último control; x₁, x₂, x₁₅ = semillas germinadas en el día 1, 2,...n; d₁, d₂,...

d_n= días incubación,

X_i = semillas germinadas por día de revisión y

X_n = número total de semillas germinadas el último día de control (Ranal y García, 2006).

4.4.4.4.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA PORCENTAJES DE GERMINACIÓN

Los datos registrados en porcentajes se normalizaron mediante el arco seno, y se sustrajeron del cálculo las semillas vanas para aproximarnos a la tasa real de germinación. Estos datos de germinación con bacterias se sometieron a un análisis de varianza de un factor para determinar si al menos uno de los U.T.O.S usados tenía efecto de promoción sobre la germinación de *Stevia sp.*

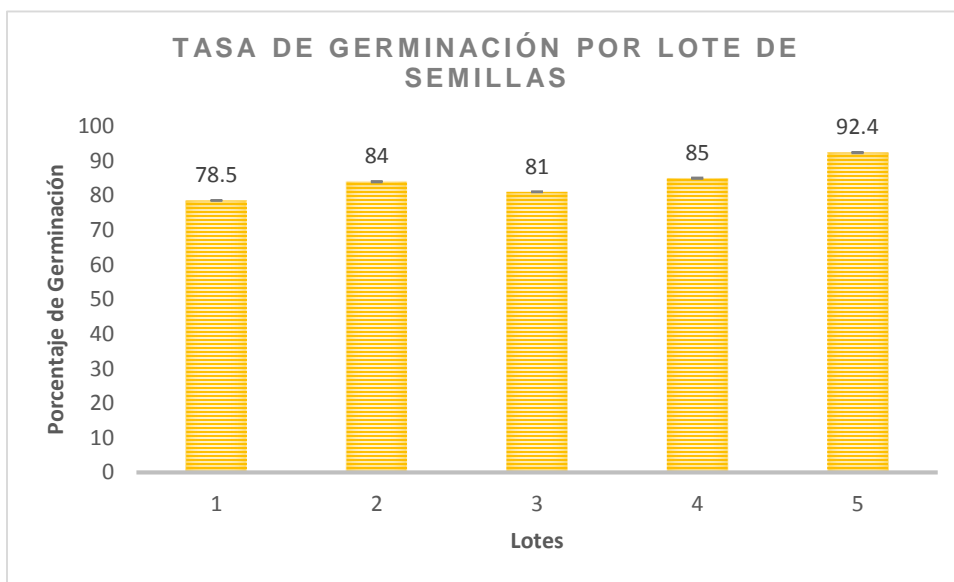
La prueba de Chi cuadrada se utilizó para decidir si las parejas de O.T.U.S promovían una mayor germinación juntas que cuando se probaron por separado.

La velocidad de geminación de semillas se analizó estadísticamente mediante el ajuste de un modelo de regresión logística según Sprent (1998) con el log del porcentaje de geminación como variable dependiente (respuesta), y la cepa de inóculo como variable independiente.

5. RESULTADOS

5.1 Condiciones de inicio (por lote de semillas) Tasa de germinación sin inóculo bacteriano.

Se trabajó con 200 semillas por cada uno de los cinco lotes de semillas de *Stevia sp.* (adquiridos en diferentes fechas) para determinar la proporción de semillas que germinarían en condiciones favorables y producirían plántulas normales (plántulas con estructuras esenciales –raíces, brotes y suficiente reserva de alimento– capaces de desarrollarse en plantas reproductivamente maduras. Los lotes mostraron diferentes porcentajes de germinación, el primer lote alcanzó el menor porcentaje con 78.5% de germinación, mientras que el quinto lote fue significativamente mayor ($p < 0.05$) registrando un porcentaje de 92.4% de semillas germinadas (Figura 1.)



Gráfica 1. Los porcentajes representan el promedio de 5 repeticiones por lote ($n=25 = 200$ semillas), las barras indican la varianza calculada con los datos transformados por el arco seno del porcentaje

5.2 Viabilidad de las semillas no germinadas por lote

Las semillas que no germinaron al término de los 14 días se sometieron a la tinción con sales de tetrazolio para conocer la viabilidad de los cinco lotes. La tinción de tetrazolio mostró que el mayor porcentaje de semillas sin embrión se encontró en el lote 4 con 8% (22 semillas), mientras el lote 1 presentó la mayor cantidad de semillas dormantes con un 10.5% (21 semillas).

LOTE	GERMINADAS	DORMANTES	SIN EMBRIÓN	TOTAL
1	157	21	22	200
2	168	14	18	200
3	162	12	26	200
4	170	8	22	200
5	185	4	11	200

Tabla 2. Cantidad de Semillas vanas por lote, teñidas y no teñidas usadas durante la prueba de viabilidad por lote.

5.3 UNIDADES TAXONOMICAS OPERATIVAS

Se aislaron un total de 18 unidades taxonómicas operativas bacterianas, basadas en sus características morfológicas; las cuales presentaron formas de cocos, bacilos y filamentos. A cada U.T.O se le realizó tinción de Gram, cuyos resultados arrojaron dos grupos: 4 U.T.O.S Gram – y 14 Gram +. (Tabla 3).

Morfologías Coloniales Tabla 3 (Anexo 2).

No. de UTO	Forma	Elevación	Borde	Color	Gram (+)
1	Circular	Umbonada	Crenado	Blanco	-
2	Circular	Plana	Lobulado	Blanco	+
3	Circular	Convexa	Entera		-
4	Circular	Umbonada	Crenado	Blanco con negro	-
5	Filamentosa	convexa	Lobulado	Blanco	+
6	Ameboide	Umbonada	Ondulado	Blanco	+
7	Ameboide	Elevada	Lobulado	Blanco	+
8	Rizoide	Umbonada	Crenado	Transparente	+
9	Circular	Convexa	Enrollado	Blanco	-
10	Circular	Plana	Lobulado	Blanco	+
11	Puntiforme	Convexa	Crenado	Blanco	+
12	Circular	Umbonada	Crenado	Negro	+
13	Circular	Convexa	Lobulado	Blanco	+
14	Circular	Convexa	Crenado	Blanco	+
15	Rizoide	Elevada	Crenado	Blanco	+
16	Ameboide	Plana	Lobulado	Transparente	+
17	Ameboide	Umbonada	Lobulado	Negro	+
18	Rizoide	Elevada	Crenado	Negro	+

5.4 COMPATIBILIDAD BACTERIANA

Se encontraron 14 parejas de U.T.O.S compatibles, donde cada una permitió el libre crecimiento de la otra.

U.T.O.	U.T.O. COMPATIBLE
1	10
	14
	15
2	7
	8
	11
	17
3	7
7	9
	11
	17
9	11
	16
11	16

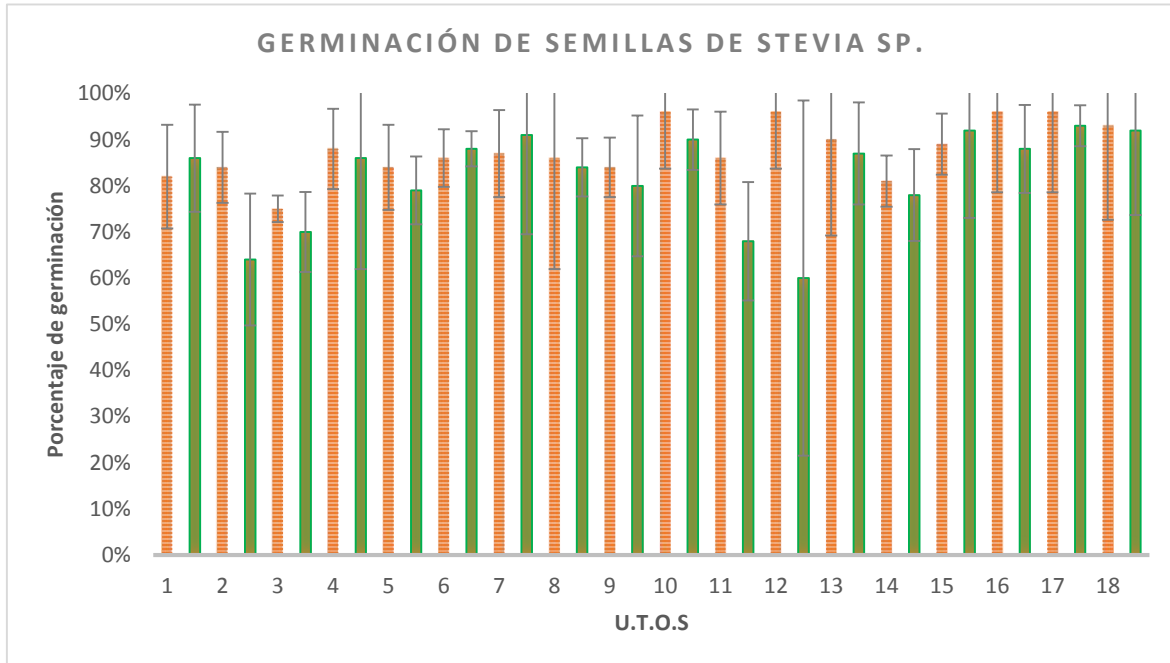
Tabla 4. Conjunto de combinaciones entre U.T.O.S

U.T.O.	INCOMPATIBILIDAD
1	2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,13,16,17,18
2	3,4,5,6,9,10,12,13,14,15,16,18
3	4,5,6,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18
4	5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18
5	6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18
6	7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18
7	8,10,12,13,14,15,16,18
8	9,10,12,13,14,15,16,17,18
9	10,12,13,14,15,17,18
10	11,12,13,14,15,16,17,18
11	12,13,14,15,16,17,18
12	13,14,15,16,17,18
13	14,15,16,17,18
14	15,16,17,18
15	16,17,18
16	17,18
17	18
18	0

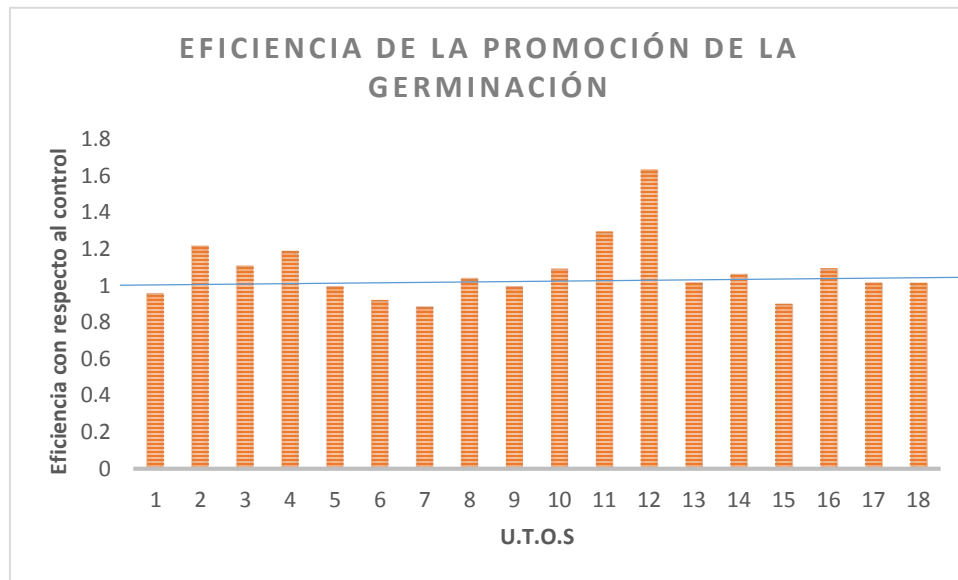
Tabla 5. Conjunto de incompatibilidad entre U.T.O.S

5.5 Efecto de las U.T.O.S sobre la germinación

El porcentaje de germinación fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en el tratamiento con la U.T.O 12 a una concentración de 8.08×10^8 UFC/ml, la cual registró un porcentaje de germinación con un (96%), en comparación con las demás (Grafica 2).



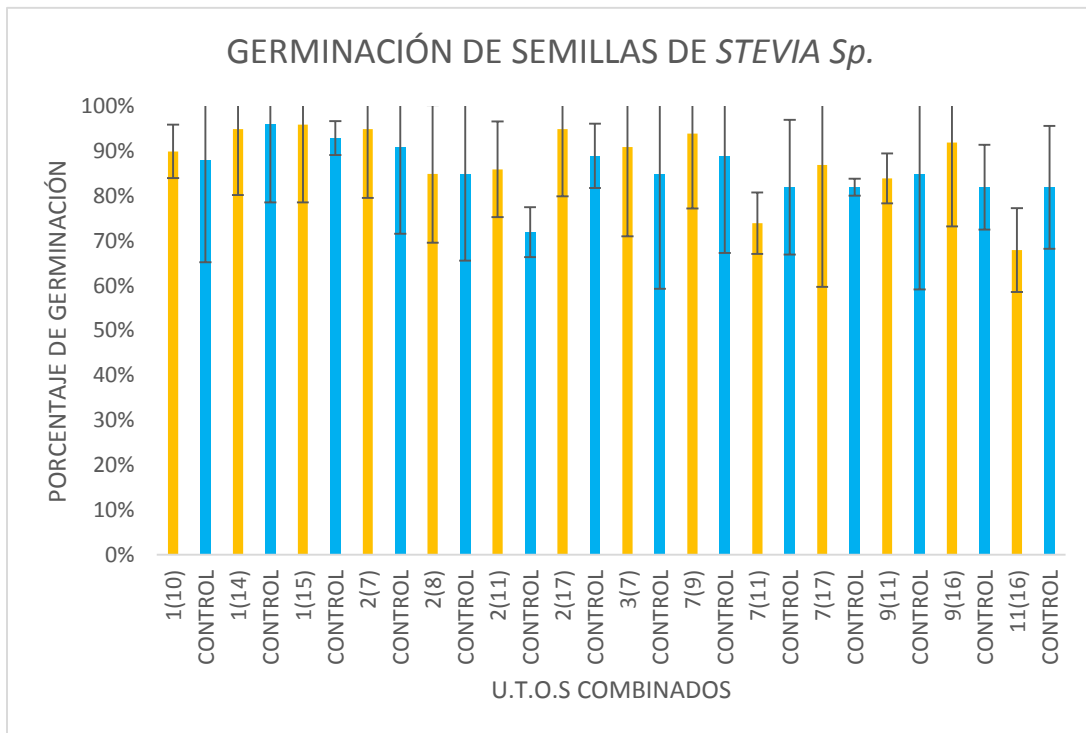
Grafica 2. Efecto de las diferentes U.T.O.S sobre la germinación. Las barras verdes representan los controles del tratamiento a su izquierda. En cada experimento y en cada control se descontaron las semillas vanas (Germinables, vanas, porcentaje de germinación, y UFC/ml) y control) (3 repeticiones $n=25$). Las barras indican la varianza calculada con los datos transformados por el arco seno del porcentaje.



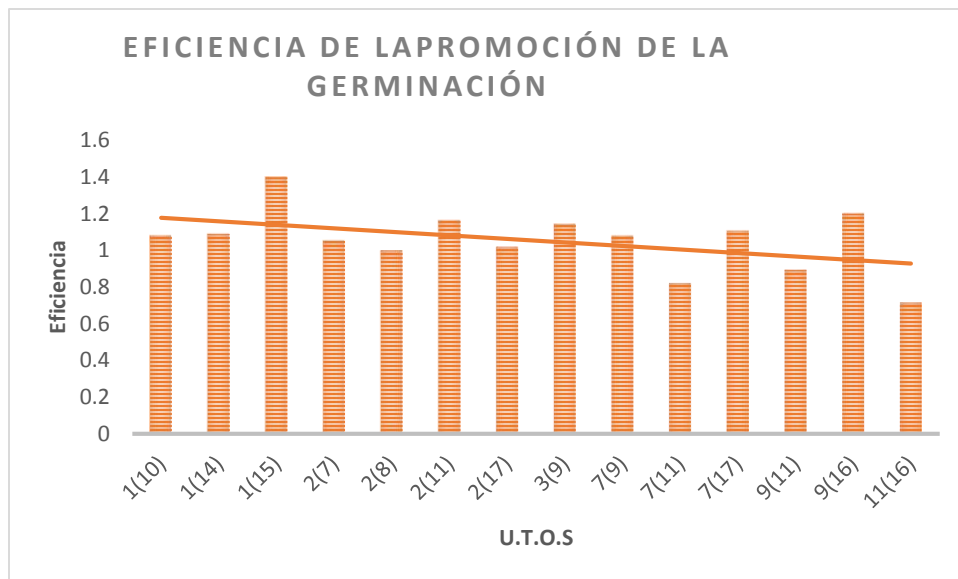
Grafica 3 Eficiencia de la promoción de la germinación de cada UTO con respecto a la germinación en el grupo control.

5.5.1 Efecto de las U.T.O.S combinadas sobre la germinación

El tratamiento con las U.T.O.S combinadas 1 y 15 produjeron un porcentaje significativamente mayor ($p < 0.05$) de germinación que cuando se probaron por separado (gráfica 2). Esta pareja de bacterias fue la que mostró la mayor estimulación de germinación de *Stevia sp.* entre las parejas de U.T.O.S probadas (Gráfica 4).



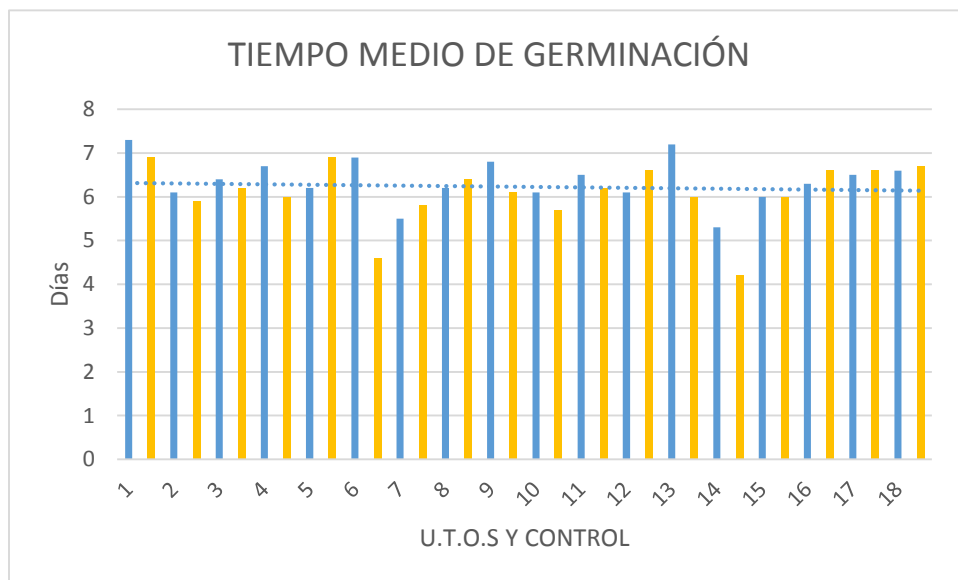
Gráfica 4. Efecto de las diferentes U.T.O.S sobre la germinación. (Germinables, vanas, porcentaje de germinación, y UFC/ml). Las barras indican la varianza calculada con los datos transformados por el arco seno del porcentaje.



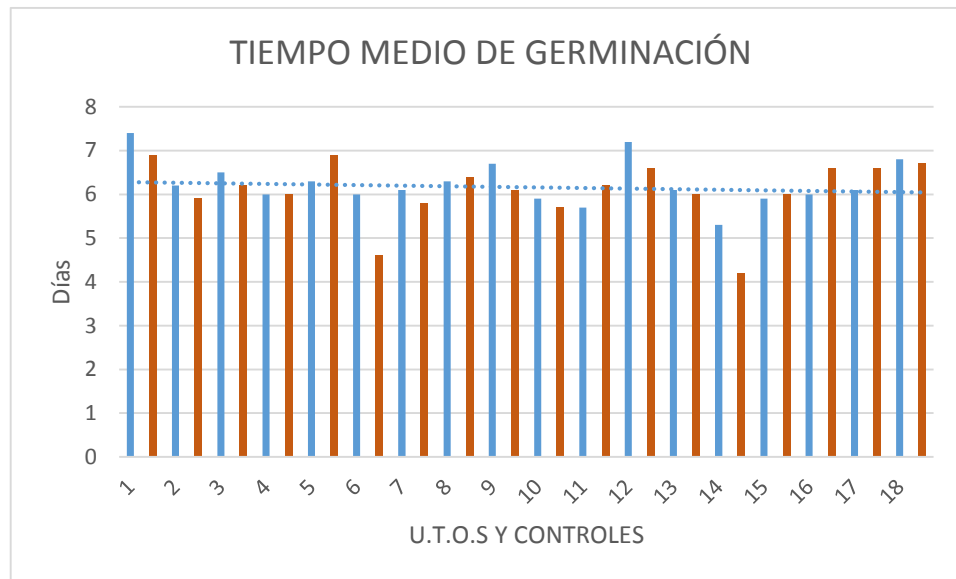
Grafica 5 Eficiencia de la promoción de la germinación de cada UTO con respecto a la germinación en el grupo control.

5.5.2 TIEMPO MEDIO DE GERMINACIÓN

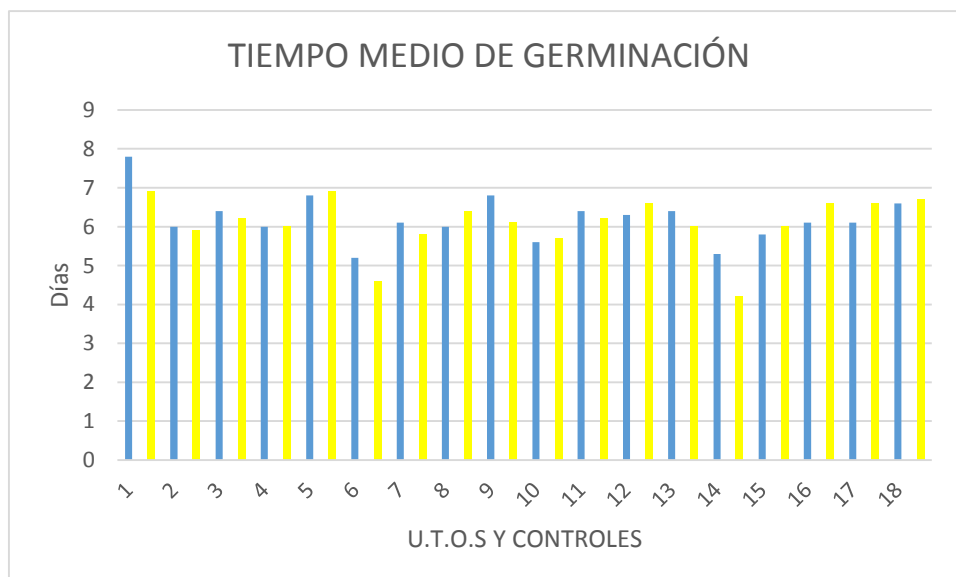
El TMG indicó que las bacterias inciden en la germinación, y también reducen el tiempo de germinación en las semillas. La U.T.O 14 generó menor tiempo medio de germinación con las concentraciones 7.1×10^6 UFC/ml y 7.9×10^7 UFC/ml las que redujeron el tiempo a 5.3 días respectivamente, (Gráfica 5a y 5b), mientras que la U.T.O 6 con la concentración 8.4×10^8 UFC/ml redujo el tiempo de la germinación a 5.2 días (Gráfica 5c) teniendo el menor tiempo.



Gráfica 5a. Tiempo medio de germinación en dilución 1×10^{-3} n=25 semillas.



Grafica 5b. Tiempo medio de germinación en dilución 1×10^{-4} n=25 semillas.



Grafica 5c. Tiempo medio de germinación en dilución 1×10^{-5} n=25 semillas.

6. Discusión

El cultivo de *Stevia sp.* se comenzó a introducir en nuestro país porque representa un gran beneficio económico. Este beneficio económico se debe a la expansión del mercado de edulcorantes, por lo que es posible que el cultivo de *Stevia sp.* se siga expandiendo en suelos previamente cultivados con maíz.

Es conveniente conocer el estado microbiológico de los suelos antes de establecer cualquier cultivo de *Stevia sp.* Para esto, se debe realizar un análisis de suelos que revele las deficiencias y requerimientos del terreno en donde se pretende establecer el cultivo de esta planta.

Se han registrado rendimientos de hasta 8,1 kg de semillas de *Stevia sp.* por ha, pero las cantidades totales de semillas viables producidas en 1 año son inciertas (Lester 1999). Pues frecuentemente el porcentaje de germinación es menor del 50% cuando se trabaja con todas las semillas, tanto claras como oscuras. Cuando la prueba se realiza solo con semillas oscuras se obtienen porcentajes de germinación cercanas al 80%. Goettemoeller y Ching (1999) investigaron la germinación de semillas de *Stevia sp.* y probaron la viabilidad de las semillas mediante la técnica de cloruro de tetrazolio, encontrando que la viabilidad de las semillas negras fue mucho más alta que las semillas de color claras (76.7% hasta un 83% respectivamente). Por ello las altas tasas de germinación que se obtuvieron en este trabajo, en el rango de 78.5% hasta un 92.4% pueden considerarse dentro de los rangos normales de germinación de *Stevia sp.*

En el presente estudio, se pudo observar que gran parte del problema para la germinación de *Stevia sp.* es que al menos 13% de las semillas dentro de un lote eran vanas o el embrión estaba inmaduro, lo que puede estar relacionado con la autoincompatibilidad esporófitica en la reproducción de la planta; además de la ineficiencia de recolecta de semillas (Maiti y Purohit, 2008).

Es difícil predecir el resultado de las interacciones entre plantas y microorganismos benéficos del suelo y, más aún, entre las especies de microorganismos; no obstante, las comunidades microbianas desempeñan un papel clave en el establecimiento de las plantas, pues en los consorcios microbianos pueden existir especies de bacterias que estimulen o inhiban la germinación.

En este trabajo, la U.T.O 12 estimuló significativamente ($p \leq 0.05$) la germinación en un rango de 63% hasta un 96% respectivamente, otras 17 U.T.O.S también mostraron un efecto estimulante sobre la germinación, aunque la “p” resultó ligeramente mayor que 0.05.

En la literatura se ha manejado que el beneficio de la aplicación de bacterias promotoras de la germinación no necesariamente se hace evidente bajo condiciones óptimas de cultivo, sino bajo estrés (Banerjee *et al.*, 2010). Sin embargo, 12 U.T.O.S mostraron su capacidad de estimular la germinación de *Stevia sp.* en condiciones de laboratorio no estresantes.

Además, se pudo observar que muchas de las semillas inoculadas presentaron mayor elongación de la radícula cuando se inocularon con las U.T.O.S. aisladas del suelo de cultivo de maíz.

Lo anterior puede explicarse porque la capacidad bacteriana para afectar el crecimiento de las plantas no sólo depende de su abundancia, sino de su capacidad para proliferar a través de la raíz (Loper *et al.*, 1985). En general, las bacterias inoculadas en la superficie de las semillas colonizan sólo el primer tercio del sistema radical (Hatzinger y Alexander, 1994), aunque algunas, como *Azospirillum*, pueden moverse de la semilla inoculada y distribuirse en todo el sistema radicular en respuesta al propio crecimiento de la raíz (Bashan y Levanony, 1991).

Esta regulación está mediada por el quórum sensing de las bacterias, las que se activan y se mantienen en la zona radicular por medio de la liberación selectiva de los exudados y lixiviados que generan las plantas y otros microorganismos (Brown, 2010).

Bashan y Levanony (1991) propusieron que, para alterar la actividad de la membrana las bacterias liberan una señal que tiene la capacidad de cruzar la pared celular de la planta y que es reconocida por la membrana. Dicha molécula reduciría el potencial de la misma en toda la raíz y su efecto sería mayor en la zona de elongación.

Está claro que no existe una fórmula única para la adición de un microorganismo beneficioso en una semilla. En parte, por los requerimientos fisiológicos en las semillas de *Stevia sp.* que presentan gran variabilidad en los diversos compuestos disponibles en los cotiledones. La disponibilidad de agua alrededor de la semilla también influye en el desarrollo de las interacciones microbianas que tienen lugar. Incluso puede darse el caso de que el comportamiento de los microorganismos benéficos pueda diferir entre lotes de semillas, ya que cada lote puede contener de origen diferentes poblaciones microbianas que interactúan de manera diferente entre sí (Tylkowska y van den Bulk, 2001).

La respuesta de las plantas a la inoculación depende de las compatibilidades funcionales en la fisiología y en la bioquímica de la interacción entre los componentes microbianos y la planta lo cual arroja diferentes respuestas dependiendo de la combinación de los microorganismos (Vázquez *et al.*, 2000). Oyekanmi *et al.*, (2007) mencionan que esto se puede deber a que generalmente las interacciones mutualistas no son estables debido a diversos factores bióticos y abióticos, por lo que algunos microorganismos pueden manifestar incompatibilidad, como en el caso de las U.T.O.S 3,4,5,6,12,13.

Lo anterior puede darnos una respuesta sobre la razón de que se encontraran únicamente 14 parejas compatibles de las 18 U.T.O.S trabajadas. Pero solo la combinación de las U.T.O.S (1-15) fue la que generó el mayor porcentaje de germinación (96%), el cual superó los porcentajes que generaron cada una por separado (93% y 88% respectivamente), lo que implica que cada tipo de U.T.O. puede expresarse sinérgicamente. Sin embargo, las interacciones de estos microorganismos pueden presentar efectos que potencialicen o, por el contrario, nulifiquen el efecto sobre la germinación.

Sin embargo, cabe recordar que todo este proceso no solamente está mediado por la interacción de los microorganismos, sino por las condiciones del entorno que hacen posible que los beneficios de los inoculantes se expresen en las especies vegetales (Brimner y Boland, 2003).

La U.T.O. 14 con concentraciones 7.1×10^6 UFC/ml y 7.9×10^7 UFC/ml aumentó la velocidad de germinación en las semillas (5.34 y 5.3 días) mientras la U.T.O. 6 con la dilución [7.9×10^8 UFC/ml] aumentó la velocidad (5.25 días). Estos resultados pueden deberse a que las U.T.O.S podrían acelerar el aumento en la producción de giberelinas ya que estas inducen el rompimiento de la latencia después de la imbibición de las semillas, permitiendo la germinación y crecimiento del embrión (Siobhan & McCourt, 2003). Además, se estimulan a la alfa amilasa y otras enzimas proteolíticas que influyen en la hidrólisis de almidón en azúcar. Lo anterior reduce el potencial hídrico de la célula (Gil & Miranda, 2008) y promueve la hidrólisis de la pared celular de semillas ricas en galactomananos, las que forman parte de la resistencia mecánica para la protrusión de la radícula (Amador-Alfarez *et al.*, 2013).

7. Conclusión

Existe más de una U.T.O. que puede ayudar a la germinación de *Stevia sp.* en el suelo de cultivo de maíz, por lo que la inoculación de U.T.O.S en las Semillas de *Stevia sp.* podría facilitar la plantación en almácigo y ayudar a resolver algunos de los problemas de establecimiento de la planta de *Stevia sp.* en cultivos rotativos, con lo que se facilitará el establecimiento de cultivos de *Stevia sp.* mediante la propagación sexual.

8. Bibliografía

- Aguilera, S.M. 1989. Dinámica de la Materia Orgánica en suelos de Drenaje Restringido. Bol. Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo. Vol. #9. P 91-121
- Amador, A.K., Díaz, G.J., Loza, C.S., y Bivián, C.E. 2013. Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de dos especies de *ferocactus* (cactaceae). Polibotánica 35: 10-131.
- Barea, J.M., Azcón, A.C., Ocampo, J.A y Azcón R. 1991. Morfología, anatomía |y citología de las micorrizas vesículo-arbusculares. En: Olivares J, Barea JM, editors. Fijación y movilización biológica de nutrientes Vol II. Capítulo 17. Fijación de N. y micorrizas. Madrid. Consejo superior de Investigaciones científicas; 1991.
- Barnejee, S., Rakhi, P., Chandan, S., y Dominic, S. 2010. Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter sp.* and *Bacillus sp.* isolated from tomato rhizosphere. Austian Journal of Crop Science. Southern Croos Publisher.
- Bashan, Y. y H. Levanony. 1991. Alterations in membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by *Azospirillum brasilense*. Plant Soil 137: 99-103.
- Bashan, Y., G. Holguín y R. Ferrera-Cerrato. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. I. *Azospirillum*. Terra 14: 159-194.

Baskin, C. C. y J. M. Baskin. 2014. Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Academic Press. San Diego, CA, USA. 1600 p.

Brimner, T.A. y Boland, G.J. 2003. A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agric. Ecosyst. Environ.* 100:3-16.

Brown, D. 2010. A mathematical model of the Gac Rsm quorum sensing network in *Pseudomonas fluorescens*. *Biosystems.* 101:200-212.

Bouyoucos, G.J. 1962. Hydrometer method improved for making particle size analysis of soils. *Agronomy Journal* 54:464-465.

Carneiro, J. W. P., Muniz, A. S. y Guedes, T. A. 1997. Greenhouse bedding plant production of *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertonii. *Can. J. Plant Sci.* 77: 473-474.

Muñoz, I.D.J., Soler, A.A., López, F.G., y Hernández, M.M. 2015. Edafología (manual de análisis de suelos).

Dakora, F. y D. Phillips. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low – nutrient environments. *Plant and Soil* 245: 35 – 47.

Díaz, V. P., Ferrá, R., Almaraz, C.J., y Alcántara G. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra.* 19: 321 – 335.

Duchicela, J., Vogelsang K.M., Schultz, P.A., Kaonongbua, W., Middleton, E.L y Bever J.D. 2012. Non-native plants and soil microbes: potential contributors to the consistent reduction in soil aggregate stability caused by the disturbance of North American grasslands. *New Phytologist* 196: 212– 222.

Duke, J. 1993. *Stevia rebaudiana*. Pages 422-424 in J. Duke, ed. CRC handbook of alternative cash crops. CRC Press, BocaRaton, FL.

Evans, A. S., y Cabin, R. J. C. 1995. ¿Puede la latencia afectar la evolución de los rasgos posteriores a la germinación? ¿El caso del *Lesquerella fendleri*? *Ecology* 76: 344-356.

FAO/IPGRI. 1994. Normas para Bancos de Genes. FAO y el IPGRI, Roma, Italia. Disponible en http://www.biodiversityinternational.org/publications/pubfile.asp?ID_PUB=1250. Consultado por última vez (26/08/2019).

- Felippe, G.M.1997. *Stevia rebaudiana* Bert:uma revisado. Ciencia e Cultura 29 (11) 1240-1248. Seminario brasileño sobre *Stevia rebaudiana* (Bert).Bertoni Resumos Ital. Campinad 9/82. Instituto de Tecnología de alimentos. Sao Paolo.
- Flores, J., Jurado, E., Chapa, V.L., Ceroni S. A., Dávila A, P. y Galíndez; G. et al. Seeds photoblastism and its relationship with some plant traits in 136 cacti taxa. Environ. Exp. Bot. 71:79-88, 2011.
- Foster, S.S.D. y Skinner, A.C. 1995 Groundwater protection : the science and practice of land surface zoning. IAHS PublN 225 : 471-82.
- García, L.F. y Lallana, V.H. 2014. Protocolo para el análisis de viabilidad de semillas de orquídeas con la prueba topográfica por tetrazolio. Rev. Anal. Sem. 7(28):75–78.
- Goettemoeller,J. y Ching, A. 1999. Seed germination in *Stevia rebaudiana*. Pages 510511 in J. Janick, ed. Perspectives on new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA.
- Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma spp.* Phytopathology. 96:190-194.
- Hatzinger, P.B. y Alexander, M. 1994. Relationships between the number of bacteria added to soil or seeds and their abundance and distribution in the rhizosphere of alfalfa. Plant Soil 158:211-222.
- Hoitink, H.A.J., Madden, L.V. y Dorrance, A.E. 2006. Systemic resistance induced by *Trichoderma spp.*: Interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality. Phytopath. 96:186-189.
- Jaisingh, R., Kumar, A. y Dhiman, M. 2016. Isolation and characterization of PGPR from rhizosphere of *Sesame indicum* L. Int. J. Adv. Res. Biol. Sci. 3, 238–244.
- Jordán, M.F. 1983. La propagación de Ka´a he´ e, *Stevia rebaudiana* Bertoni. Primer Simposio Nacional de *Stevia* (Ka´a he´ e).Asunción, Paraguay,29p
- Kester, D.E., Fred, Jr. T.D., Hartmann H.T. y Geneve R.L. 2001. Plant propagation: principles and practices. Prentice Hall PTR. 880 p.
- Khan, A.L., Waqas, M., Kang, S.-M., Al-Harrasi, A., Hussain, J., Al-Rawahi, A., Al-Khiziri, S., Ullah, I., Ali, L., Jung, H.-Y. 2014. Bacterial endophyte *Sphingomonas sp.* LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. J. Microbiol. 52 (8), 689–695.

Lallana, V.H. y García, L.F. 2016. Viabilidad de semillas de orquídeas almacenadas en frío. En: Di Leo N, Labria H, Seghesso A, editores. Libro de resúmenes de la I Reunión Transdisciplinaria en Ciencias Agropecuarias. XVII Jornada de Divulgación Técnico-Científicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNR. II Jornadas de Ciencia y Tecnología. Argentina: Universidad Nacional de Rosario. p. 143–144. [Revisada el 14 sep 2016]. http://www.fveter.unr.edu.ar/upload/LIBRO_DE_RESUMENES_I_REUNI%D3N_TRANSDISCIPLINARIA_EN_CIENCIAS_AGROPECUARIAS_2016.pdf

[fveter.unr.edu.ar/upload/LIBRO_DE_RESUMENES_I_REUNI%D3N_TRANSDISCIPLINARIA_EN_CIENCIAS_AGROPECUARIAS_2016.pdf](http://www.fveter.unr.edu.ar/upload/LIBRO_DE_RESUMENES_I_REUNI%D3N_TRANSDISCIPLINARIA_EN_CIENCIAS_AGROPECUARIAS_2016.pdf)

Lester, T. 1999. *Stevia rebaudiana* (sweet honey leaf). Aust. New Crops News Lett. 11. Nat. Prod. Radiance 2: 120. Lewis, W. H. 1992. Early uses of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaves as a sweetener in Paraguay. Econ. Bot. 46: 336-337

Loper, J.E., Haack, C. y Schoth, M.N. 1985. Population dynamics of soil pseudomonads in the rhizosphere of potato. Appl. Environ. Microbiol. 49: 416-422.

Maiti, R.K., y Purohit S.S. 2008. Stevia: A miracle plant for human health. Agrobios (India) Jodhpur, India.

Mandal, S., Chakraborty, D. y Dey, S. 2010. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. Plant Signaling & Behavior 5 (4): 359-368

Malusa, E., Sas-paszt, L., Popinska, W. y Zurawicz, E. 2007. The Effect of a Substrate Containing Arbuscular Mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms (*Trichoderma*, *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Streptomyces*) and foliar fertilization on growth response and rhizosphere pH of three strawberry cultivars. Internal J. Fruit Sci. 6(4):25-41.

Mary, B., S. Recous, D. Darwis y D. Robin. 1996. "Interactions Between Decomposition of Plant Residues and Nitrogen Cycling in Soil", Plant Soil. 181: 71-82.

Marschner, P., Timonen, S. 2005. Interactions between plant species and mycorrhizal colonization on the bacterial community composition in the rhizosphere. Applied Soil Ecology. 28:23-36.

Meyer, S. E., Allen P.S. y Beckstead, J. 1997. Seed germination regulation in *Bromus tectorum* (Poaceae) and its ecological significance. Oikos 78: 474-485

Midmore, D.J. y A.H. Rank. 2002. A new rural industry –Stevia– to replace imported chemical sweeteners. RIRDC Report 02/022, 55 p

Mondragon, C.L. 2011. Estructura trófica de la comunidad de ciliados y flagelos en un suelo de cultivo contaminado con combustible de Jalacingo Veracruz. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios superiores Iztacala. Pp. 9

Moreira, F.M.S., Tiedje J. y Marsh, T.L. (2002) "*Burkholderia spp.* are among fast growing symbiotic diazotrophs isolated from diverse land use systems in Amazonia and from Brazilian Leguminosae forest species". Memorias de XXI Reunión Latinoamericana de rizobacteria, Cocoyoacan, México

Oyekanmi, E.O., Coyne, D.L., Fagade, O.E. y Osonubl, O. 2007. Improving root-knot nematode management on two soybean genotypes through the application of *Bradyrhizobium japonicum*, *Trichoderma pseudokoningii* and *Glomus mosseae* in full factorial combinations. Crop Prot. 26:1006-1012.

Rao, N.K., J. Hanson, M.E. Dulloo, K. Ghosh, D. Novell y M. Larinde. 2007. Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8. Bioversity International, Roma, Italia.

Radjacommare, R., Venkatesan, S. y Samiyappan, R. 2010. Biological control of phytopathogenic fungi of vanilla through lytic action of *Trichoderma* species and *Pseudomonas fluorescens*. Phytopathology and Plant Protection. 43(1):1-17.

Robles S., R. 1990. Producción de Granos y Forrajes. Ed. Noriega Limusa. 5a ed. México, D. F. 663 p.

SAGARPA. 2015. INIFAP. Obtenido de <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/en-mexicola-stevia-conquista-el-mercado-de-los-edulcorantes>. Consultado por última vez (26/08/2019).

Shahid Akba K, Roshan Z & Nisar A. 2014 Selection of suitable propagation method for consistent plantlets production in *stevia rebaudiana* (Bertoni). Saudi J. Biol. Sci. 21(6):566-573.

Shock, C. C. 1982. Rebaudi's stevia: natural non-caloric sweeteners. California Agric. 36:4-5

Schutz, W., y Rave. G. 2003. Variation in seed dormancy of the wetland sedge, *Carex elongata*, between populations and individuals in two consecutive years. Seed Sci. Res. 13:

315-322.

Siddiqui, Z.A., y Akhtar, M.S. 2008. Synergistic effects of antagonistic fungi and a plant growth promoting rhizobacterium, an arbuscular mycorrhizal fungus, or composted cow manure on populations of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. *Biocontrol Sci. Techn.* 18(3):279-290.

Singer, M.J. y Munns, D.N., 1996. *Soils. An introduction*. Third edition. Prentice-Hall, Inc. New Jersey. 480 p.

Siobhan, M.B. y Mccourt, P. 2003. "Hormone Cross-Talk in Seed Dormancy". *J. Plant Growth Regul* 22: 25-31.

Smith, S. E. & Read. D. J. *Mycorrhizal Symbiosis* 2nd edn. Academic Press, London, UK, 1997.14. Glick, B. R. *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>.

Smith, K.P. y R. Goodman. 1999. Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 473-491.

Vargas, R.1980. Informe sobre el viaje Al Japón para observar la producción, comercialización e industrialización de la planta *Stevia rebaudiana* Bertonili Asunción, Julio.

Vázquez, M.M., César, S., Azcón, R. y Barea, J.M. 2000. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. *Applied Soil Ecology*.15:261-272.

Yadav, A.K., Sing, S., Dhyani, D., Ahuja, P.S., 2011. Una revisión sobre la mejora de la *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Canadian Journal of Plant Science*, 91 (1): 1-27.

Tylkowska, K. y Van den bulk, R.W. 2001 Effects of osmo- and hydropriming on fungal infestation levels and germination of carrot (*Daucus carota* L.) seeds contaminated with *Alternaria* spp. *Seed Science and Technology* 29, 365/375.

Walkley, A. y Black, A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37:29-38.

9. Anexo 1

Las semillas se consideraron viables cuando:

- A) Todo el embrión se tiñó de manera uniforme. (Figura 1)
- B) Cuando una pequeña área de la porción superior del eje radicular permaneció teñida (hipocótilo), puesto que la tinción de esta estructura al teñirse indica que es potencialmente funcional (Figura 2)

Las semillas no se consideraron viables cuando:

- A) Permanecieron incoloras. (Figura 3)
- B) El embrión se tiñó de colores pálidos: rosa o moteado. (Figura 4)
- C) Cuando más de la mitad del tejido no se teñía, lo cual indica que algunas estructuras vitales están muertas y que no hay productos que reaccionen con el tetrazolio (ISTA, 2005).

Las 48hrs de imbibición de las semillas y la concentración al 1% de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio empleados para realizar el test de Tetrazolio permitieron la tinción adecuada de los embriones viables (figura 1), y los embriones no viables presentaron coloraciones rosas, moteados o incoloras (figura 4).



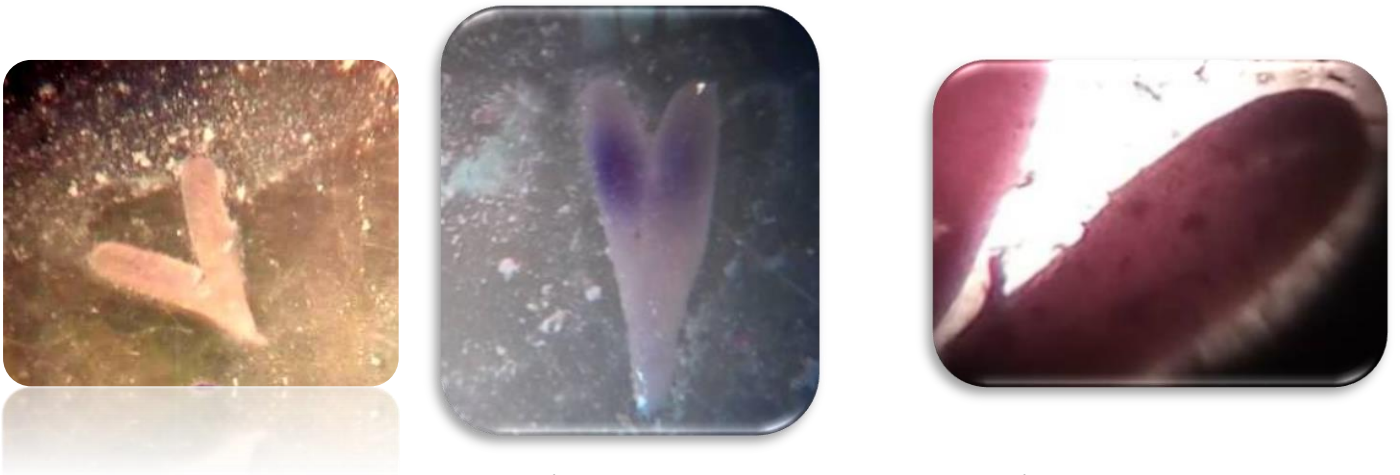


Figura 1 y 2 A y B) Embriones viables Figura 3, 4 y 5 C y D)
Embriones no viables.

Anexo 2

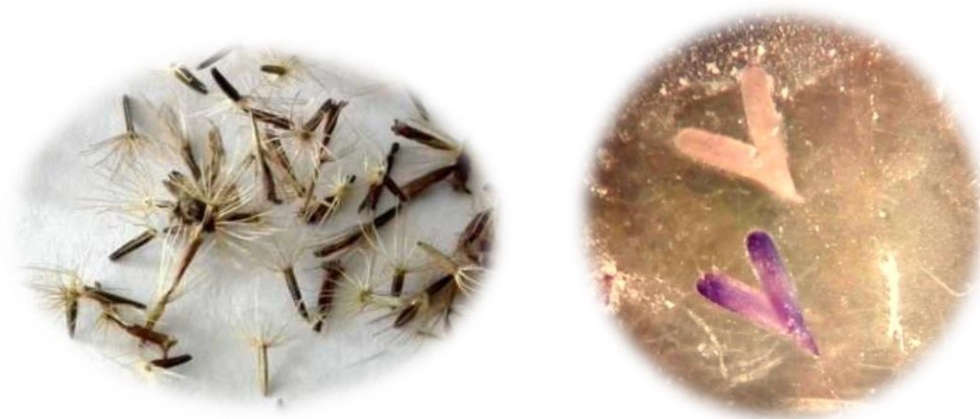


Figura x. a) Semillas de *Stevia sp.* negras y blancas. b) Embriones viables (teñidos) y no viables.

10. ANEXO 2

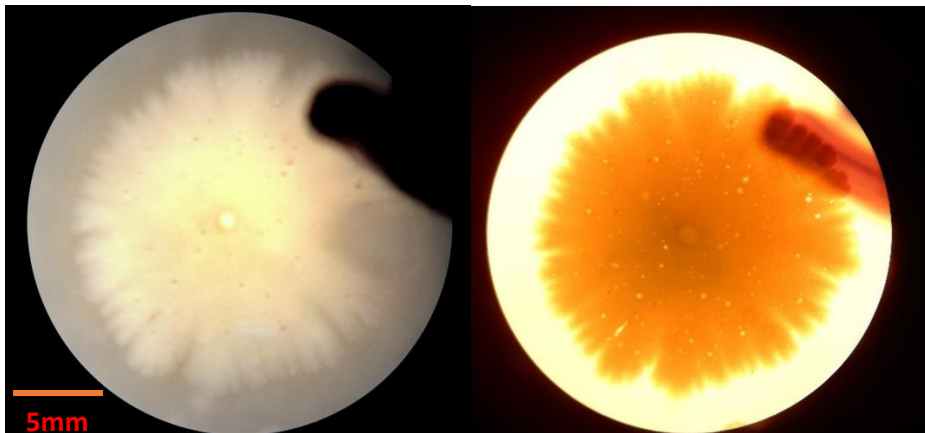
U.T.O. 1

Imagen 1 Micrografía a (2x) en microscopio estereoscópico de U.T.O 1 (en cultivo de agar-extracto suelo). A la derecha U.T.O con luz visible, a la izquierda con luz reflejada.

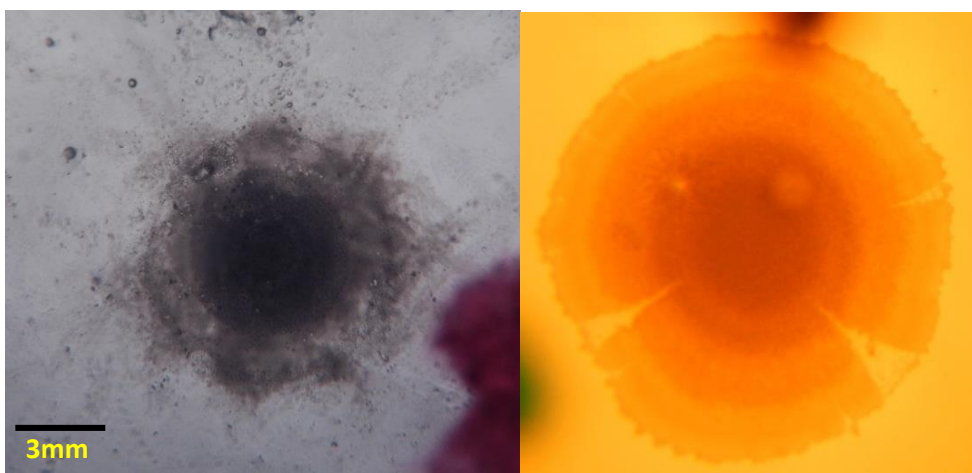
U.T.O 2

Imagen 2 Micrografía a (2x) en microscopio estereoscópico de U.T.O 2 (en cultivo de agar-extracto suelo). A la derecha U.T.O con luz visible, a la izquierda con luz reflejada.

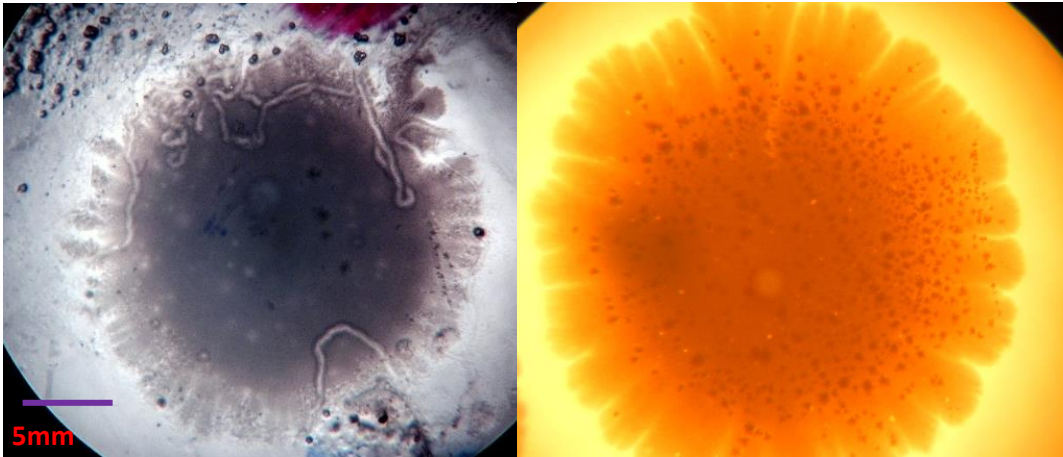
U.T.O 3

Imagen 3 Micrografía a (2x) en microscopio estereoscópico de U.T.O 3 (en cultivo de agar-extracto suelo). A la derecha U.T.O con luz visible, a la izquierda con luz reflejada.

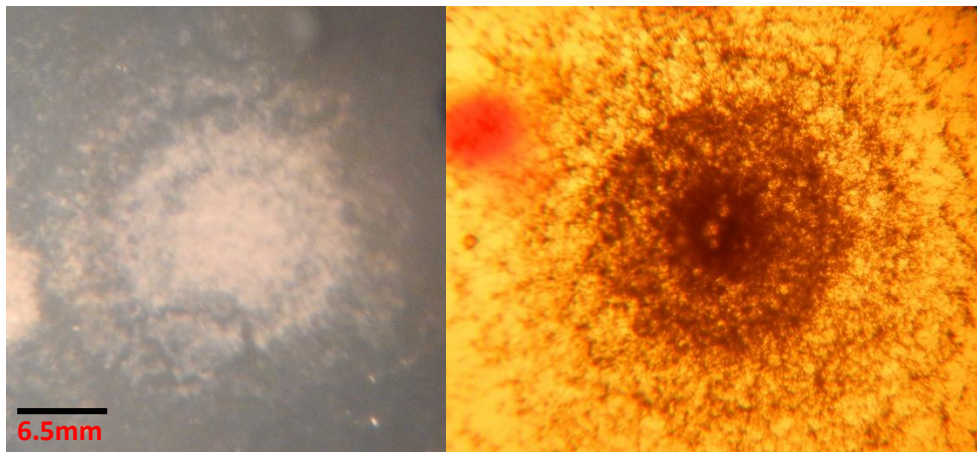
U.T.O 4

Imagen 4 Micrografía a (2x) en microscopio estereoscópico de U.T.O 4 (en cultivo de agar-extracto suelo). A la derecha U.T.O con luz visible, a la izquierda con luz reflejada.

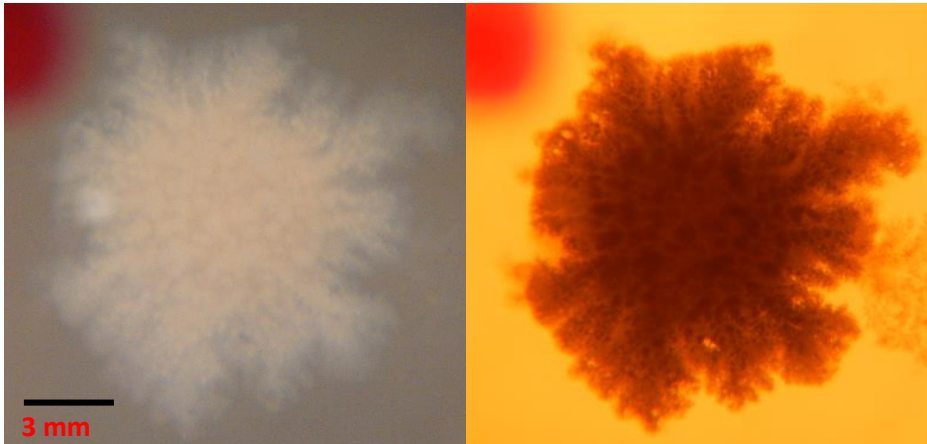
U.T.O 6

Imagen 6 Micrografía a (2x) en microscopio estereoscópico de U.T.O 6 (en cultivo de agar-extracto suelo). A la derecha U.T.O con luz visible, a la izquierda con luz reflejada.

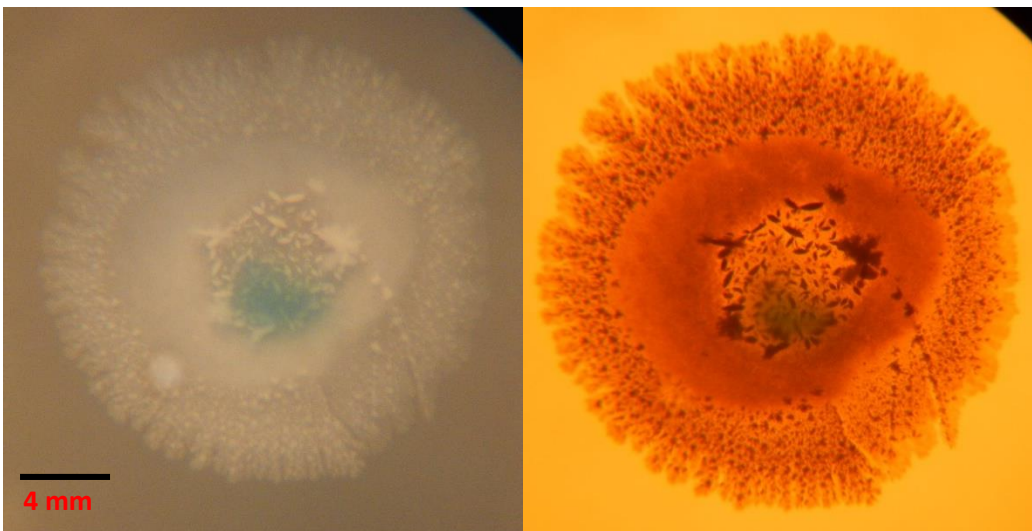
U.T.O 7

Imagen 7 Micrografía a (2x) en microscopio estereoscópico de U.T.O 7 (en cultivo de agar-extracto suelo). A la derecha U.T.O con luz visible, a la izquierda con luz reflejada.

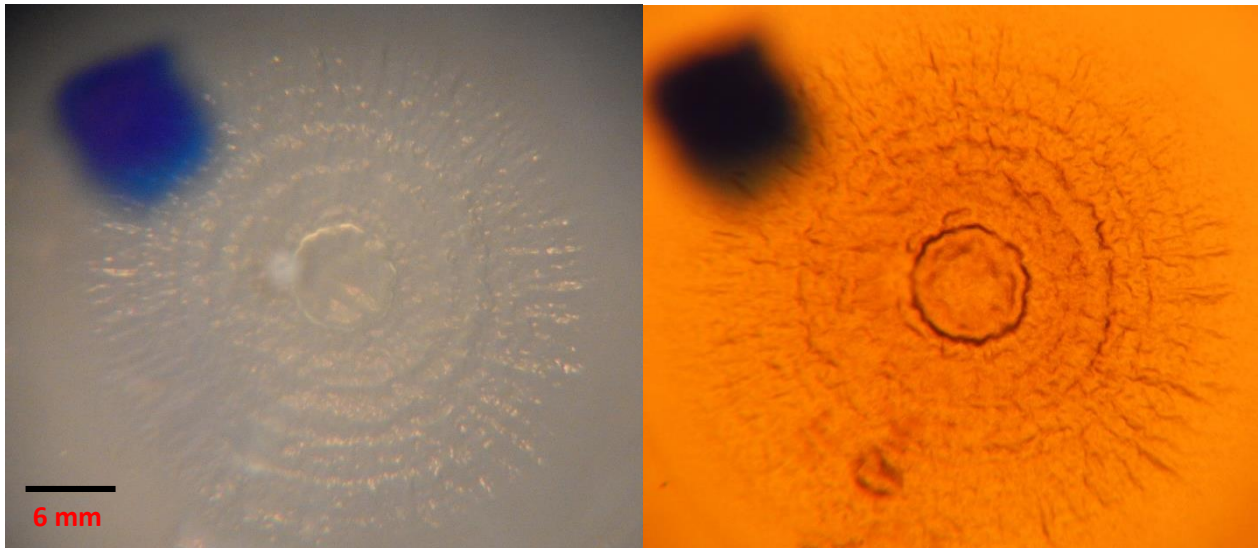
U.T.O 8

Imagen 8 Micrografía a (2x) en microscopio estereoscópico de U.T.O 8 (en cultivo de agar-extracto suelo). A la derecha U.T.O con luz visible, a la izquierda con luz reflejada.

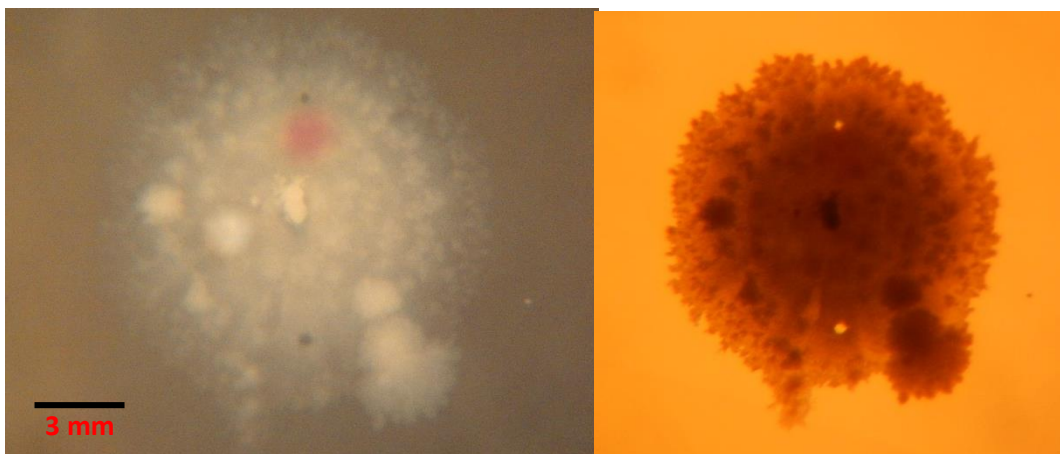
U.T.O 9

Imagen 9 Micrografía a (2x) en microscopio estereoscópico de U.T.O 9 (en cultivo de agar-extracto suelo). A la derecha U.T.O con luz visible, a la izquierda con luz reflejada.

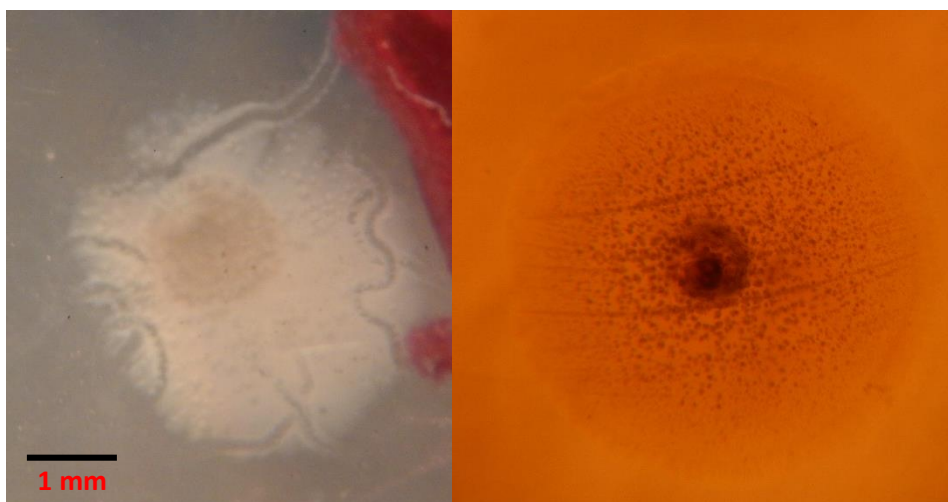
U.T.O 10

Imagen 10 Micrografía a (2x) en microscopio estereoscópico de U.T.O 10 (en cultivo de agar-extracto suelo). A la derecha U.T.O con luz visible, a la izquierda con luz reflejada.

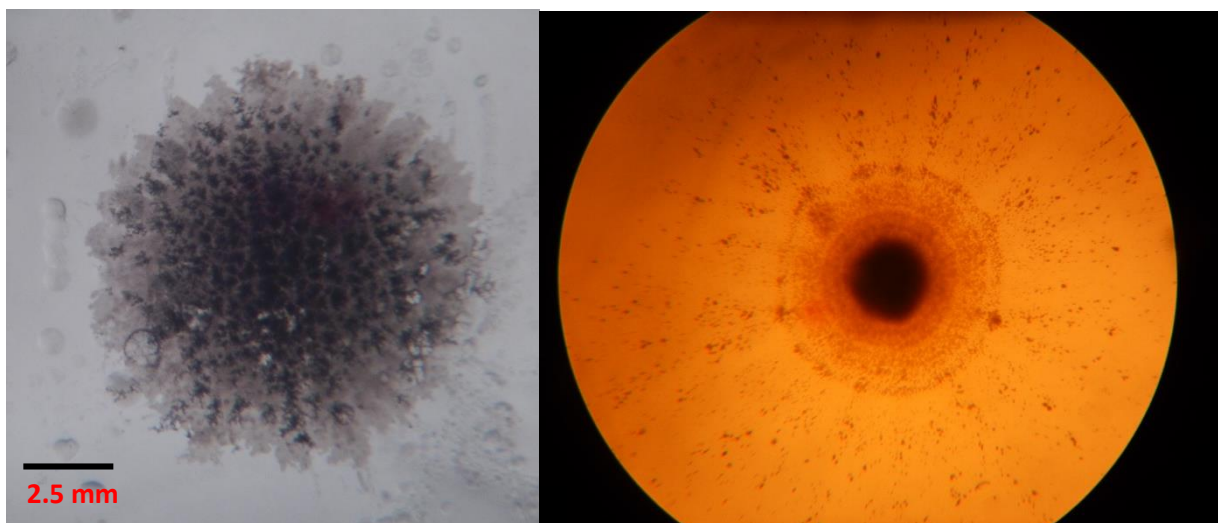
U.T.O 11

Imagen 11 Micrografía a (2x) en microscopio estereoscópico de U.T.O 11 (en cultivo de agar-extracto suelo). A la derecha U.T.O con luz visible, a la izquierda con luz reflejada.

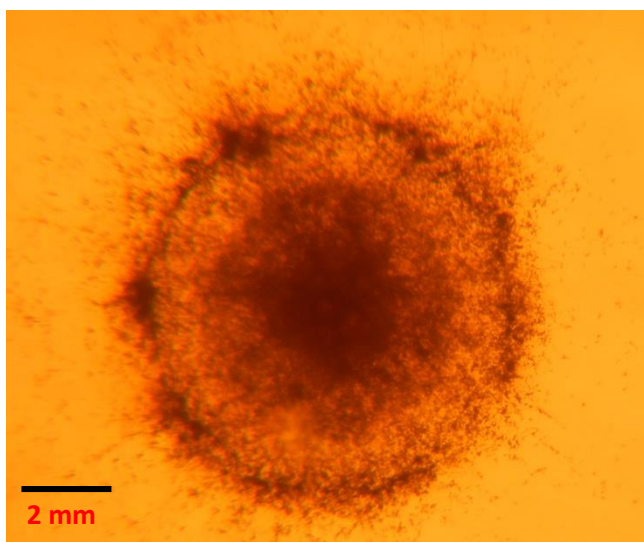
U.T.O 12

Imagen 12 Micrografía a (2x) en microscopio estereoscópico de U.T.O 12 (en cultivo de agar-extracto suelo) con luz reflejada.

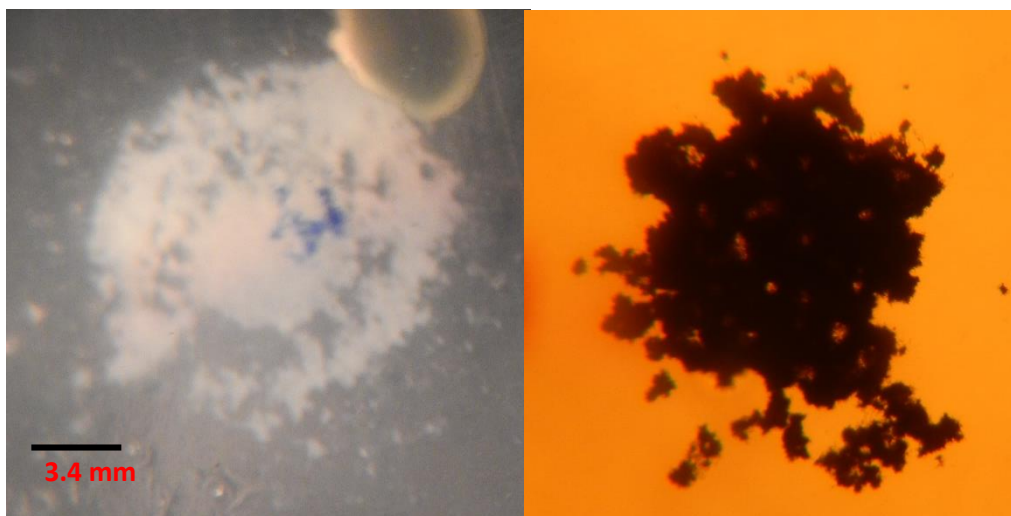
U.T.O 13

Imagen 13 Micrografía a (2x) en microscopio estereoscópico de U.T.O 13 (en cultivo de agar-extracto suelo). A la derecha U.T.O con luz visible, a la izquierda con luz reflejada.

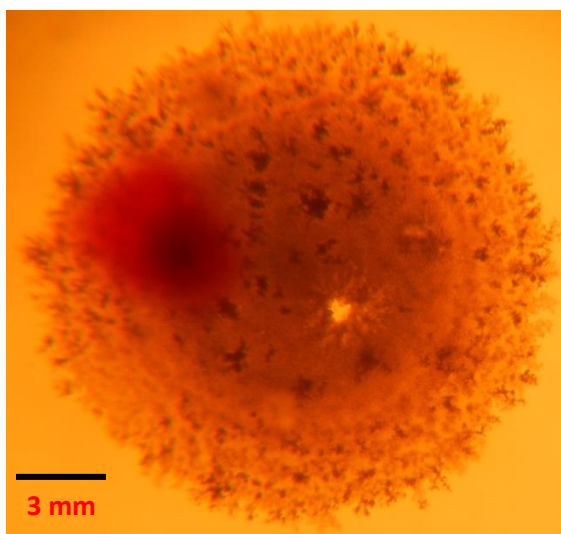
U.T.O 14

Imagen 14 Micrografía a (2x) en microscopio estereoscópico de U.T.O 14 (en cultivo de agar-extracto suelo) con luz reflejada.

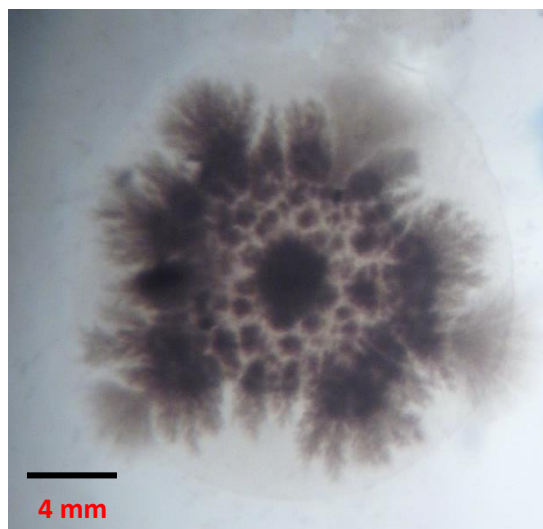
U.T.O 15

Imagen 15 Micrografía a (2x) en microscopio estereoscópico de U.T.O 15 (en cultivo de agar-extracto suelo) con luz visible.

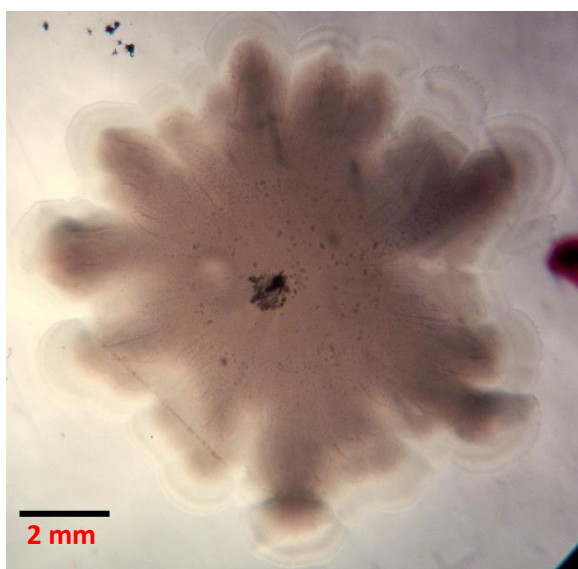
U.T.O 16

Imagen 16 Micrografía a (2x) en microscopio estereoscópico de U.T.O 16 (en cultivo de agar-extracto suelo) con luz visible.

U.T.O 17

Imagen 17 Micrografía a (2x) en microscopio estereoscópico de U.T.O 17 (en cultivo de agar-extracto suelo) con luz visible.

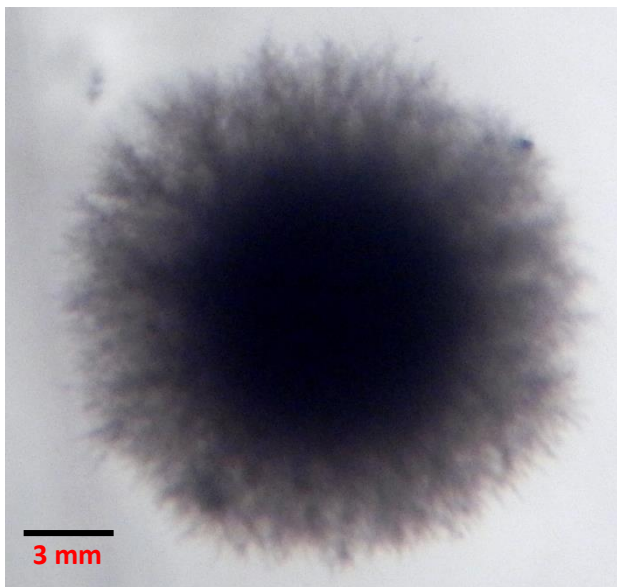
U.T.O 18

Imagen 18 Micrografía a (2x) en microscopio estereoscópico de U.T.O 18 (en cultivo de agar-extracto suelo) con luz visible.

