INFLUENCIA DEL ESTRÉS SALINO EN EL CRECIMIENTO, INTERCAMBIO GASEOSO Y PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS DE STEVIA (*Stevia rebaudiana* Bert.) BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO EN EL CARIBE COLOMBIANO

Autor

ANGELA MARIA CASTILLEJO MORALES

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRONÓMICAS

MONTERÍA-CÓRDOBA

2020

INFLUENCIA DEL ESTRÉS SALINO EN EL CRECIMIENTO, INTERCAMBIO GASEOSO Y PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS DE STEVIA (*Stevia rebaudiana* Bert.) BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO EN EL CARIBE COLOMBIANO

Autor

ANGELA MARIA CASTILLEJO MORALES

Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de Magister en Ciencias Agronómicas

Director: ALFREDO DE JESÚS JARMA OROZCO Ph.D.

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRONÓMICAS

MONTERÍA-CÓRDOBA

2020

Nota de aceptación:

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

Firma del presidente del jurado

_____

Firma del jurado

_____

Firma del jurado

Montería 09 de junio de 2020

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme la sabiduría y fuerza necesaria para alcanzar este gran logro en mi vida personal y profesional.

A mis padres Marieta y Raúl, por su amor, comprensión y apoyo incondicional.

A mi director de tesis Dr. Alfredo Jarma Orozco, por su apoyo incondicional, enseñanzas y paciencia.

A mis jurados Dr. Enrique Combatt Caballero y Profesor Dairo Pérez, por su apoyo y asesorías.

Al profesor Marcelo Pompelli por su asesoría.

A la Universidad de Córdoba mi alma máter y al Grupo de Investigación Participativa de los Pequeños Productores de la Costa Atlántica (INVEPAR) por la financiación de los trabajos de campo.

A la profesional Libia Ochoa por su apoyo en trabajos de campo al igual que agradezco a todo el personal de trabajo de los laboratorios de suelos, fisiología vegetal, fitomejoramiento y biología molecular.

A los estudiantes Carlos Espitia, Jesús Rivera, Ana Carolina Rojas, Adalberto Caraballo, Sol Pájaro, Jhony Córdoba, Leider Castro y kevin Cano por su apoyo en los trabajos de campo y laboratorio.

A mis amigos y colegas por animarme a continuar en este proceso formativo.

INFLUENCIA DEL ESTRÉS SALINO EN EL CRECIMIENTO, INTERCAMBIO GASEOSO Y PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS DE ESTEVIA (*Stevia rebaudiana* Bert.) BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO EN EL CARIBE COLOMBIANO

RESUMEN

La especie *Stevia rebaudiana* (Bertoni) es una planta herbácea, perteneciente al género *Stevia* Cav. característico del continente americano, miembro de la tribu Eupatorieae, familia Asteraceae (Flores y Espinosa, 2018). Es una planta ampliamente extendida en todo el mundo ya que sus hojas producen glucósidos de diterpeno (esteviósidos y rebaudiósidos), edulcorantes bajos en calorías, no tóxicos y de alta potencia que pueden sustituir a la sacarosa y otros edulcorantes sintéticos, siendo 300 veces más dulces que la sacarosa (A. Abbas Momtazi-Borojeni, S.-A. Esmaeili, E. Abdollahi, y A. J. C. p. d. Sahebkar, 2017). El uso de *stevia* se ha incrementado como consecuencia de la conciencia que ha despertado el uso de la sacarosa sobre la salud. Más allá de su valor como edulcorante, *stevia* y sus glucósidos poseen efectos terapéuticos contra varias enfermedades como el cáncer, la diabetes mellitus, la hipertensión, inflamación, fibrosis quística, obesidad y caries dental. Los estudios han demostrado que los glucósidos de esteviol encontrados en s*tevia* no son teratogénicos, mutagénicos o cancerígenos y no causan toxicidad aguda y subaguda (A. Abbas Momtazi-Borojeni, S.-A. Esmaeili, E. Abdollahi, y A. Sahebkar, 2017). Además de los beneficios en la salud humana, el cultivo de *stevia* implica la generación de empleos favoreciendo a la mano de obra campesina y de pequeños productores. En éste sentido, la Universidad de Córdoba ha desarrollado estudios de adaptación y manejo en clones y líneas promisorias de *stevia*, que demuestran la potencialidad de siembra en el Caribe Colombiano gracias a su diversidad agroecológica. No obstante, se desconoce el comportamiento de estas nuevas líneas promisorias frente a los cambios actuales y futuros, consecuencia de las actividades antrópicas no sustentables como es el caso de la salinización de los suelos. Con el crecimiento del mercado de la *stevia*, se ha generado la necesidad de aumentar el área de producción, sin embargo, en el departamento de Córdoba, se presentan problemas de salinización, que afectan los rendimientos de los cultivos, por lo que se hace necesario conocer los aspectos aplicados a la productividad de las plantas de *stevia* bajo condiciones de estrés salino. Por lo anterior, el presente trabajo de investigación tuvo la finalidad de evaluar la respuesta de parámetros de crecimiento, intercambio gaseoso y

pigmentos fotosintéticos de *Stevia rebaudiana* Bert., a diferentes concentraciones de sales (0; 0,2; 0,5; 1,2; 2,0 y 3,0 meq Na/100g) en dos genotipos (C19 y C04) bajo condiciones de invernadero. En el capítulo II, se muestra el estudio del efecto de cinco niveles de salinización bajo condiciones de invernadero sobre la producción y distribución de biomasa de *stevia*. La relación entre el crecimiento y el estrés salino de los dos genotipos de *stevia* estudiados en la presente investigación tiene una tendencia decreciente a medida que se aumentan las dosis de NaCl. La biomasa localizada en los órganos aéreos se afecta significativamente con niveles de 0,2 meq Na/100g. Ambos genotipos mostraron una tendencia al aumento en la biomasa de la raíz en las dosis más altas de NaCl (2,0 y 3,0 meq Na/100g), lo que podría considerarse una respuesta fisiológica de defensa ante el estrés osmótico. En el capítulo III, se muestra la respuesta del intercambio gaseoso en dos genotipos de *Stevia rebaudiana* Bert. bajo cinco concentraciones de sales. Los resultados más relevantes mostraron un comportamiento diferencial en las variables de intercambio gaseoso, DPV, temperatura interna de la hoja y Ci/Ca, que podrían ser explicados por el efecto de la expresión genética. Mientras que los valores de conductancia estomática y transpiración no reportaron efectos de las dosis de NaCl y/o los genotipos. La reducción en la tasa de asimilación de CO_2 está asociada con el aumento de la salinidad pero no se relaciona a los efectos estomáticos, lo que sugiere una respuesta oxidativa de las plantas ante las condiciones de estrés salino.

Palabras claves: Salinidad, *Stevia rebaudiana* (Bert), distribución de biomasa, intercambio gaseoso, pigmentos fotosintéticos, conductancia estomática.

ABSTRACT

The Stevia rebaudiana (Bertoni) species is an herbaceous plant, belonging to the genus Stevia Cav. characteristic of the American continent, member of the Eupatorieae tribe, family Asteraceae (Flores y Espinosa, 2018). It is a plant widely spread throughout the world since its leaves produce diterpene glycosides (steviosides and rebaudiosides), low-calorie, non-toxic and high-potency sweeteners that can replace sucrose and other synthetic sweeteners, being 300 times sweeter than sucrose (A. Abbas Momtazi-Borojeni, S.-A. Esmaeili, E. Abdollahi, and AJC pd Sahebkar, 2017). The use of stevia has increased as a consequence of the awareness that the use of sucrose has raised about health. Beyond its value as a sweetener, stevia and its glycosides have therapeutic effects against various diseases such as cancer, diabetes mellitus, hypertension, inflammation, cystic fibrosis, obesity and dental caries. Studies have shown that the steviol glycosides found in stevia are not teratogenic, mutagenic, or carcinogenic and do not cause acute and subacute toxicity (A. Abbas Momtazi-Borojeni, S.-A. Esmaeili, E. Abdollahi, y A. Sahebkar, 2017). In addition to the benefits in human health, the cultivation of stevia implies the generation of jobs favoring the peasant and small producers labor force. In this sense, the University of Córdoba has developed adaptation and management studies in clones and promising stevia lines, which demonstrate the potential for planting in the Colombian Caribbean thanks to its agro-ecological diversity. However, the behavior of these promising new lines in the face of current and future changes, as a consequence of unsustainable anthropic activities such as the salinization of soils, is unknown. With the growth of the stevia market, the need to increase the production area has been generated, however, in the department of Córdoba, salinization problems arise, which affect crop yields, making it necessary To know the aspects applied to the productivity of stevia plants under saline stress conditions. Therefore, the purpose of this research work was to evaluate the response of growth parameters, gas exchange and photosynthetic pigments of Stevia rebaudiana Bert., To different concentrations of salts (0; 0.2; 0.5; 1, 2; 2.0 and 3.0 meq Na / 100g) in two genotypes (C19 and C04) under greenhouse conditions. Chapter II shows the study of the effect of five levels of salinization under greenhouse conditions on the production and distribution of stevia biomass. The relationship between growth and salt stress of the two stevia genotypes studied in the present investigation has a decreasing trend as NaCl doses are increased. The biomass located in the aerial organs is significantly affected with levels of 0.2 meq Na / 100g. Both genotypes showed a

tendency to increase in root biomass at the highest NaCl doses (2.0 and 3.0 meq Na / 100g), which could be considered a defense physiological response to osmotic stress. In Chapter III, the gas exchange response is shown in two genotypes of Stevia rebaudiana Bert. under five concentrations of salts. The most relevant results showed a differential behavior in the variables of gas exchange, DPV, internal leaf temperature and Ci / Ca, which could be explained by the effect of gene expression. While stomatal conductance and perspiration values did not report effects of NaCl doses and / or genotypes. The reduction in the rate of CO2 assimilation is associated with increased salinity but is not related to stomatal effects, suggesting an oxidative response of plants to saline stress conditions.

Key words: Salinity, Stevia rebaudiana (Bert), biomass distribution, gas exchange, photosynthetic pigments, stomatal conductance.

TABLA DE CONTENIDO

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL 16

1.1 INTRODUCCIÓN 16

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 17

1.3. STEVIA (*Stevia rebaudiana* Bert) 19

1.3.1. Generalidades de la planta de *Stevia rebaudiana* Bert 19

1.3.2 Clasificación sistemática 20

1.3.2 Efecto del estrés salino en las plantas 21

1.3.3 Mecanismos bioquímicos y moleculares de tolerancia a la sal 22

1.3.4 Comportamiento de la fotosíntesis bajo condiciones de estrés salino. 23

1.4 OBJETIVOS 24

1.4.1. Objetivo General 24

1.4.2 Objetivos específicos 24

1.5 LITERATURA CITADA 25

2. CAPITULO II. DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LA BIOMASA EN DOS GENOTIPOS DE *Stevia rebaudiana* Bert. BAJO CINCO NIVELES DE SALINIDAD 27

2.1. RESUMEN 27

2.2. ABSTRACT 27

2.3. INTRODUCCIÓN 28

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS 31

2.4.1. Localización y material experimental 31

2.4.1.1. Localización 31

2.4.1.2. Variables e indicadores 31

2.4.1.2.1. Variables independientes. 31

2.4.1.2.2. Variables dependientes. 31

2.4.1.3. Procedimiento 32

2.4.1.3.1. Preparación de semillero 32
2.4.1.3.2. Montaje del ensayo 33
2.4.1.3.3. Preparación de soluciones salinas 33
2.4.1.3.4. Obtención de esquejes 34
2.4.1.3.5. Trasplante 34
2.4.1.3.6. Toma de datos. 35
2.4.1.3.7. Diseño Experimental 35
2.4.2. Análisis de la información 35
2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 36
2.5.1. PRODUCCCION DE BIOMASA. 36
2.5.1.1. Biomasa de hoja 36
2.5.1.2. Biomasa de tallo 38
2.5.1.3. Biomasa de raíz 40
2.5.1.4. Biomasa total 42
2.5.1.5. Relación raíz – dosel (RRD) 45
2.5.1.6. Índice de Cosecha (IC) 46
2.6. CONCLUSIONES 47
2.7 LITERATURA CITADA 49
3. CAPITULO III. INTERCAMBIO GASEOSO EN DOS GENOTIPOS DE *Stevia rebaudiana* Bert. BAJO CINCO CONCENTRACIONES DE SALES 54
3.1 RESUMEN 54
3.2 ABSTRACT 54
3.3 INTRODUCCIÓN 55
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS 57
3.4.1. Localización y material experimental. 57
3.4.1.1. Localización 57
3.4.1.2. Variables e indicadores 57
3.4.1.2.1. Variables independientes. 57
3.4.1.2.2. Variables dependientes. 57

3.4.1.3 Procedimiento 58
3.4.1.3.1. Preparación de semillero 58
3.4.1.3.2. Montaje del ensayo 58
3.4.1.3.3. Preparación de soluciones salinas 58
3.4.1.3.4. Obtención de esquejes 59
3.4.1.3.5. Trasplante 59
3.4.1.3.6. Toma de datos. 59
3.4.2. Análisis de la información 60
3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 60
3.5.1. VARIABLES DE INTERCAMBIO GASEOSO DE *Stevia rebaudiana* Bert 60
3.5.1.1. Tasa de asimilación de CO_2 (Pn) y pigmentos fotosintéticos. 61
3.5.1.2 Conductancia estomática y transpiración 65
3.5.1.3. Déficit de presión de vapor (DPV) y temperatura interna de la hoja (T° hoja) ... 67
3.5.1.4. Relación de la concentración de CO_2 en el espacio subestomático (Ci/Ca) 69
3.6 Conclusiones 70
3.7 LITERATURA CITADA 72
4. ANEXOS 77
Anexo 1. Efecto de los tratamientos 15 días después del trasplante (DDT) 77

LISTA DE TABLAS

Pág

Tabla 1.1. Clasificación sistemática de *Stevia rebaudiana* Bert (Tomado de Jarma, 2010)…… 20

Tabla 2.1. Cantidad de NaCl utilizada en cada tratamiento…… 34

Tabla 2.2. Cuadrados medios y niveles de significancia para las variables de biomasa por órgano (tallo, raíz, hojas), biomasa total, relación raíz-dosel (RRD) e índice de cosecha (IC) de dos clones de *stevia* en función de seis niveles de salinidad……. 36

Tabla 2.3. Descomposición de la interacción dosis*genotipo para la biomasa de la hoja de dos clones experimentales de *stevia* sometidos a seis niveles de estrés por salinidad. 37

Tabla 2.4. Descomposición de la interacción dosis*genotipo para la biomasa del tallo de dos clones experimentales de *stevia* sometidos a seis niveles de estrés por salinidad. 39

Tabla 2.5. Descomposición de la interacción dosis*genotipo para la biomasa de la raíz de dos clones experimentales de *stevia* sometidos a seis niveles de estrés por salinidad. 41

Tabla 2.6. Descomposición de la interacción dosis*genotipo para la biomasa total de los genotipos C04 y C19 sometidos a seis niveles de salinidad. 43

Tabla 2.7. Descomposición de la interacción dosis*genotipo para la relación raíz-dosel de los genotipos de *stevia* C04 y C19 sometidos a seis niveles de salinidad. 45

Tabla 2.8. Descomposición de la interacción dosis*genotipo para el Índice de Cosecha de los genotipos C04 y C19 sometidos a seis niveles de salinidad. 46

Tabla 3.1. Cuadrados medios y niveles de significancia para las variables de intercambio gaseoso: Tasa de asimilación de CO_2 (Pn), Conductancia estomática (Gs), Traspiración (E), Deficit de presión de vapor (DPV), Temperatura interna de la hoja (T° hoja) y relación de la concentración de CO^2 en el espacio 60

subestomático y el ambiente (Ci/Ca), en dos genotipos de stevia en función de dos niveles de salinidad.

Tabla 3.2. Cuadrados medios para los pigmento fotosintéticos; Chl, Clorofila a; Chl b, clorofila b, Chl total; clorofila total y carotenos. 63

Tabla 3.3 Valores promedios de pigmentos fotosintéticos de dos clones de stevia, sometidos a estrés salino. 64

Tabla 3.4. Valores promedios de la conductancia estomática (mmol H_2O $m^{-2}s^{-1}$) y transpiración (mmol H_2O $m^{-2}s^{-1}$). 65

LISTA DE FIGURAS

Pág

Figura 1.1. Resumen general de los efectos del estrés por salinidad en las plantas. 22

Figura 1.2. Bases fisiológicas y bioquímicas de tolerancia a la salinidad. (Modificado de Niramaya y y col, 2016). 23

Figura 2.1. Propagación de esquejes de *stevia* en bandejas de germinación dentro del invernadero. 32

Figura 2.2. Mezcla tamizada de suelo y arena (relación 3:1) usado como sustrato en el experimento (izq) y bolsas de polietileno correspondientes a las unidades experimentales (der). 33

Figura 2.3. Propagación de esquejes provenientes de dos clones de *stevia*, C04 y C19. 34

Figura 2.4. Plantas de *stevia* usadas para el trasplante definitivo en las bolsas. 35

Figura 2.5. Biomasa de la hoja de dos clones de *stevia* sometidos a condiciones de salinidad. Letras similares no difieren estadísticamente, según los contrastes ortogonales (F, p≤0,05). Las diferencias significativas entre los genotipos a de un mismo nivel de salinidad se representan en letras mayúsculas, mientras que las diferencias observadas dentro de cada genotipo se indican en minúsculas. 38

Figura 2.6. Biomasa del tallo de dos clones de *stevia* sometidos a condiciones de salinidad. Letras similares no difieren estadísticamente, según los contrastes ortogonales (F, p≤0,05). Las diferencias significativas entre los genotipos a de un mismo nivel de salinidad, se representan en letras mayúsculas, mientras que las diferencias observadas dentro de cada genotipo se indican en minúsculas. 39

Figura 2.7. Biomasa de la raíz de dos clones de stevia sometidos a seis condiciones de salinidad. 42

Figura 2.8. Porcentajes de distribución de biomasa de dos clones de Stevia rebaudiana Bert., bajo seis niveles de estrés por salinidad. 44

Figura 3.1. Efectos de los genotipos C04 y C19 sobre la tasa de asimilación de CO2 61

Figura 3.2. Efecto de las dosis salinas sobre la tasa de asimilación de CO2 de Stevia rebaudiana Bert., sometida a cuatro niveles de salinidad. 62

Figura 3.3. Déficit de presión de vapor de dos genotipos de Stevia en condiciones de estrés salino. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre líneas, letras minúsculas indican diferencias dentro de cada genotipo. 68

Figura 3.4. Temperatura interna de la hoja en función de diferentes dosis de NaCl 69

Figura 3.5. Relación de la concentración de CO_2 en el espacio subestomático. 70

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 INTRODUCCIÓN

Stevia rebaudiana Bert., es un arbusto perenne nativo de Paraguay perteneciente a la familia Asteracea, cuyas hojas acumulan naturalmente edulcorantes de glucósido de esteviol (SG) (Hastoy y coll., 2019). Crece como arbusto salvaje en el suroeste de Brasil y zona norte del Paraguay, donde ha sido ampliamente utilizada durante siglos en sus prácticas nutricionales y medicinales, por los indios Guaraníes los cuales la llamaron Ka`a He`e o “hierba dulce” (Jarma, Cardona y Fernández)

Esta planta es importante para la salud debido a sus beneficios terapéuticos contra la diabetes, la hipertensión y la obesidad; además ayuda al control del peso, la saciedad y el hambre. Por su contenido en compuestos fenólicos, la *stevia* actúa también como un excelente antioxidante y anticancerígeno; asimismo se ha demostrado que posee propiedades antibacterianas, anticonceptivas y diuréticas (Salvador-Reyes, Sotelo, Paucar 2014).

Stevia se ha extendido en una amplia gama de ubicaciones climáticas en todo el mundo y aparentemente puede cultivarse con éxito bajo diferentes condiciones de cultivo, aunque a menudo mediante el establecimiento de plántulas en un invernadero antes de plantar en el campo (Hajar, Sulaiman, y Sakinah, 2014). Debido al gran interés económico y científico, la *stevia* se ha cultivado en Asia (China, Japón, Taiwán), América del Norte (Estados Unidos, Canadá) (Šic Žlabur y col., 2013) y América del Sur (Paraguay, Brasil, Argentina, Perú, Colombia) (Jarma y col 2012). Entre las empresas de la industria alimenticia que aprovechan las propiedades de la *stevia* se encuentra Coca Cola con su línea saludable “Coca-Cola life” donde su mayor distinción en la etiqueta verde (Carrero y Suarez 2019).

En Colombia los cultivos de *stevia* más importantes se encuentran distribuidos en distintas zonas del país. Entre las empresas productores de *stevia* se encuentra STEVIAGRO S.A.S, BIO-STEVIA S.A.S y DULCESTEVIA S.A ubicadas en ubicada en Villeta (Cundinamarca), Yumbo (Valle del Cauca) y Sogamoso (Boyacá) respectivamente. La producción se comercializa a nivel nacional e internacional en el mercado alimenticio y medicinal, tales como hojas deshidratadas, extractos en gotas y en polvo, productos

farmacéuticos, medicinales odontológicos y cosméticos (tesis propuesta de negocio UN COOP) (Carrero y Suarez 2019). En el departamento de Córdoba aunque no se tiene con exactitud el área total sembrada, se sabe que este cultivo se ha establecido en zonas del municipio de Valencia donde ha mostrado una buena adaptación (Cordero, 2014).

La Universidad de Córdoba ha desarrollado diferentes trabajos de investigación en el cultivo de *stevia* desde el año 2002 en líneas de la ecofisiología, nutrición, fitopatología y mejoramiento genético. Estos estudios han permitido conocer el comportamiento de *stevia* en la región, así como su adaptabilidad y manejo agronómico que muestran que se puede cultivar en el Caribe Húmedo y Seco Colombiano (Jarma y col. 2005; Jarma y col. 2006). En el presente año, se ha demostrado el uso de la tecnología Bioespacio como una estrategia eficiente, comparada con la siembra bajo radiación directa en campo, ya que genera un efecto positivo sobre la tasa de asimilación neta (TAN) y el índice de cosecha (IC), gracias a la disminución de la radiación y la temperatura causada por el cambio climático en el Caribe Colombiano (Jarma y col, 2020).

Por lo anterior, el establecimiento del cultivo de *stevia* en el departamento de Córdoba utilizando las tecnologías disponibles, promete incursionar en nuevos campos de la industria agrícola, generando nuevos empleos rurales e impactando positivamente el enfoque de género como consecuencia de la necesidad de mano de obra requerida por el cultivo.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la gran demanda de alimentos y a las dificultades de abastecimiento de los mismos, es de alta prioridad buscar nuevas áreas de cultivo; sin embargo, el creciente deterioro de los agroecosistemas ha traído como consecuencia el abandono de muchos de ellos debido al uso inapropiado de los suelos y el uso de agua de baja calidad para riego (Maldonado, 2012). Se ha reportado una gran cantidad de suelos con problemas de salinidad que poseen excelentes condiciones de luz para el crecimiento y la acumulación de metabolitos secundarios de *Stevia rebaudiana* (Pandey y Chikara, 2015). Sin embargo, Reis y col., (2015) informaron que el rendimiento de *stevia* disminuyó por encima de 2 dSm^{-1} de agua de riego, hasta la primera cosecha.

A nivel mundial, se indica que existen más de 800 millones de hectáreas de suelos afectados por altas concentración de diferentes tipos de sales, por lo que se cataloga

como uno de los problemas más importantes de la agricultura (Narváez, Combat, y Bustamante, 2014). Se estima que 6% del área total global y 30% de las tierras de cultivo en el mundo sufren de problemas de suelos salinos (Munns y Tester, 2008). A pesar de ésta problemática, el Caribe Colombiano presenta una diversidad de zonas agroecológicas que la hacen apta para la explotación de diversos cultivos, sin embargo, El área de influencia agropecuaria del delta del río Sinú (Córdoba, Colombia) tiene alto riesgo de salinización, condición química que disminuye la actividad productiva agrícola en esta región, acentuando los problemas en el período seco (Narváez, Combat, y Bustamante, 2014).

La salinidad se considera un factor ambiental limitante del crecimiento de las plantas, asociado con una disminución en la tasa de fotosíntesis (Cantabella, Piqueras, Acosta, Bernal, Hernández, y Díaz, 2017). Esta disminución de la tasa fotosintética neta se asocia primero a un cierre estomático inducido por una disminución de la turgencia de las células foliares que limitan la difusión de CO_2 en la cámara subestomática (Arbona, Manzi, de Ollas, y Gómez-Cadenas, 2013). La presencia de NaCl en suelos induce estrés osmótico, así como la toxicidad de iones en todos los órganos de la planta debido a la acumulación excesiva de iones de sodio ($Na^{+)}$ y cloruro (Cl^-) (Cantabella, Piqueras, Acosta, Bernal, Hernández, y Díaz, 2017).

Diferentes concentraciones de estrés de NaCl mostraron resultados positivos en un cambio significativo en el nivel de Stev y Reb-A (Pandey y Chikara, 2015). En la literatura científica existe la tendencia bien establecida entre el crecimiento y rendimiento de cultivos y la salinidad: por lo general, cuanto mayor es el nivel de salinidad, menor es el crecimiento y rendimiento de la cosecha (Ityel, Lazarovitch, Silberbush, y Ben-Gal, 2012) (Jamil, y col, 2012) (Shannon y Grieve, 1999), sin embargo, algunos autores han informado que el cultivo de *stevia* presenta mayor tolerancia y menor sensibilidad a la salinidad que los cultivos tradicionales de caña de azúcar, haciéndolo apto para la siembra en regiones semiáridas con niveles leves de salinidad (Reis, Coelho, Santos, Kienle, y Beltro, 2015). Se ha encontrado que largos períodos de estrés relacionado al NaCl no produce cambios en las concentraciones de clorofila en las hojas de *stevia*, lo que podría reflejar un mecanismo de protección de la fotosíntesis, además los autores indican la planta es capaz de inducir o mantener enzimas antioxidantes para hacer frente al estrés oxidativo (Cantabella, Piqueras, Acosta, Bernal, Hernández, y Díaz, 2017).

Diversos estudios han reportado alteraciones en la biomasa, actividades de enzimas antioxidantes y osmolitos, contenido de minerales y metabolitos secundarios, cuando las plantas están sometidas a condiciones de estrés salino (Ben Ahmed, Ben Rouina, Sensoy, Boukhriss, y Abdullah, 2009). La acumulación de iones tóxicos en el interior de la vacuola y la producción de enzimas antioxidantes como eliminadores de ROS durante el estrés, son mecanismos de tolerancia importantes contra el estrés oxidativo, y por lo tanto, contra el estrés salino (Acosta-Motos, Díaz-Vivancos, Álvarez, Fernández-García, Sánchez-Blanco, y Hernández, 2015a).

De acuerdo a la problemática descrita, y con el propósito de determinar nuevas áreas de influencia agrícola en la Costa Caribe Colombiana, se realizó el siguiente cuestionamiento: ¿Cuál sería la respuesta de la producción de biomasa, variables de intercambio gaseoso y pigmentos fotosintético de dos clones de *stevia* (C4 y C19), ante el efecto que genera la exposición de diferentes niveles de sales (NaCl) en el suelo bajo condiciones de invernadero?

Considerando lo anterior, la Universidad de Córdoba, vienen adelantando estudios de evaluación morfo-agronómica de clones de *Stevia* bajo condiciones del valle del Sinú medio para el programa de mejoramiento genético, sin embargo, se hace necesario adelantar trabajos de investigación que permitan conocer el comportamiento de los nuevos materiales bajo condiciones de estrés y determinar los niveles de salinidad que puede tolerar el cultivo, basándose en la respuesta de la planta ante estas condiciones.

1.3. STEVIA (*Stevia rebaudiana* Bert)

1.3.1. Generalidades de la planta de *Stevia rebaudiana* Bert

Stevia es una planta herbácea semi-perenne uno de los 154 miembros del género *Stevia*, nativa de Paraguay, que ha demostrado su versatilidad de adaptación a diversos ambientes en el mundo (Jarma, Cardona, y Fernández, 2012). Esta planta, se caracteriza por producir glucósidos de esteviol (diterpenos), que pueden ser hasta 300 veces más dulces que la sacarosa. (Jarma, Cardona, y Fernández, 2012).

El género *Stevia* es endémico del continente americano, con ocurrencia del sudeste de Estados Unidos al norte de Argentina, particularmente a lo largo de las montañas Andinas (Yadav, Singh, Dhyani, y Ahuja, 2011). La reproducción de *stevia* por semilla no es

recomendada por su gran variabilidad fenotípica, lo cual se traduce en una menor calidad de hoja, por lo que la reproducción se hace vegetativamente con el fin de conservar las características genéticas por medio de esquejes obtenidos de plantas adultas seleccionadas y fito-sanitariamente

La planta puede alcanzar más de 1 metro de altura y posee un extenso sistema radicular (Yadav, Singh, Dhyani, y Ahuja, 2011). El tallo es erecto, frágil y ramificado, pudiendo o no ser pubescente (Serfaty, Ibdah, Fischer, Chaimovitsh, Saranga, y Dudadi, 2013). El sistema radicular de la *stevia* es pivotante al principio del desarrollo. Después del primer corte se verifica una diferenciación celular en la región del colecto y el sistema radicular se vuelve fasciculado, (Kinghorn, 2002) (Lima y col, 2004).

La planta crece naturalmente en áreas con precipitación anual variando entre 1500 a 1800 mm por año en clima subtropical semi-húmedo, con una necesidad hídrica relativamente alta para su crecimiento y desarrollo. Las hojas y los tallos se marchitan rápidamente en condiciones de déficit hídrico, pero poseen recuperación rápida en el caso de tensiones no prolongadas (Yadav, Singh, Dhyani, y Ahuja, 2011) (Lemus y col, 2012). Las temperaturas ideales para el rápido desarrollo de esta especie se sitúan entre 20 a 24 ° C. La estética no se desarrolla bien a bajas temperaturas y usualmente no resiste a temperaturas por debajo de los 9 ° C (Singh y Rao, 2005)..

1.3.2 Clasificación sistemática

Tabla 1.1. Clasificación sistemática de *Stevia rebaudiana* Bert (Tomado de Jarma, 2010).

Clasificación Botánica:	Angioespermas
Subdivisión:	Spermatophyta (plantas de semilla)
Grupo de Clasificación:	Dicotyledonae
Serie:	Multiaristae
Tribu:	Eupatorieas
Familia:	Compuestas: Asteraceae de Monochlamydeae
Orden:	Campanulales
Género:	*Stevia*
Especie:	Rebaudiana
Sinónimos:	Rebaudianum de Eupatorium.

Nombres comunes:	*Stevia*, hoja dulce de Paraguar, caa él éé, jheéé de kaa, ca un jhei, Ka'a He'e ca un yipi, azucacaa, caa de eira, doce de capim, doce de erva, hierba dulce, yerba de miel, honeyleaf, waan de yaa, hojas de dulces.

1.3.2 Efecto del estrés salino en las plantas

El crecimiento de las plantas en ambientes salinos se ve afectado en dos fases; fase osmótica (respuesta temprana) y fase iónica (respuesta tardía) (Munns y Tester 2008). La fase temprana del estrés salino se debe a la sal fuera de la zona radicular, mientras que el estrés salino en la fase tardía es el resultado del efecto tóxico de la sal dentro de la planta (Munns 2005). La respuesta temprana da como resultado la inhibición de la absorción de agua, del crecimiento de las raíces, del alargamiento celular, del desarrollo de las hojas, de la reducción de nuevas hojas y la lesión de las células en las hojas que transpiran, etc. La respuesta a largo plazo del estrés por salinidad se produce debido a los efectos tóxicos de la sal dentro de la planta, como el secuestro en las hojas más viejas que causa la senescencia prematura de las hojas, la inhibición de la fotosíntesis y las actividades enzimáticas (Munns 2005; De Oliveira col 2013; Roy y col, 2014). El impacto del estrés en la fotosíntesis es directo, a través de la disminución de la disponibilidad de CO_2 causada por las limitaciones de difusión a través de los estomas y el transporte mesofílico del CO_2, así como por alteraciones en el metabolismo fotosintético, o secundario, como el estrés oxidativo que surge de la superposición de múltiples tensiones (Chaves y col. 2009).

La senescencia de las hojas es el último paso, ya que los nutrientes depositados en las hojas circulan a otros órganos en desarrollo. El estrés salino resulta en una senescencia temprana de la hoja, una tasa reducida de fotosíntesis y una disminución en la acumulación de nutrientes que finalmente resulta en una productividad reducida del cultivo (Figura 1.1).

Figura 1.1. Resumen general de los efectos del estrés por salinidad en las plantas.

1.3.3 Mecanismos bioquímicos y moleculares de tolerancia a la sal

Las plantas evolucionan con diferentes mecanismos bioquímicos y moleculares para combatir el estrés osmótico e iónico. Estos incluyen la acumulación selectiva o la exclusión de iones, el control de la absorción de iones por las raíces y el transporte a las hojas, la compartimentación de iones a nivel celular y de plantas enteras, síntesis de solutos compatibles, cambios en la ruta fotosintética, inducción de enzimas antioxidantes y hormonas vegetales (Parida y Das 2005; Roy y col. 2014) (Figura 1.2).

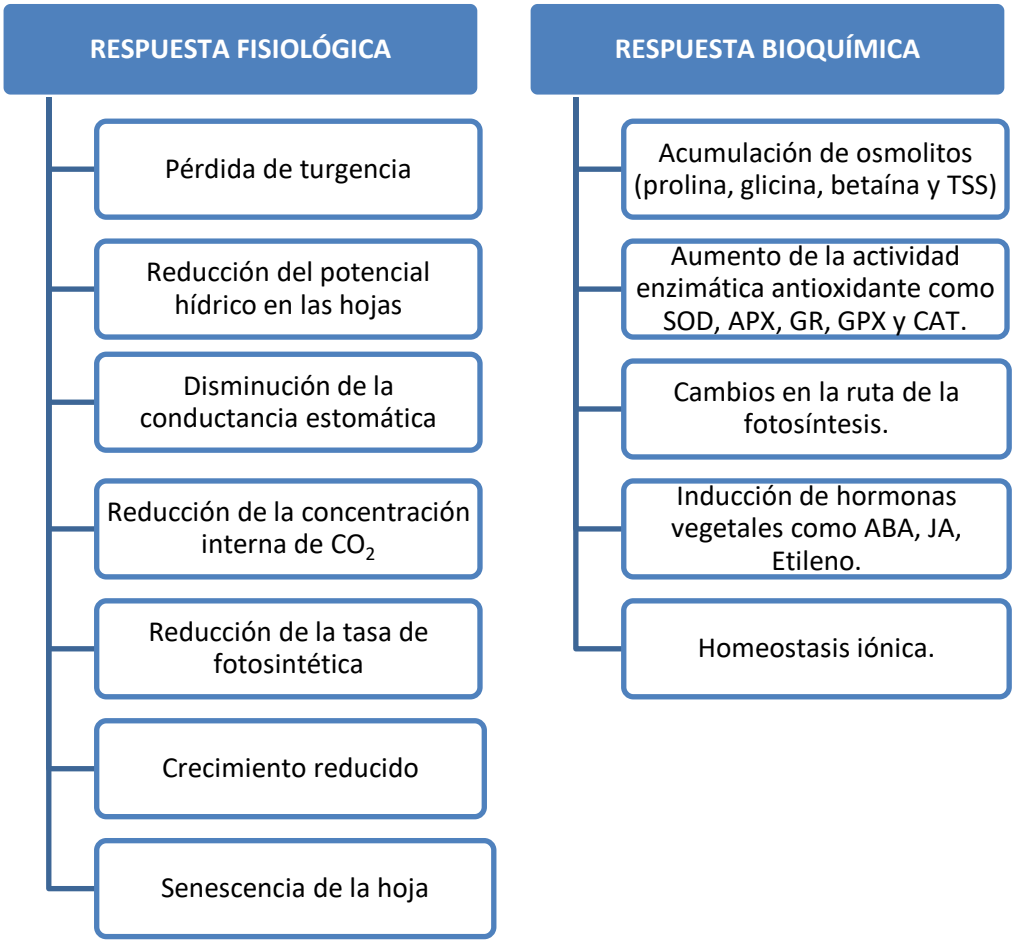

Figura 1.2. Bases fisiológicas y bioquímicas de tolerancia a la salinidad. (Modificado de Niramaya y col, 2016).

1.3.4 Comportamiento de la fotosíntesis bajo condiciones de estrés salino.

Las tensiones abióticas obstaculizan severamente el mecanismo de fotosíntesis al interrumpir el fotosistema I y II, la fijación de carbono, el sistema generador de ATP, el transporte de electrones y la conductancia estomática (Nouri y col. 2015). La acción coordinada del núcleo y el cloroplasto regula la expresión de genes y proteínas relacionados con la fotosíntesis (Niramaya, y col 2016). Se observó una mejor expresión de la proteína de unión a clorofila a / b (CAB), subunidades PSI y PSII, ATP sintasa y ferredoxina NADPH + oxidorreductasa en respuesta al estrés (Saibo y col. 2009; Nouri y col 2015). En algunas plantas, Chl b puede convertirse en Chl a durante el proceso de degradación de la clorofila, lo que resulta en un mayor contenido de Chl a en especies

tolerantes a la sal (Akram y Ashraf 2011; Ashraf y Harris 2013). Los carotenoides (Car) juegan un papel importante como precursores en la señalización durante el desarrollo de la planta bajo estrés abiótico o biótico. Los carotenoides tienen potencial para mejorar la calidad nutricional y el rendimiento de la planta, así como desempeñar un papel importante en la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Davison y col. 2002).

1.4 OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo General

Evaluar la respuesta de parámetros de crecimiento, intercambio gaseoso y pigmentos fotosintéticos de *Stevia rebaudiana* Bert., a diferentes concentraciones de sales bajo condiciones de invernadero.

1.4.2 Objetivos específicos

Evaluar la distribución espacial de biomasa en dos genotipos de *Stevia rebaudiana* Bertoni bajo cinco niveles de salinidad.

Cuantificar la respuesta de variables de intercambio gaseoso en dos genotipos de *Stevia rebaudiana* Bertoni bajo cinco concentraciones de sales.

Determinar el comportamiento de pigmentos fotosintéticos de *Stevia rebaudiana* Bertoni bajo cinco concentraciones de sales.

1.5 LITERATURA CITADA

Abbas Momtazi-Borojeni, A., Esmaeili, S.-A., Abdollahi, E., & Sahebkar, A. (2017). A Review on the Pharmacology and Toxicology of Steviol Glycosides Extracted from Stevia rebaudiana. *Current Pharmaceutical Design, 23*(11), 1616-1622.

Assaei, R., Mokarram, P., Dastghaib, S., Darbandi, S., Darbandi, M., Zal, F. Omrani, G. H. (2016). Hypoglycemic effect of aquatic extract of Stevia in pancreas of diabetic rats: PPARγ-dependent regulation or antioxidant potential. *8*(2), 65.

Bertoni, M. (1905). Le Kaa´He-e´ Sa nature et ses proprietes. *Anales Cientificos Paraguayos*, p 1 - 14.

Bhasker, S., Madhav, H., & Chinnamma, M. (2015). Molecular evidence of insulinomimetic property exhibited by steviol and stevioside in diabetes induced L6 and 3T3L1 cells. *22*(11), 1037-1044.

Debnath, M. (2008). Clonal propagation and antimicrobial activity of an endemic medicinal plant Stevia rebaudiana. *2*(2), 45-51.

Flores, E. V., & Espinosa, O. (2018). El género Stevia (Eupatorieae, Asteraceae) en el estado de Morelos, México. (125), 7-36.

Ghaheri, M., Miraghaee, S., Babaei, A., Mohammadi, B., Kahrizi, D., Haghighi, Z. S., & Bahrami, G. J. C. M. B. (2018). Effect of Stevia rebaudiana Bertoni extract on sexual dysfunction in Streptozotocin-induced diabetic male rats. *64*, 6-10.

Hajar, E., Sulaiman, A., & Sakinah, A. (2014). Assessment of Heavy Metals Tolerance in Leaves, Stems and Flowers of Stevia Rebaudiana Plant. *Procedia Environmental Sciences, 20*, 386-393. doi:https://doi.org/10.1016/j.proenv.2014.03.049

Hastoy, C., Cosson, P., Cavaignac, S., Boutié, P., Waffo-Teguo, P., Rolin, D., & Schurdi-Levraud, V. (2019). Deciphering performances of fifteen genotypes of Stevia rebaudiana in southwestern France through dry biomass and steviol glycoside evaluation. *Industrial Crops and Products, 128*, 607-619. doi:https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.09.053

Jarma-Orozco, A., Combatt-Caballero, E., & Jaraba-Navas, J. (2020). Growth and development of Stevia rebaudiana Bert., in high and low levels of radiation. *Current Plant Biology*, 100144. doi:https://doi.org/10.1016/j.cpb.2020.100144

Jarma, A. (2010). Adaptación de dos clones de Estevia (Stevia rebaudiana bert.) en tres ambientes del Caribe colombiano/Adaptation of two clones of Stevia (Stevia rebaudiana bert.) in three Colombian Caribbean environments.

Jarma A., Cardona C., Fernández, C. (2012). Temperature and radiation effect on steviol glycosides production in Stevia rebaudiana in the Colombian humid Caribbean region. *15*(2), 339-347.

Kim, N.-C., & Kinghorn, D. (2002). Highly sweet compounds of plant origin. *25*(6), 725-746.

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

López, V., Pérez, S., Vinuesa, A., Zorzetto, C., Abian, O. (2016). Stevia rebaudiana ethanolic extract exerts better antioxidant properties and antiproliferative effects in tumour cells than its diterpene glycoside stevioside. *7*(4), 2107-2113.

Nunes, E. (2017). *Aspectos fisiológicos, morfológicos e nutricao mineral no acúmulo de biomasa e glicosídeos diterpénicos em Stevia rebaudiana Bertoni.* Retrieved from Curitiba:

Ritu, M., Nandini, J. (2016). Nutritional composition of Stevia rebaudiana, a sweet herb, and its hypoglycaemic and hypolipidaemic effect on patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. Agriculture *96*(12), 4231-4234.

Rojas, E., Bermúdez, V., Motlaghzadeh, Y., Mathew, J., Fidilio, E., Faria, J., Mantilla, L. (2018). Stevia rebaudiana Bertoni and its effects in human disease: emphasizing its role in inflammation, atherosclerosis and metabolic syndrome. *7*(3), 161-170.

Sánchez, J. A. (2017). Análisis Subsectorial del Cultivo de Stevia (1.1. 1).

Šic Žlabur, J., Voća, S., Dobričević, N., Ježek, D., Bosiljkov, T., & Brnčić, M. J. A. C. S. (2013). Stevia rebaudiana Bertoni-A review of nutritional and biochemical properties of natural sweetener. *78*(1), 25-30.

Sistemas de Producaoo 5: Estévia. (2004). Retrieved from Embrapa:

Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-poency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. (2012). *Food Chemistry*, 1121-1132.

Yadav, A., Singh, S., Han , Y., Yuan, H., Gu, C., & Wang, Z. (2015). Envirionmental cues induce changes of steviol glycosides contents and transcription of corresponding biosynthetic genes in Stevia rebaudiana. *Plant Physiology and Biochemistry*, p 174 - 180.

2. CAPITULO II. DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LA BIOMASA EN DOS GENOTIPOS DE *Stevia rebaudiana* Bert. BAJO CINCO NIVELES DE SALINIDAD

2.1. RESUMEN

La *stevia* es una planta de origen paraguayo de gran interés económico por su capacidad edulcorante y cuyo consumo aporta beneficios para la salud humana. La salinidad, es uno de los factores ambientales más limitantes del rendimiento de los cultivos en todo el mundo. En el caribe colombiano se han reportado problemas de salinización en algunas localidades. El objetivo de este trabajo fue evaluar la producción y distribución espacial de biomasa los clones experimentales de *stevia* C04 y C19, bajo seis niveles de salinidad (0; 0,2; 0,5; 1,2; 2,0 y 3 meq Na/100g), en condiciones de invernadero. Los resultados indican que la distribución de biomasa total de la planta de C19 superó en 42,8% a C04 a niveles bajos de salinidad (0,2 meq Na/100g). Los niveles de salinidad de 0,5; 1,2; 2,0 y 3;0 meq Na/100g afectaron la biomasa aérea y total de ambos genotipos por igual. La biomasa enviada a la raíz aumentó significativamente en ambos genotipos con dosis moderadas a altas de NaCl (0,5; 1,2 y 2,0 meq Na/100g), sin embargo, la relación raíz/dosel fue mayor a dosis elevadas de NaCl (2,0 y 3,0 meq Na/100g), siendo C04 más eficiente en el envío de fotoasimilados hacía la raíz. Estos resultados permiten concluir que los materiales de *stevia* evaluados fueron susceptibles a 0,2 meq Na/100g, siendo el C19 más tolerante desde el punto de vista de la biomasa enviada al órgano de interés comercial.

Palabras claves: producción de biomasa, salinidad, índice de cosecha.

2.2. ABSTRACT

Stevia is a plant of Paraguayan origin of great economic interest for its sweetening capacity and whose consumption provides benefits for human health. Salinity is one of the most limiting environmental factors in crop yield worldwide. In the Colombian Caribbean, salinization problems have been reported in some localities. The objective of this work was to evaluate the production and spatial distribution of biomass in the experimental *stevia* clones: C04 and C19, under six salinity levels (0; 0.2; 0.5; 1.2; 2.0 and 3 meq Na / 100g) under greenhouse conditions. The results indicate that the total biomass distribution of the C19 plant exceeded C04 by 42.8% at low salinity levels (0.2 meq Na / 100g). Salinity

levels of 0.5; 1,2; 2.0 and 3; 0 meq Na / 100g affected the aerial and total biomass of both genotypes equally. The biomass sent to the blood root in both genotypes with moderate to high doses of NaCl (0.5, 1.2 and 2.0 meq Na / 100g), however, the root / canopy ratio was higher at high doses. NaCl (2.0 and 3.0 meq Na / 100g), being C04 more efficient in sending photoassimilates made the root. These results allowed us to conclude that the *stevia* materials evaluated were susceptible to 0.2 meq Na / 100g, with C19 being more tolerant from the point of view of biomass sent to the organ of commercial interest.

Key words: biomass production, salinity, harvest index.

2.3. INTRODUCCIÓN

Stevia rebaudiana Bert es una planta herbácea semi-perenne que ´pertenece a uno de los 154 miembros del género *Stevia*. Es nativa de Paraguay y ha demostrado su versatilidad de adaptación a diversos ambientes en el mundo (Jarma, Cardona y Fernández, 2012). Crece como arbusto salvaje en el suroeste de Brasil y zona norte del Paraguay, donde ha sido ampliamente utilizada durante siglos en sus prácticas nutricionales y medicinales, por los indios Guaraníes los cuales la llamaron Ka`a He`e o “hierba dulce”. La importancia de la planta de *stevia* está relacionada con la presencia de glucósidos de esteviol como edulcorantes naturales. Estos metabolitos tienen un bajo contenido calórico y un poder endulzante natural (Shahverdi, y col,. 2018). Por lo tanto, existe una gran demanda de hierba de stevia en las industrias alimentaria y farmacéutica (Barbet-Massin y col., 2015b). Además de esto, *S. rebaudiana* con sus metabolitos secundarios también ofrece beneficios terapéuticos, ya que tiene efectos antihiperglucémicos, antihipertensivos, antiinflamatorios, antitumorales, antidiarreicos, diuréticos e inmunomoduladores (Lemus-Mondaca y col., 2012; Aranda- Gonz alez y col., 2014).

La salinidad, definida como un alto contenido de sales solubles, es uno de los factores limitantes ambientales más importantes que afectan el rendimiento de los cultivos en todo el mundo (Zheng y col., 2013; Gharasallah y col., 2016). El cloruro de sodio (NaCl) se considera la composición de sal dominante en el suelo (Munns y Tester, 2008). Un suelo se considera salino cuando la solución del suelo alcanza aproximadamente 40 mM de NaCl (Acosta-Motos y col., 2017). La propagación de la salinización del suelo generalmente está relacionada con regiones áridas, donde las bajas precipitaciones y las

tasas adversas de evapotranspiración junto con sistemas de riego y drenaje inadecuados y las características del suelo dificultan la lixiviación de sal (Trnka y col., 2013).

A nivel mundial, se indica que existen más de 800 millones de hectáreas de suelos afectados por altas concentración de diferentes tipos de sales, se estima que 6% del área total global y 30% de las tierras de cultivo en el mundo sufren de problemas de suelos salinos (Munns y Tester, 2008). La FAO (2005), estimó que 400 millones de hectáreas son afectadas por procesos de salinización y, de 23 millones de hectáreas tecnificadas con riego, el 20% presentan algún grado de salinización y el 10%, tienen riesgo de salinización, por la formación de diferentes tipos de sales. Por su parte, el área de influencia agropecuaria del delta del río Sinú (Córdoba, Colombia) tiene alto riesgo de salinización, siendo en el período seco, la época de mayor expresión de éstos problemas en los primeros 20 cm de profundidad en algunas localidades (Narváez, Combat, y Bustamante, 2014).

En la literatura científica existe la tendencia bien establecida que el crecimiento de cultivos y el rendimiento de la cosecha, por lo general, es menor a mayores niveles de sales en el suelo (Ityel, Lazarovitch, Silberbush, y Ben-Gal, 2012). Sin embargo, algunos autores han informado que el cultivo de *stevia* presenta mayor tolerancia y menor sensibilidad a la salinidad que los cultivos tradicionales de caña de azúcar, haciéndolo apto para la siembra en regiones semiáridas con niveles leves de salinidad (Reis, Coelho, Santos, Kienle, y Beltro, 2015).

La presencia de NaCl en los suelos induce estrés osmótico y toxicidad iónica en todos los órganos de las plantas debido a la acumulación excesiva de los iones fitotóxicos sodio (Na^{+}) y cloruro (Cl^{-}) (Cantabella y col, 2017). Esto a su vez conduce a un desequilibrio nutricional debido a una disminución de otros nutrientes importantes, como calcio (Ca^{+2}), magnesio (Mg^{+2}) y potasio (K^{+}) (Munns y Tester, 2008; Parida y Das, 2005). La acumulación de iones tóxicos puede ser un mecanismo positivo para tratar el estrés osmótico, pero solo si las plantas tienen la capacidad de compartimentar estos iones dentro de la vacuola (Acosta-Motos y col., 2015b).

De acuerdo con Reis y col (2015), el crecimiento y el rendimiento de S. *rebaudiana* se redujo cuando la conductividad eléctrica (CE) del agua de riego fue superior a $2dSm^{-1}$. Estos autores también concluyeron que *Stevia* es adecuada para ser cultivada en

regiones semiáridas y salinas, con una sola cosecha, y para obtener dos o más cosechas, solo se debe usar agua dulce con EC inferior a $2dSm^{-1}$. Por su parte, Cantabella y col, 2017, reportaron que el estrés salino no tiene un efecto significativo sobre el crecimiento de *stevia*; estás plantas acumulan sodio (Na^+) en sus raíces, evitando así la acumulación excesiva de Na^+ en las hojas. Estos resultados, sugieren que las plantas de *stevia* inducen mecanismos de tolerancia para minimizar los efectos nocivos del estrés salino, por lo que aseguran que las aguas salinas se pueden utilizar para cultivar plantas de *stevia* y producir glucósidos de esteviol (SG).

El crecimiento es definido como un aumento constante en el tamaño de un organismo, acompañado de procesos como la morfogénesis y la división celular (Taiz y Zeiger, 2006). Mohr (1995) define éste concepto como un proceso fisiológico complejo, que depende directamente de la fotosíntesis, la respiración, la división celular, la elongación, la diferenciación, entre otros, y que además está influenciada por factores como temperatura, intensidad de luz, densidad de población, calidad de la semilla, disponibilidad de agua y de nutrientes. El crecimiento en el campo es dependiente de la variación genética y de las condiciones ambientales (relación planta-suelo-atmósfera). Un primer nivel de estudio en el crecimiento de las plantas, se centra en el aumento de materia seca en el tiempo (Goudriaan y Van Larr, 1995). El análisis matemático de crecimiento vegetal usa medidas directas tales como masa seca por órganos, masa seca total de la planta y otras medidas derivadas de estas.

El cultivo de *stevia* expresa todo su potencial cuando se dan las condiciones ideales para su crecimiento y desarrollo, sin embargo, pocos autores han centrado su atención en la respuesta al estrés salino en la familia Asteraceae, y los estudios sobre el efecto de dicho estrés en la *Stevia* son escasos. Debido a la gran demanda actual de la especie y al creciente deterioro de los agroecosistemas como consecuencia del uso inapropiado del suelo, deficientes prácticas de manejo y uso de agua de baja calidad para riego, se hace indispensable estudiar el comportamiento de nuevos materiales genéticos para el aprovechamiento de dichas áreas degradadas.

En la Universidad de Córdoba, se vienen adelantando estudios de evaluación morfo-agronómica de diferentes clones de *Stevia* bajo condiciones del valle del Sinú medio para el programa de mejoramiento genético. Estos materiales fueron seleccionados para el desarrollo de la presente investigación por sus características morfo-agronómicas

deseables, sin embargo, es desconocido el comportamiento de los nuevos materiales bajo condiciones de estrés por salinidad. En este estudio utilizamos plantas de *S. rebaudiana* Bertoni multiplicadas en condiciones de invernadero, para evaluar los efectos de diferentes tratamientos con NaCl en dos genotipos (CL004 y CL019), sobre parámetros de crecimiento.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1. Localización y material experimental

2.4.1.1. Localización

El estudio fue realizado en condiciones de invernadero de la Granja Experimental de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Córdoba (Montería-Colombia), localizada en las coordenadas 8° 52' de Latitud Norte y 76^0 58` de Longitud Oeste, respecto al meridiano de Greenwich. La temperatura media del aire es 28 ^{0}C, humedad relativa promedio del 83%, altura sobre el nivel del mar de 18 m.s.n.m, y precipitación anual de 1200 mm (Palencia *y col.* 2006). Esta localidad se encuentra en la zona de transición de Bosque Seco Tropical – Bosque Húmedo Tropical (Holdrige 1986).

2.4.1.2. Variables e indicadores

Se determinaron las siguientes variables:

2.4.1.2.1. Variables independientes.

- Niveles de salinidad (NaCl): (0; 0,2; 0,5; 1,2; 2,0 y 3 meq Na/100g).
- Clones experimentales de *stevia*: CL004 y CL019

2.4.1.2.2. Variables dependientes.

Estas variables fueron medidas a los 60 días después del trasplante (DDT).

- Biomasa de hojas (g)
- Biomasa de raíz (g)
- Biomasa de hojas (g)
- Biomasa total (g)

- Relación raíz – dosel
- Índice de cosecha

La biomasa total corresponde a la sumatoria de la biomasa de tallo, raíz y hojas. Las muestras se llevaron al laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad de Córdoba y se sometieron a secado por 48 horas a 70°C. Después de este tiempo se pesó el material vegetal seco.

2.4.1.3. Procedimiento

El ensayo comprendió cuatro fases de ejecución: 1). Propagación de plantas (la cual tuvo una duración de 7 meses aproximadamente, desde julio de 2018 a enero de 2019), 2). Invernadero (la cual tuvo una duración de 4 meses aproximadamente desde enero de hasta mayo de 2019). 3). Realización del análisis estadístico y 4). Interpretación de los datos.

2.4.1.3.1. Preparación de semillero

El sustrato utilizado para el semillero fue una mezcla de arena, materia orgánica y fibra de coco en una relación 1:1:1 y se desinfectó con Metalaxil + Mancozeb en una mezcla de 30 gramos del producto por cada 10 litros de agua.

Una vez desinfectado el sustrato de las bandejas de germinación, se propagaron esquejes de *stevia* de los clones C04 y C19 del programa de mejoramiento genético de la Universidad de Córdoba, luego se trasplantaron en macetas a los 120 días como se muestra en la figura 2.1.

Figura 2.1. Propagación de esquejes de *stevia* en bandejas de germinación dentro del invernadero.

2.4.1.3.2. Montaje del ensayo

Se realizó la incubación anaeróbica del suelo por 7 días bajo condiciones de invernadero. Se diluyó la solución de sal correspondiente a cada tratamiento en 4.5 litros de agua y se aplicaron en cada bolsa a capacidad de campo.

Se utilizaron 120 bolsas de polietileno negro con capacidad de 10 litros, que correspondieron al total de unidades experimentales, dos plantas de *stevia* por cada bolsa, 60 unidades para el genotipo C04 y las 60 restantes al genotipo C019.

El sustrato utilizado fue una mezcla suelo y arena tamizados en relación 3:1, previamente esterilizado por solarización. Las bolsas no presentaron orificios para drenaje con la finalidad de mantener la salinidad constante durante el experimento (Figura 2.2).

Figura 2.2. Mezcla tamizada de suelo y arena (relación 3:1) usado como sustrato en el experimento (izq) y bolsas de polietileno correspondientes a las unidades experimentales (der).

2.4.1.3.3. Preparación de soluciones salinas

La tabla 2.1, muestra las dosis NaCl utilizadas como tratamientos de la presente investigación. Las cantidades se definieron con base a la literatura y la asesoría personal de expertos regionales en la temática.

Tabla 2.1. Cantidad de NaCl utilizada en cada tratamiento.

Dosis salina meq Na/100g	NaCl Kg/ha	Gramos de Na / bolsa	Gramos de Na en NaCl	Total de NaCl (g)
0	0	0	0	0
0,2	92	0,828	3,6	72
0,5	276	2,484	10,8	216
1,2	552	4,968	21,6	432
2,0	920	8,28	36	720
3,0	1380	12,42	54	1080

2.4.1.3.4. Obtención de esquejes

Los esquejes son secciones de las ramas juveniles de plantas madres adultas (establecidas en campos de la Universidad de Córdoba, Figura 2.3.), que presentaron las siguientes características:

1. Provinieron de plantas vigorosas y sanas

2. No presentaron flor o botón floral.

3. Tuvieron entre 8 y 10 cm de longitud y como mínimo 5 pares de hojas.

Figura 2.3. Propagación de esquejes provenientes de dos clones de *stevia*, C04 y C19.

2.4.1.3.5. Trasplante

Este se realizó cuando las plántulas alcanzaron una altura de 15 cm, las cuales se ubicaron en las macetas plásticas con capacidad de 10 litros cada una, para garantizar el desarrollo radicular, luego se ubicaron en el invernadero de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Córdoba (Figura 2.4).

Figura 2.4. Plantas de *stevia* usadas para el trasplante definitivo en las bolsas.

2.4.1.3.6. Toma de datos.

En Laboratorio se determinó la biomasa total y por órganos a los 60 días después del trasplante después del trasplante.

2.4.1.3.7. Diseño Experimental

El ensayo se estableció mediante un DCA (Diseño completamente al azar) con arreglo factorial 2 x 6, para un total de 12 tratamientos y 10 repeticiones por tratamiento, donde el factor A correspondió a los clones (C04 y C19) y el factor B correspondió a los seis niveles de salinidad (0; 0,2; 0,5; 1,2 2,0 y 3,0 meq Na/100g).

2.4.2. Análisis de la información

Los resultados se analizaron mediante el paquete Statistical Analysis System (SAS) de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Córdoba. Las pruebas de comparación de medias se utilizaron cuando se detectaron diferencias estadísticas en los factores individuales mediante la prueba LSD (Diferencia menos significativa) de Fischer, y las interacciones fueron descompuestas a través de contrastes ortogonales con nivel de probabilidad del 5%.

2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1. PRODUCCCION DE BIOMASA.

Los resultados consignados en la tabla 2.2, indican que la distribución de la biomasa en los distintos órganos de la planta, fue diferencial entre los genotipos, ante los distintos niveles de estrés por salinidad. Por lo tanto, a continuación se descomponen las interacciones sin hacer referencia al efecto de los factores individuales.

Tabla 2.2. Cuadrados medios y niveles de significancia para las variables de biomasa por órgano (tallo, raíz, hojas), biomasa total, relación raíz-dosel (RRD) e índice de cosecha (IC) de dos clones de *stevia* en función de seis niveles de salinidad.

Fuente de variación	Biomasa Hoja	Biomasa Tallo	Biomasa Raíz	Biomasa Tot	RRD	IC
Genotipo	185,70**	1,94	2,15**	271,86**	2,35**	0,66**
Dosis Salina	339,63**	1465,38**	2,54**	3121,29**	4,09**	0,10**
Interacción Dosis-genotipo	53,44**	78,29**	1,36**	181,66**	0,81**	0,06*
Error	2,15	6,06	0,17	20,68	0,12**	0,02
CV (%)	37,80	33,96	29,06	36,20	48,51**	51,12

**: Significativo al 1% ($p \leq 0,01$); *: Significativo al 5% ($p \leq 0,05$); CV: Coeficiente de variación

2.5.1.1. Biomasa de hoja

Esta variable presenta mayor relevancia por constituir el órgano de interés comercial de *stevia*. El efecto de la interacción indica que los genotipos no se comportan igual ante los diferentes tratamientos. Al descomponer la interacción, en la tabla 2.3, se puede apreciar que los genotipos C04 y C19 se comportaron diferentes en los niveles de salinidad del testigo y el nivel de 0,2 meq de Na/100 g suelo, el cual es precisamente el nivel de salinidad más bajo evaluado en este estudio. La siembra de ambos genotipos en suelos con niveles de 0,5; 1,2; 2,0 y 3,0 meq de NaCl, son afectados por igual en la producción de biomasa en la hoja, que, como se evidencia en la tabla referida, es prácticamente nula.

Tabla 2.3. Descomposición de la interacción dosis*genotipo para la biomasa de la hoja de dos clones experimentales de *stevia* sometidos a seis niveles de estrés por salinidad.

Dosis salina	C04	C19	Pr > F
0	10,63 a	17,28 a	<,0001
0,2	2,71 b	14,05 b	<,0001
0,5	0,79 c	1,97 c	0,1545
1,2	0,41 c	1,64 c	0,1504
2,0	0,36 c	1,71 c	0,081
3,0	0,24 c	1,10 c	0,2953

Dosis salina: meq Na/100g de suelo. Promedios con letras minúsculas similares en sentido vertical no difieren estadísticamente, según los contrastes ortogonales (F, $p \leq 0,05$).

Los resultados del presente estudio indican que la biomasa, localizada en la hoja de ambos genotipos, se afecta significativamente con niveles de 0,5 meq Na/100 g suelo en adelante. A niveles nulos o bajos de salinidad (0,2 meq Na/100g de suelo), en los clones C04 y C19, al parecer, hay una mayor cantidad de biomasa distribuida hacia la hoja, sin embargo, al analizar en detalle el comportamiento de ésta variable se pudo detectar que, para ambos genotipos la cantidad de biomasa ubicada en la hoja, también se ve afectada significativamente, al pasar de un suelo sin estrés por salinidad, a un suelo con 0,2 meq Na/100g; ésta reducción, es drásticamente mayor en el clon C04 al reducirse en un 74.5% esta biomasa foliar en tanto que para el clon C19 esta reducción solo fue del 18.6%, lo que podría sugerir que éste último recurso genético tendría una mayor habilidad que C04, para enviar fotoasimilados a la hoja ante niveles leves de salinidad en el suelo (Figura 2.5).

De manera consistente con lo observado al nivel de 0,2 meq Na/100g, al observar el comportamiento de los clones bajo condiciones de un suelo sin estrés salino, se pudo detectar que existen diferencias significativas en favor de C19, lo que sugeriría que éste genotipo tiene una mejor condición genética para enviar fotoasimilados al órgano de interés comercial, tal como se afirmó anteriormente. Es probable, que bajo condiciones de moderada a alta salinidad, los niveles de estrés se reflejen en la biomasa enviada a la hoja para ambos genotipos, debido a que se llegaría a la fase iónica de respuesta de las plantas a estrés por salinidad tal como lo propone Munns y Tester, (2008).

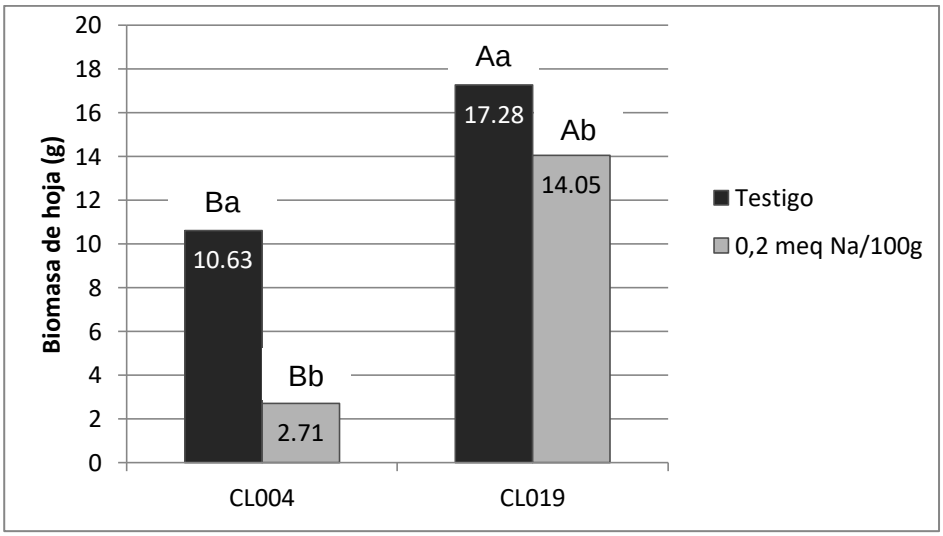

Figura 2.5. Biomasa de la hoja de dos clones de *stevia* sometidos a condiciones de salinidad. Letras similares no difieren estadísticamente, según los contrastes ortogonales (F, p≤0,05). Las diferencias significativas entre los genotipos a de un mismo nivel de salinidad se representan en letras mayúsculas, mientras que las diferencias observadas dentro de cada genotipo se indican en minúsculas.

La salinidad produce varias consecuencias negativas para las plantas, incluida la reducción del crecimiento de las mismas. Algunos estudios informaron que el efecto del estrés por salinidad fue significativo en el peso seco y fresco de las hojas, el área foliar y el número de hojas en diferentes especies de plantas (Ahmad y col., 2012; Sabra y col., 2012). Resultados similares encontró Shahverdi y col (2018), quienes indicaron que la planta de *stevia* puede responder adaptativamente a un nivel moderado de estrés por NaCl (30 mM) al disminuir el rendimiento de la hoja, al tiempo que aumenta el contenido de glucósidos de esteviol. De manera contraria, Cantabella y col (2017), no hallaron efectos significativos de la salinidad en el crecimiento de las plantas de *Stevia* sometidas a condiciones de estrés salino durante 25 días, a una concentración de 5 g/L de NaCl, lo que puede ser explicado por un aumento significativo del contenido de agua en las hojas como una respuesta adaptativa.

2.5.1.2. Biomasa de tallo

La producción de biomasa en el tallo de los dos clones de *stevia* (CL004 y CL019), fue influenciada (*p*≤0,01) por el efecto de interacción de la dosis salina y el genotipo (Tabla

2.4). Los resultados de ésta investigación muestran que la biomasa distribuida en el tallo de los clones estudiados, se afecta significativamente con niveles de 0,5 meq Na/100g en adelante.

Tabla 2.4. Descomposición de la interacción dosis*genotipo para la biomasa del tallo de dos clones experimentales de *stevia* sometidos a seis niveles de estrés por salinidad.

Dosis salina	C04	C19	Pr > F
0	30,03 a	23,03 a	<,0001
0,2	12,72 b	22,57 a	<,0001
0,5	0,58 c	2,05 b	0,1545
1,2	0,79 c	1,16 b	0,1504
2,0	0,90 c	1,22 b	0,081
3,0	0,71 c	1,65 b	0,2953

Dosis salina: meq Na/100g de suelo. Promedios con letras minúsculas similares en sentido vertical no difieren estadísticamente, según los contrastes ortogonales (F, $p \leq 0,05$).

En ausencia de sales (Testigo) o bajos niveles de salinidad (0,2 meq Na/100g), los clones logran acumular mayor producción de biomasa en el tallo, no obstante, al analizar en detalle el comportamiento de ésta variable, se pudo detectar que, el clon C04, también es afectado significativamente al pasar de un suelo sin estrés por salinidad, a un suelo con 0,2 meq Na/100g, al reducirse en un 42% la biomasa de tallo como se muestra en la Figura 2.6.

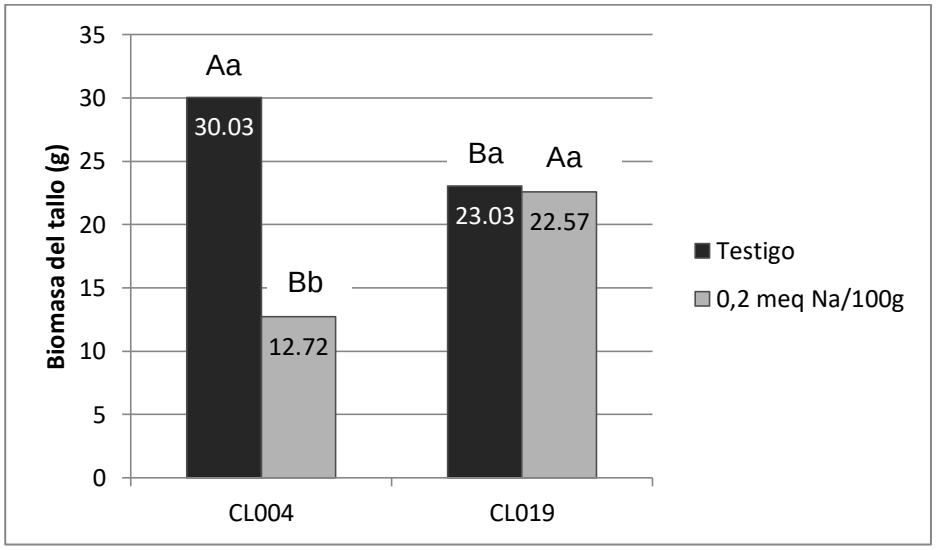

Figura 2.6. Biomasa del tallo de dos clones de *stevia* sometidos a condiciones de salinidad. Letras similares no difieren estadísticamente, según los contrastes ortogonales (F, $p \leq 0,05$). Las diferencias significativas entre los genotipos a de un mismo nivel de salinidad, se representan en letras mayúsculas, mientras que las diferencias observadas dentro de cada genotipo se indican en minúsculas.

La drástica reducción de la biomasa del tallo consecuente con el aumento de la dosis salina (0,5 meq Na/100g en adelante), afectaron en un 98% al clon C04 y en un 91% al clon CL019 respecto al testigo. Reis y col, (2015), documentaron que la *stevia* disminuye sus rendimientos en 7,1% por cada dSm^{-1}, observando que el crecimiento y rendimiento de hojas y tallos se redujo cuando la conductividad eléctrica del agua de riego fue superior a 2 dSm^{-1} hasta la primera cosecha. Estos autores, indicaron que la respuesta a la salinidad está dividida en dos etapas: etapa 1: de reducción lenta del rendimiento, seguida de la etapa 2: reducción pronunciada. Los resultados de este estudio demuestran éste comportamiento en ambos genotipos, el cual puede ser explicado por el efecto del estrés osmótico que tiene un efecto inmediato sobre el crecimiento y además tiene un mayor efecto sobre las tasas de crecimiento que el estrés iónico (Munns, 2008).

La condición del clon C19 de mantener la biomasa constante cuando está bajo condiciones de leves cantidades de sal en el suelo, puede deberse a una condición genética que le confiere mayor tolerancia al estrés salino que el clon C04. Los resultados de este trabajo, podrían sustentarse en el sentido que dentro de muchas especies, existe una variación genética documentada en la tasa de acumulación de Na^+ y Cl^- en la planta, así como en el grado en que estos iones pueden ser tolerados (Munns, 2008).

2.5.1.3. Biomasa de raíz

En la tabla 2.5, se descompone el efecto de la interacción entre las dosis y los genotipos, evidenciando que la producción de biomasa localizada en la raíz no se afecta significativamente cuando los clones C04 y C19 no están sometidos a condiciones de estrés salino (testigo), o cuando están bajo niveles leves de salinidad (0,2meq Na/100g).

A medida que se aumentan los contenidos de NaCl en los tratamientos 0,5; 1,2 y 2,0 meq Na/100g, los clones presentan un comportamiento diferencial. Existe una tendencia de

ambos genotipos a incrementar la distribución de biomasa hacia la raíz a medida que se aumentan las dosis de salinidad, siendo ésta mayor en el clon C19 llegando a ser 1,4 veces mayor comparado con el tratamiento testigo, mientras que para el clon C04 es 1,2 veces mayor (Figura 2.7).

Tabla 2.5. Descomposición de la interacción dosis*genotipo para la biomasa de la raíz de dos clones experimentales de *stevia* sometidos a seis niveles de estrés por salinidad.

Dosis salina	C04	C19	Pr > F
0	1,39 b	1,40 c	0,9655
0,2	0,53 d	0,68 d	0,5408
0,5	0,85 cd	1,65 bc	0,0011
1,2	0,96 c	2,27 a	<,0001
2,0	2,00 a	1,46 c	0,0154
3,0	1,79 a	2,08 ab	0,2118

Dosis salina: meq Na/100g de suelo. Promedios con letras minúsculas similares en sentido vertical no difieren estadísticamente, según los contrastes ortogonales (F, $p \leq 0,05$).

Al parecer, el genotipo C19 presenta una reacción temprana ante la presencia del estrés salino, es decir, a dosis moderadas de NaCl (0,5 meq Na/100g) induce a una mayor respuesta de producción de biomasa en la raíz, comparado con el clon C04 que evidencia mayor respuesta a dosis de 2,0 meq Na/100g.

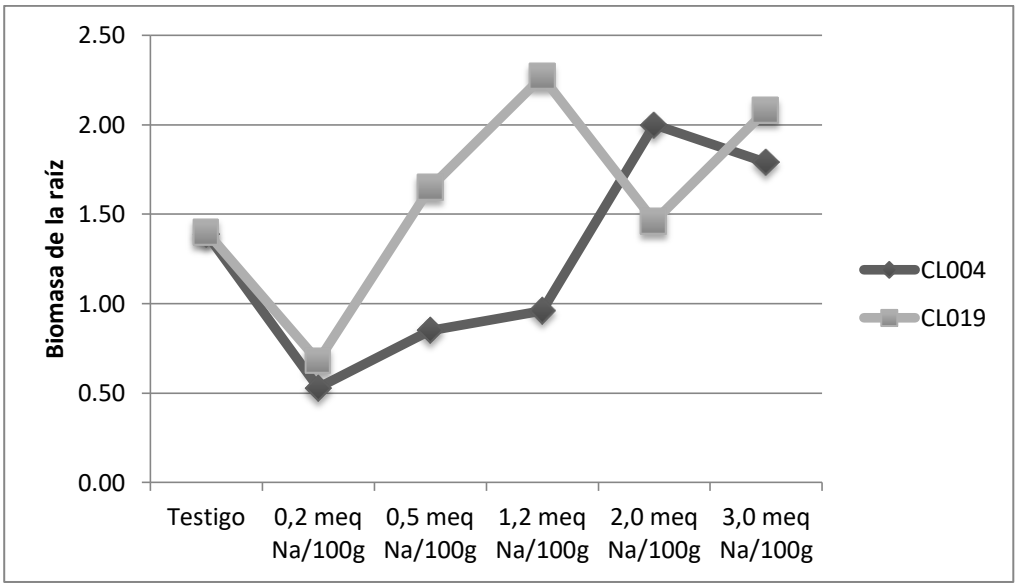

Figura 2.7. Biomasa de la raíz de dos clones de *stevia* sometidos a seis condiciones de salinidad.

El crecimiento de la raíz generalmente se ve menos afectado que el crecimiento de la hoja, y la tasa de alargamiento de la raíz se recupera notablemente bien después de la exposición al NaCl u otro tipo de estrés osmótico (Munns R, 2002). Por su parte, Taiz y Zeiger (2006), aseguran que el estrés osmótico mejora la extensión de la raíz hacia un suelo más profundo ya que este órgano estaría en busca de humedad. La disminución en el crecimiento de las hojas al aumentar los niveles de sales, genera una redistribución de fotoasimilados al sistema radicular, donde se puede apoyar un mayor crecimiento de la raíz en el perfil del suelo. Consecuentemente, el mayor crecimiento de la raíz en condiciones de mayor salinidad, podría considerarse una línea de defensa ante el estrés osmótico.

2.5.1.4. Biomasa total

La producción de biomasa total fue influenciada ($p \leq 0,01$) por el efecto de la interacción de la dosis salina y el genotipo. Al descomponer la interacción, en la tabla 2.6, se puede apreciar que la biomasa total tiene un comportamiento similar en los dos genotipos; sin embargo, esta condición no se cumple a niveles de 0,2 meq Na/100g, dosis a la cual se presentó un comportamiento diferencial.

Tabla 2.6. Descomposición de la interacción dosis*genotipo para la biomasa total de los genotipos C04 y C19 sometidos a seis niveles de salinidad.

Dosis salina	C04	C19	Pr > F
0	42,04 a	41,71 a	0,9046
0,2	15,97 b	37,30 a	<,0001
0,5	2,22 c	5,66 b	0,1789
1,2	2,16 c	5,07 b	0,2719
2,0	3,27 c	4,39 b	0,6341
3,0	2,74 c	4,83 b	0,4108

Dosis salina: meq Na/100g de suelo. Promedios con letras minúsculas similares en sentido vertical no difieren estadísticamente, según los contrastes ortogonales (F, $p \leq 0,05$).

A niveles de 0,2 meq Na/100g, se disminuye la producción de biomasa total en el clon C04 en un 37,9% respecto al testigo, mientras que el clon C19 se mantiene constante dicha variable con respecto al testigo; sin embargo, es importante resaltar que, dosis iguales o superiores a 0,5 meq Na/100g, afectaron negativamente a ambos genotipos por igual. El clon 4 tuvo una disminución del 94.8%, mientras que el CL019 del 86,44%

En la Figura 2.8, se detalla el comportamiento de la distribución de biomasa en ambos genotipos, evidenciando que el clon C04 tiene un porcentaje de distribución de biomasa mayor en el tallo, mientras que el clon C19 da preferencia a la hoja, en condiciones sin estrés salino. En condiciones de salinidad igual o superiores a 0,5 meq Na/100g ambos genotipos aumentan la proporción de distribución de biomasa hacia la raíz, observando mayor porcentaje en el clon C04.

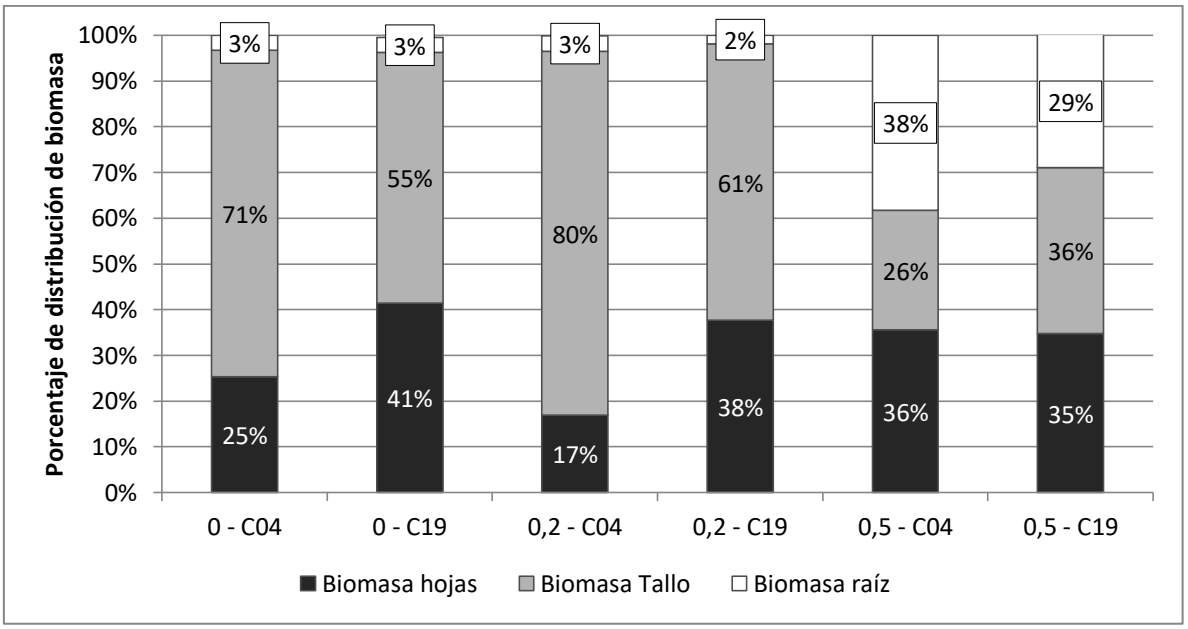

Figura 2.8. Porcentajes de distribución de biomasa de dos clones de *Stevia rebaudiana* Bert., bajo seis niveles de estrés por salinidad.

Los resultados del presente estudio son similares a los encontrados por Hussin y col (2017), quienes reportaron que el peso fresco total de plantas de *stevia* se vio afectado de manera diferencial en respuesta al aumento de las concentraciones de NaCl, encontrando que la salinidad baja (25 molm^3 NaCl) no tuvo efectos en la biomasa total, mientras que la salinidad moderada (50 molm^3 NaCl) y alta (100 molm^3 NaCl) del agua, disminuyó sustancialmente el peso fresco en aproximadamente un 40% y 67%, respectivamente, con respecto al tratamiento control sin salinidad.

Dong y Sun (2015) informaron que las bajas concentraciones de NaCl (hasta 44 mol m^{-3}) promovieron el crecimiento de las plántulas de stevia, mientras que la mayor salinidad del agua (140 mol m^{-3}) suprimió significativamente su crecimiento. En un estudio previo, Zeng y col. (2013) no encontraron ningún efecto significativo del aumento de la salinidad del agua (hasta 90 mol m^{-3} de NaCl) sobre el peso seco de *Stevia*. Las diferencias en la sensibilidad de los cultivares de *stevia* utilizados en estos estudios y las condiciones ambientales específicas en las que se llevaron a cabo podrían, al menos en parte, explicar las variaciones observadas en la respuesta de las plantas al estrés salino (Sheng y col., 2010).

2.5.1.5. Relación raíz – dosel (RRD)

La relación raíz dosel (RRD) muestra un comportamiento consecuente con la producción de biomasa en la raíz. Ésta variable fue influenciada ($p \leq 0,01$) por el efecto de la interacción de la dosis salina y el genotipo, tal como se indica en el análisis de varianza (Tabla 2.2). Al descomponer la interacción, se observa un comportamiento diferencial de los genotipos con un efecto altamente significativo en las dosis más altas de NaCl (2,0 y 3,0 meq Na/100g), tal como como se lo registra la tabla 2.7.

El clon C04 presentó una respuesta más eficiente en la RRD comparada con el clon C19 en las dosis de 2,0 y 3,0 meq Na/100g, lo que evidencia una mayor cantidad de biomasa distribuida hacia la raíz, lo que también podría ser explicado por una deficiente translocación de fotoasimilados y/o producción de biomasa hacia el dosel.

Tabla 2.7. Descomposición de la interacción dosis*genotipo para la relación raíz-dosel de los genotipos de *stevia* C04 y C19 sometidos a seis niveles de salinidad.

Dosis salina	C04	C19	Pr > F
0	0,04 c	0,04 b	0,9887
0,2	0,03 c	0,02 b	0,95
0,5	0,63 b	0,53 a	0,5762
1,2	0,84 b	0,84 a	0,9869
2,0	1,62 a	0,73 a	<,0001
3,0	1,93 a	0,83 a	<,0001

Dosis salina: meq Na/100g de suelo. Promedios con letras minúsculas similares en sentido vertical no difieren estadísticamente, según los contrastes ortogonales (F, $p \leq 0,05$).

Según Taíz y Zeiger (2006), la RRD parece estar gobernada por un equilibrio funcional entre la absorción de agua por la raíz y la fotosíntesis del dosel, es decir, el dosel crecerá tanto como lo permita la cantidad de agua incorporada por las raíces; de forma inversa, las raíces crecerán tanto como la demanda de fotoasimilados producida en el dosel iguale el aporte hídrico. Basados en ésta teoría, los resultados de la presente investigación permiten deducir que la producción de fotoasimilados de ambos clones es translocada

hacia la raíz en una proporción mayor en relación al dosel en respuesta al incremento del estrés.

2.5.1.6. Índice de Cosecha (IC)

El IC mostró efectos significativos para la interacción dosis*genotipo, lo que indica un comportamiento diferencial de esta variable en los genotipos, ante la aplicación de los tratamientos de salinidad. Al descomponer la interacción, en la tabla 2.8, se puede apreciar que los dos genotipos se comportaron diferencialmente en los niveles de 0,2 y 2,0 meq de Nacl/100g suelo.

Los resultados del presente estudio indican que el IC de los genotipos, se comporta diferencialmente ($p \leq 0,05$), cuando están sometidos a un estrés por salinidad de 0,2 meq Na/100g y que esta diferencia es altamente significativa ($p \leq 0,01$), cuando el nivel de estrés es de 2,0 meq Na/100g. Ambos genotipos muestran una tendencia a la disminución en el IC a medida que aumentan los niveles de salinidad, lo que sugiere un menor envío de asimilados a las hojas o un aumento de biomasa en el resto de órganos.

El genotipo C04 tiene mayor IC en la dosis de NaCl igual a 0,5 meq Na/100g, por su parte el genotipo C019 presenta altos valores en las dosis menores o igual a 2,0 meq Na/100g. Consistentemente con los resultados hallados en la biomasa de la hoja, el genotipo C019, presentaría una mayor capacidad de mantener un mayor IC bajo estrés salino, y solo se vería afectado negativamente, cuando está sometido a dosis más alta de sal en el suelo. Por su parte la proporción de biomasa enviada al órgano de interés comercial del C04, sería más sensible a niveles bajos de salinidad o presentaría una respuesta de sensibilidad más temprana ante niveles leves de estrés salino.

Tabla 2.8. Descomposición de la interacción dosis*genotipo para el Índice de Cosecha de los genotipos C04 y C19 sometidos a seis niveles de salinidad.

Dosis salina	C04	C19	Pr > F
0	0,25 b	0,42 ab	0.0833
0,2	0,17 bc	0,38 ab	0.0277
0,5	0,43 a	0,46 ab	0.7853
1,2	0,20 bc	0,34 ab	0.1344
2,0	0,13 c	0,54 a	<.0001
3,0	0,12 c	0,25 b	0.1441

Dosis salina: meq Na/100g de suelo. Promedios con letras minúsculas similares en sentido vertical no difieren estadísticamente, según los contrastes ortogonales (F, $p \leq 0,05$).

A pesar del efecto negativo que los altos niveles de salinidad puedan tener sobre el crecimiento de las plantas, es importante mencionar la capacidad de las plantas de *stevia* para desarrollar nuevas hojas y brotes. Hussin y col, (2017), reportaron la producción de hojas en plantas de *stevia* sometidas a niveles de 100 mol.m^3 de NaCl, aunque con algunos signos de toxicidad por Na^+ y / o Cl^- en sus hojas. A este nivel de salinidad, las hojas juveniles se expandieron casi por completo y se caracterizaron por una apariencia de color verde amarillento, mientras que las adultas mostraron necrosis marrón en los márgenes de las hojas, comenzando con la quema de la punta, que se expandió hacia el centro de la hoja con el envejecimiento.

2.6. CONCLUSIONES

La tendencia general de la relación entre el crecimiento y el estrés salino de los dos genotipos de *stevia* estudiados en la presente investigación, corresponde a los resultados publicados en otros artículos científicos; cuanto mayor es el nivel de salinidad, menor es el crecimiento del cultivo. La biomasa localizada en la hoja de ambos genotipos, se afecta significativamente con niveles de 0,5 meq Na/100 g suelo en adelante, sin embargo, a niveles de 0,2 meq Na/100g, ésta reducción es drásticamente mayor en el clon C04 al reducirse en un 74.5%, en tanto que para el clon C19 esta reducción solo fue del 18.6%, lo que sugeriría que éste genotipo tiene una mejor condición genética para enviar fotoasimilados al órgano de interés comercial.

Las variables de biomasa total y biomasa en el tallo presentaron un comportamiento similar en ambos clones. Aunque se pudo determinar que el clon C04 presenta mayor acumulación de biomasa en el tallo en condiciones normales, es drásticamente afectado al aumentar la salinidad en el suelo desde 0,5 meq Na/100g, disminuyendo el 98% de su biomasa con respecto al testigo; por su parte, el CL019 disminuyó un 91% . Estos resultados indican la sensibilidad de ambos genotipos para alocar biomasa en este órgano, o la poca tolerancia al estrés salino. La biomasa total por tanto, sería una

consecuencia de la manera diferencial que ubican los fotoasimilados os genotipos, ante las diversas condiciones de estrés por salinidad.

Existe una tendencia de ambos genotipos a incrementar la distribución de biomasa hacia la raíz a medida que se aumentan las dosis de salinidad, siendo ésta proporción, mayor en el clon C019, llegando a ser hasta 1,4 veces mayor, comparado con el tratamiento testigo. En el clon C04 esta proporción es 1,2 veces mayor. La relación raíz dosel (RRD) muestra un comportamiento consecuente con la producción de biomasa en la raíz. El clon C04 presentó una respuesta más eficiente en la RRD comparada con el clon CL019 en las dosis de 2,0 y 3,0 meq Na/100g, lo que evidencia la mayor cantidad de biomasa de este genotipo distribuida hacia la raíz a medida que aumenta la salinidad. Estos resultados podrían considerarse una respuesta fisiológica de defensa ante el estrés osmótico.

Por último, los resultados del presente estudio indican que la ubicación de biomasa en el órgano de interés comercial respecto a la biomasa total de la planta (IC), se afecta significativamente en ambos genotipos, mostrando una tendencia hacia la disminución en el IC, a medida que aumentan los niveles de salinidad.

2.7 LITERATURA CITADA

Abbas Momtazi-Borojeni, A., S.-A. Esmaeili, E. Abdollahi and A. J. C. p. d. Sahebkar (2017). "A review on the pharmacology and toxicology of steviol glycosides extracted from Stevia rebaudiana." 23(11): 1616-1622.

Aghighi Shahverdi, M., H. Omidi and S. J. Tabatabaei (2019). "Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) responses to NaCl stress: Growth, photosynthetic pigments, diterpene glycosides and ion content in root and shoot." Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences 18(4): 355-360.

Arbona, V., M. Manzi, C. D. Ollas and A. Gómez-Cadenas (2013). "Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants." 14(3): 4885-4911.

Assaei, R., P. Mokarram, S. Dastghaib, S. Darbandi, M. Darbandi, F. Zal, M. Akmali and G. H. R. J. A. j. o. m. b. Omrani (2016). "Hypoglycemic effect of aquatic extract of Stevia in pancreas of diabetic rats: PPARγ-dependent regulation or antioxidant potential." 8(2): 65.

Barrera, J., D. Suárez and L. M. J. E. e. f. v. M. Melgarejo, LM Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Vegetal. Departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia (2010). "II. Análisis de crecimiento en plantas." 25-39.

Bhasker, S., H. Madhav and M. J. P. Chinnamma (2015). "Molecular evidence of insulinomimetic property exhibited by steviol and stevioside in diabetes induced L6 and 3T3L1 cells." 22(11): 1037-1044.

Cantabella, D., A. Piqueras, J. R. Acosta-Motos, A. Bernal-Vicente, J. A. Hernández, P. J. P. P. Díaz-Vivancos and Biochemistry (2017). "Salt-tolerance mechanisms induced in Stevia rebaudiana Bertoni: Effects on mineral nutrition, antioxidative metabolism and steviol glycoside content." 115: 484-496.

Carrero Fernández, A. L. and K. A. Suárez Molina (2019). "Comercialización de Stevia".

CEDRSSA. (2018). Oportunidades para la agricultura en México: La Estevia. Ciudad De México Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria: 28.

Chaves, M. Flexas and C. Pinheiro (2009). "Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell." 103(4): 551-560.

Davison, P., C. Hunter and P. J. N. Horton (2002). "Overexpression of β-carotene hydroxylase enhances stress tolerance in Arabidopsis." 418(6894): 203-206.

Jarma, A., E. M. Combatt and J. A. J. A. C. Cleves (2010). "Aspectos nutricionales y metabolismo de Stevia rebaudiana (Bertoni). Una revisión." 38(2): 199-208.

Debnath, M., N. Ashwath and D. J. Midmore (2019). "Physiological and morphological responses to abiotic stresses in two cultivars of Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni." South African Journal of Botany 123: 124-132.

Debnath, M. J. J. o. m. p. r. (2008). "Clonal propagation and antimicrobial activity of an endemic medicinal plant Stevia rebaudiana." 2(2): 45-51.

Flores, E. V. and O. H. J. A. B. M. Espinosa (2018). "El género Stevia (Eupatorieae, Asteraceae) en el estado de Morelos, México." (125): 7-36.

Ghaheri, M., S. Miraghaee, A. Babaei, B. Mohammadi, D. Kahrizi, Z. S. Haghighi and G. J. C. M. B. Bahrami (2018). "Effect of Stevia rebaudiana Bertoni extract on sexual dysfunction in Streptozotocin-induced diabetic male rats." 64: 6-10.

Goudriaan, J. and H. Van Laar (1995). Modeling Potential Growth Processes. Textbook with exercises, Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.

Hajar, E. W. I., A. Z. B. Sulaiman and A. M. M. Sakinah (2014). "Assessment of Heavy Metals Tolerance in Leaves, Stems and Flowers of Stevia Rebaudiana Plant." Procedia Environmental Sciences 20: 386-393.

Hernández, J. L., E. M. Combatt, A. Jarma O, J. Polo S and L. Rodríguez P (2016). "Rendimiento y calidad de hojas de Stevia rebaudiana Bert. bajo la oferta edafológica y dos niveles de radiación en cinco regiones de colombia." Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica 19: 77-85.

Jarma, A., T. Rengifo and H. J. A. C. Araméndiz-Tatis (2005). "Aspectos fisiológicos de estevia (Stevia rebaudiana Bertoni) en el Caribe colombiano: I. Efecto de la radiación incidente sobre el área foliar y la distribución de biomasa." 23(2): 207-216.

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

Jarma, O. A. d. J. (2010). "Adaptación de dos clones de Estevia (Stevia rebaudiana bert.) en tres ambientes del Caribe colombiano/Adaptation of two clones of Stevia (Stevia rebaudiana bert.) in three Colombian Caribbean environments."

Jarma Orozco, A., C. Cardona Ayala, C. J. R. U. A. Fernández Herrera and D. Científica (2012). "Temperature and radiation effect on steviol glycosides production in Stevia rebaudiana in the Colombian humid Caribbean region." 15(2): 339-347.

Jarma Orozco, A., C. Cardona Ayala, C. J. R. U. A. Fernández Herrera and D. Científica (2012). "Temperature and radiation effect on steviol glycosides production in Stevia rebaudiana in the Colombian humid Caribbean region." 15(2): 339-347.

Jarma-Orozco, A., E. Combatt-Caballero and J. Jaraba-Navas (2020). "Growth and development of Stevia rebaudiana Bert., in high and low levels of radiation." Current Plant Biology: 100144.

Jarma-Orozco, A., E. Combatt-Caballero and J. J. C. P. B. Jaraba-Navas (2020). "Growth and development of Stevia rebaudiana Bert., in high and low levels of radiation." 100144.

Kim, N.-C. and A. D. Kinghorn (2002). "Highly sweet compounds of plant origin." 25(6): 725-746.

Kurek, J. M. and Z. Krejpcio (2019). "The functional and health-promoting properties of Stevia rebaudiana Bertoni and its glycosides with special focus on the antidiabetic potential – A review." Journal of Functional Foods 61: 103465.

Lemus-Mondaca, R. (2012). "Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects." Food chemistry v. 132(no. 3): pp. 1121-1132-2012 v.1132 no.1123.

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

López, V., S. Pérez, A. Vinuesa, C. Zorzetto, O. J. F. Abian and function (2016). "Stevia rebaudiana ethanolic extract exerts better antioxidant properties and antiproliferative effects in tumour cells than its diterpene glycoside stevioside." 7(4): 2107-2113.

Mohr, H. and P. Schopfer (1995). Biosynthetic metabolism. Plant Physiology, Springer: 275-284.

Muchate, N. S., G. C. Nikalje, N. S. Rajurkar, P. Suprasanna and T. D. J. T. B. R. Nikam (2016). "Plant salt stress: adaptive responses, tolerance mechanism and bioengineering for salt tolerance." 82(4): 371-406.

Munns, R. and Tester (2008). "Mechanisms of salinity tolerance." 59: 651-681.

Munns, R. J. N. p. (2005). "Genes and salt tolerance: bringing them together." 167(3): 645-663.

Murphy, P. e. Lugo and systematics (1986). "Ecology of tropical dry forest." 17(1): 67-88.

Narváez, M., C. Combatt, I. J. R. U. A. Bustamante Barrera and D. Científica (2014). "Spatial Distribution Of The Soil Salinity In The Area Of Influence Of The Sinú River Mouth (Cordoba-Colombia)." 17(2): 433-443.

Nouri, M.-Z., A. Moumeni and S. J. I. j. o. m. s. Komatsu (2015). "Abiotic stresses: insight into gene regulation and protein expression in photosynthetic pathways of plants." 16(9): 20392-20416.

Orozco, J. and A. J. F. d. A. de Jesús "Adaptación de dos clones de Estevia (Stevia rebaudiana bert.) en tres ambientes del Caribe colombiano/Adaptation of two clones of Stevia (Stevia rebaudiana bert.) in three Colombian Caribbean environments."

Palencia Severiche, G., T. Mercado Fernández and E. Combatt Caballero (2006). Estudio agroclimático del departamento de Córdoba, Universidad de Córdoba (Colombia), Facultad Ciencias Agrarias.

Pandey, M. and S. J. o. G. Chikara, ISSN (2015). "Effect of salinity and drought stress on growth parameters, glycoside content and expression level of vital genes in steviol glycosides biosynthesis pathway of Stevia rebaudiana (Bertoni)." 0975-2862.

Parida, A. K., A. B. J. E. Das and e. safety (2005). "Salt tolerance and salinity effects on plants: a review." 60(3): 324-349.

Reis, M., L. Coelho, G. Santos, U. Kienle and J. J. A. W. M. Beltrão (2015). "Yield response of stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) to the salinity of irrigation water." 152: 217-221.

Ritu, M., J. J. J. o. t. S. o. F. Nandini and Agriculture (2016). "Nutritional composition of Stevia rebaudiana, a sweet herb, and its hypoglycaemic and hypolipidaemic effect on patients with non-insulin dependent diabetes mellitus." 96(12): 4231-4234.

Rojas, E., V. Bermúdez, Y. Motlaghzadeh, J. Mathew, E. Fidilio, J. Faria, J. Rojas, M. C. de Bravo, J. Contreras and L. P. J. C. n. r. Mantilla (2018). "Stevia rebaudiana Bertoni and its effects in human disease: emphasizing its role in inflammation, atherosclerosis and metabolic syndrome." 7(3): 161-170.

Roy, S. J., S. Negrão and M. J. C. o. i. B. Tester (2014). "Salt resistant crop plants." 26: 115-124.

Ruiz-Ruiz, J. C., Y. B. Moguel-Ordoñez and M. R. Segura-Campos (2017). "Biological activity of Stevia rebaudiana Bertoni and their relationship to health." Critical Reviews in Food Science and Nutrition 57(12): 2680-2690.

Saibo, N. J., T. Lourenço and M. M. J. A. o. b. Oliveira (2009). "Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses." 103(4): 609-623.

Samuel, P., K. T. Ayoob, B. A. Magnuson, U. Wölwer-Rieck, P. B. Jeppesen, P. J. Rogers, I. Rowland and R. Mathews (2018). "Stevia Leaf to Stevia Sweetener: Exploring Its Science, Benefits, and Future Potential." The Journal of Nutrition 148(7): 1186S-1205S.

Sánchez, J. A. (2017). "Análisis Subsectorial del Cultivo de Stevia (1.1. 1)."

Šic Žlabur, J., S. Voća, N. Dobričević, D. Ježek, T. Bosiljkov and M. J. A. C. S. Brnčić (2013). "Stevia rebaudiana Bertoni-A review of nutritional and biochemical properties of natural sweetener." 78(1): 25-30.

Singh, S. and G. J. S. t. Rao (2005). "Stevia: The herbal sugar of 21 st century." 7(1): 17-24.

Taiz, L. and E. Zeiger (2006). Fisiologia vegetal, Universitat Jaume I.

3. CAPITULO III. INTERCAMBIO GASEOSO EN DOS GENOTIPOS DE *Stevia rebaudiana* Bert. BAJO CINCO CONCENTRACIONES DE SALES

3.1 RESUMEN

Se investigó el efecto de la salinidad en condiciones de invernadero en el suelo sobre los rasgos fotosintéticos de dos clones *Stevia rebaudiana* Bert (C04 y C19). *S*e ensayaron seis niveles de sales (NaCl) 0, 0.2, 0.5, 1.2, 2.0 y 3.0 meq Na/100g encontrando un comportamiento diferencial en la tasa de asimilación de CO_2, DPV, temperatura interna de la hoja y Ci/Ca, mientras que los valores de conductancia estomática y transpiración no reportaron efectos de las dosis de NaCl y/o los genotipos. El genotipo, C19 presentó niveles superiores de asimilación de CO_2 en un ambiente normal como en condiciones salinas levemente, atribuido a condiciones genéticas intrínsecas. Aparentemente, la salinidad no tiene un efecto determinante sobre las tasas de apertura y cierre estomático bajo las condiciones ambientales del presente estudio, lo que consecuentemente explica el comportamiento de las tasas de transpiración. Los valores superiores en el DPV sugieren menor apertura estomática del C19 lo que explica el comportamiento fotosintético superior. En este sentido, la temperatura interna de la hoja indica una tendencia del C19 a incrementar la temperatura interna de la hoja, a medida que aumenta el nivel de salinidad, mientras que C04 se mantiene constante. Por último, Los valores de Ci/Ca tienen una tendencia a disminuir con el aumento de la salinidad, lo que indica un cierre estomático por el uso del CO_2 reservado en los espacios intercelulares.

Palabras claves: Salinidad, tasa de asimilación de CO_2, transpiración, conductancia estomática, déficit de presión de vapor.

3.2 ABSTRACT

The effect of salinity under greenhouse conditions in the soil on the photosynthetic traits of two clones Stevia rebaudiana Bert (C04 and C19) was investigated. Six levels of salts (NaCl) 0, 0.2, 0.5, 1.2, 2.0 and 3.0 meq Na / 100g were tested finding a differential behavior in the assimilation rate of CO_2, DPV, internal temperature of the leaf and Ci / Ca, while stomatal conductance and transpiration values did not report effects of NaCl doses and / or genotypes. The genotype, C19 presented higher levels of CO_2 assimilation in a normal environment as in slightly saline conditions, attributed to intrinsic genetic

conditions. Apparently, salinity does not have a determining effect on stomatal opening and closing rates under the environmental conditions of the present study, which consequently explains the behavior of transpiration rates. The higher values in the DPV suggest a lower stomatal opening than C19, which explains the superior photosynthetic behavior. In this sense, the internal temperature of the leaf indicates a tendency of C19 to increase the internal temperature of the leaf, as the salinity level increases, while C04 remains constant. Finally, Ci / Ca values have a tendency to decrease with increasing salinity, which indicates a stomatal closure due to the use of reserved CO_2 in the intercellular spaces.

Key words: Salinity, CO_2 assimilation rate, transpiration, stomatal conductance, vapor pressure deficit.

3.3 INTRODUCCIÓN

La salinidad del suelo y la escasez de agua son dos limitaciones principales que restringen severamente la productividad agrícola, especialmente en las partes áridas y semiáridas del mundo, principalmente en países en desarrollo con una población densa (Singh, 2015). La fotosíntesis es la base de prácticamente toda la vida y es el proceso metabólico primario de cualquier ecosistema. Este proceso se inicia al momento en que las clorofilas captan la energía de la luz incidente en el aparato fotosintético, energía que es utilizada para lograr una excitación que puede abocar a una oxidación de los pigmentos fotosensibles (Jarma, Rengifo, y Aramendiz, 2006).

El bajo potencial hídrico en los suelos salinos interfiere con la capacidad de la planta para absorber agua, creando un déficit fisiológico de agua (Hussin y col., 2013). Esto induce un cierre rápido de los estomas para limitar tanto la transpiración como el transporte de sal a las hojas (Koyro y col., 2013). A su vez, esto implica que el intercambio de gases en la hoja se mantiene bajo debido a la disponibilidad restringida de CO2 para la reacción de carboxilación (limitación estomática de la fotosíntesis) (Flexas y col., 2009).

Aunque en Colombia no hay reportes del comportamiento de stevia bajo condiciones de estrés por salinidad, si se ha evaluado las respuestas de intercambio gaseoso de esta especie, a diferentes estreses abióticos.

En trabajos realizados con plantas de stevia en suelos inundados, la conductancia estomática, transpiración y fotosíntesis mostraron un efecto negativo en los tiempos de inundación, mostrando una relación inversa negativa. A medida que incrementaron los tiempos de inundación, se presenció una disminución en cada una de las variables y que al final esto tuvo el mayor efecto en la fotosíntesis (Jarma, Mercado-Fernández, y Romero, 2015).

En otro experimento, plantas de stevia sometida a diferentes niveles de radiación y cantidad de nitrógeno disponible, afectaron de forma negativa la capacidad fotosintética de las hojas. El exceso de nitrógeno en dos ambientes de luz solar (1500 y 300 µmol de fotones.m^{-2}.s^{-1}), afectó de forma negativa el comportamiento de la conductancia estomática, tasas de transpiración y tasa de asimilación de CO2 (Cordero, 2014).

Los cambios en la época de siembra y la población, la incidencia de los factores ambientales como radiación solar, precipitación, temperatura y condiciones del suelo, pueden afectar las expresiones fenotípicas y fisiológicas de las plantas, puesto que afectan los procesos de fotosíntesis, transpiración, alargamiento de células, crecimiento y competencia entre especies (Jarma, 2008; Montemayor, 2006 citados por Jarma 2010).

Aunque los aspectos bioquímicos, fisiológicos y agronómicos de Stevia han sido ampliamente investigados en condiciones ambientales óptimas (Ladygin y col., 2008), su respuesta a las limitaciones ambientales como la salinidad y / o la sequía rara vez se ha informado (Sheng y col., 2011).

Mirando hacia el futuro, la desalinización y recuperación de tierras degradadas mediante el uso sostenible de especies tolerantes a la sal y / o la sequía bajo alternativas como el riego salobre o salino ofrece una solución práctica para la utilización efectiva de estas áreas marginales (Hussin y col., 2013; Geissler y col., 2015). Además, permite el uso de agua salina en tales entornos, donde el agua dulce es limitada o no está disponible para riego, y el agua salina es la única opción para las prácticas de riego (Hussin, 2017).

Con base en lo anterior, en este capítulo se determinó el efecto que ocasionaban diferentes niveles de salinidad en el suelo sobre las principales variables de intercambio gaseoso en dos clones de *Stevia rebaudiana* Bert.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1. Localización y material experimental.

3.4.1.1. Localización

El estudio fue realizado en condiciones de invernadero de la granja experimental de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Córdoba (Montería-Colombia), localizada en las coordenadas 8° 52' de Latitud Norte y 760 58` de Longitud Oeste, respecto al meridiano de Greenwich. La temperatura media del aire es 28 0C, humedad relativa promedio del 83%, altura sobre el nivel del mar de 18 m.s.n.m, y precipitación anual de 1200 mm (Palencia y col., 2006). Esta localidad se encuentra en la zona de transición de Bosque Seco Tropical – Bosque Húmedo Tropical (Holdrige 1986).

3.4.1.2. Variables e indicadores

Se determinaron las siguientes variables:

3.4.1.2.1. Variables independientes.

- Niveles de sal (NaCl): (0; 0,2; 0,5; 1,2; 2,0 y 3,0 meq Na/100g
- Clones experimentales de stevia: C04 y C19

3.4.1.2.2. **Variables dependientes.**

Las variables dependientes que se evaluaron son las siguientes:

- Tasa de asimilación de CO_2 (µ mol CO_2 $m^{-2}s^{-1}$).
- Conductancia estomática (mmol H_2O $m^{-2}s^{-1}$).
- Transpiración (mmol H_2O $m^{-2}s^{-1}$)
- Diferencial de presión de Vapor (DPV) (mb)
- Temperatura de la hoja (°C)
- Relación de la concentración de CO^2 en el espacio subestomático (concentración interna de CO_2) y la concentración ambiental (Ci/Ca) (mol mol^{-1}).
- Pigmentos fotosintéticos (clorofila a, clorofila b, clorofila total y carotenoides)

Estas variables de intercambio gaseoso se determinaron a los 60 días después del trasplante. Se tomaron diez plantas por cada tratamiento; en cada planta se tomó una hoja sana y desarrollada que cumplía función fisiológica como órgano fuente, dispuesta

en el tercio superior de la misma. Las variables de pigmentos fotosintéticos fueron determinadas a través de un equipo espectrofotómetro en el laboratorio de suelos y aguas

3.4.1.3 Procedimiento

El ensayo comprendió cuatro fases de ejecución: 1). La fase de propagación de plantas (la cual tuvo una duración de 7 meses aproximadamente, desde julio de 2018 a enero de 2019), 2). La fase de invernadero (la cual tuvo una duración de 4 meses aproximadamente desde enero de hasta mayo de 2019). 3). La realización del análisis estadístico y 4). La interpretación de los datos.

3.4.1.3.1. Preparación de semillero

El sustrato utilizado para el semillero fue una mezcla de arena, materia orgánica y fibra de coco en una relación 1:1:1 y se desinfectó con Metalaxil + Mancozeb en una mezcla de 30 gramos del producto por cada 10 litros de agua.

Una vez desinfectado el sustrato de las bandejas de germinación, se propagaron esquejes de estevia de los clones C04 y C19 del programa de mejoramiento genético de la Universidad de Córdoba, luego se trasplantaron en macetas a los 120 días como se muestra en la figura 2.1.

3.4.1.3.2. Montaje del ensayo

Se realizó la incubación anaeróbica del suelo por 7 días bajo condiciones de invernadero. Se diluyó la solución de sal correspondiente a cada tratamiento en 4.5 litros de agua y se aplicaron en cada bolsa a capacidad de campo.

Se utilizaron 120 bolsas de polietileno negro con capacidad de 10 litros, que correspondieron al total de unidades experimentales, dos plantas de estevia por cada bolsa, 60 unidades para el genotipo C04 y las 60 restantes al genotipo C019.

El sustrato utilizado fue una mezcla suelo y arena tamizados en relación 3:1, previamente esterilizado por solarización. Las bolsas no presentaron orificios para drenaje con la finalidad de mantener la salinidad constante durante el experimento (Figura 2.2).

3.4.1.3.3. Preparación de soluciones salinas

La tabla 2.1, del capítulo I, muestra las dosis NaCl utilizadas como tratamientos de la presente investigación.

3.4.1.3.4. Obtención de esquejes

Los esquejes son secciones de las ramas juveniles de plantas madres adultas (establecidas en campos de la Universidad de Córdoba, Figura 2.3.), que presentaron las siguientes características:

1. Provinieron de plantas vigorosas y sanas

2. No presentaron flor o botón floral.

3. Tuvieron entre 8 y 10 cm de longitud y como mínimo 5 pares de hojas.

3.4.1.3.5. Trasplante

Este se realizó cuando las plántulas alcanzaron una altura de 15 cm, las cuales se ubicaron en las macetas plásticas con capacidad de 10 litros cada una, para garantizar el desarrollo radicular, luego se ubicaron en el invernadero de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Córdoba (Figura 2.4).

3.4.1.3.6. Toma de datos.

En invernadero se realizaron las lecturas de las variables Tasa de asimilación de CO_2 (µ mol CO_2 $m^{-2}s^{-1}$), Conductancia estomática (mmol H_2O $m^{-2}s^{-1}$), Transpiración (mmol H_2O $m^{-2}s^{-1}$), Diferencial de presión de Vapor (DPV) (mb), Temperatura de la hoja (°C) y Relación de la concentración de CO_2 en el espacio subestomático y el ambiente(mol mol^{-1}), con un medidor de gases al infrarrojo (IRGA, modelo Li-6400; Li-Cor, Lincoln, NE, USA).

Para la estimación de pigmentos, se empleó el método de espectrofotometría para lo cual se tomó 1 g de tejido foliar por cada especie de planta y a cada una se le adicionó 0,5 g aproximadamente de Cloruro de Calcio y 12 mL de DMS paulatinamente macerándolo constantemente hasta conseguir una pasta homogénea, que se procedió a filtral en el balón de destilación. Obtenido un volumen de 3ml aproximados, se realizó la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro a longitudes de onda de 470, 645, 663 y 710 nanómetros respectivamente, con previa calibración del equipo con un blanco (DMS).

3.4.1.3.7. Diseño Experimental

El ensayo se estableció mediante un DCA (diseño completamente al azar) con arreglo factorial 2 x 6, para un total de 12 tratamientos y 10 repeticiones por tratamiento, donde el factor A correspondió a los clones (C004 y C019) y el factor B correspondió a los seis niveles de salinidad (0; 0,2; 0,5; 1,2 2,0 y 3,0 meq Na/100g).

3.4.2. Análisis de la información

Los resultados se analizaron mediante el paquete Statistical Analysis System (SAS) de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Córdoba. Las pruebas de comparación de medias se utilizaron cuando se detectaron diferencias estadísticas en los factores individuales mediante la prueba Tukey y las interacciones fueron descompuestas a través de contrastes ortogonales con nivel de probabilidad del 5%.

3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.5.1. VARIABLES DE INTERCAMBIO GASEOSO DE *Stevia rebaudiana* Bert.

Los resultados consignados en la tabla 3.1 muestran los cuadrados medios y niveles de significancia para las variables de intercambio gaseoso analizadas en la presente investigación.

Tabla 3.1. Cuadrados medios y niveles de significancia para las variables de intercambio gaseoso: Tasa de asimilación de CO_2 (Pn), Conductancia estomática (Gs), Traspiración (E), Deficit de presión de vapor (DPV), Temperatura interna de la hoja (T° hoja) y relación de la concentración de CO^2 en el espacio subestomático y el ambiente (Ci/Ca), en dos genotipos de stevia en función de dos niveles de salinidad.

Fuente de variación	Pn	Gs	E	DPV	T° hoja	Ci/Ca
Genotipo (G)	36,34*	0,00001	0,10	1,69**	31,12**	0,69
Dosis sal (D)	22,97**	0,00458	2,27	0,36	5,25*	1,70
Interacción G x D	13,90	0,002713	1,16	0,62*	13,93**	2,75*
Error	6,60	0,00302	1,04	0,21	1,67	0,934
CV (%)	30,74	84,15	59,02	15,22	3,5	1436,4

Tal como se puede determinar en el ANOVA que registra la tabla 3.1., se presentaron interacciones del genotipo con la dosis de salinidad, para el DPV, Tº hoja y Ci/Ca. El

efecto de la sal sobre los dos genotipos afectó las tasas de Pn, g_s y E de manera independiente a cada factor.

3.5.1.1. Tasa de asimilación de CO_2 (Pn) y pigmentos fotosintéticos.

La tasa de asimilación de CO_2 (µmol $CO_2 m^{-2} s^{-1}$) fue influenciada significativamente de manera independiente por los efectos del genotipo y las dosis de NaCl aplicadas al suelo. En la figura 3.1 se puede apreciar el comportamiento de la tasa de asimilación de CO_2 de los genotipos C04 y C19, evidenciando, que C19 presentó niveles superiores de asimilación de CO_2 al compararlo con C04. Este comportamiento es consecuente con la mayor producción y envío de biomasa a la hoja del C19. El comportamiento diferencial del C19 puede atribuirse a condiciones genéticas intrínsecas a este genotipo, que le confieren la capacidad de mantener 1,2 veces mayores tasas de fotosíntesis que el C04, tanto en un ambiente normal como en condiciones salinas levemente estresantes de 1,2 meq de Na/100g. Las diferencias en la sensibilidad de los genotipos, podrían deberse a mecanismos de transducción de señales de estrés divergentes a nivel bioquímico y que conlleva a respuestas individuales específicas.

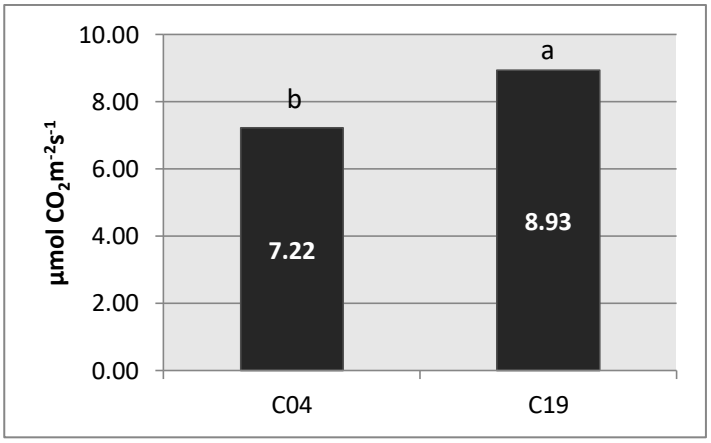

Figura 3.1. Efectos de los genotipos C04 y C19 sobre la tasa de asimilación de CO_2

Considerando el efecto de la salinidad sobre las tasas de fotosíntesis, de manera independiente al genotipo, se pudo determinar que el efecto de las dosis de NaCl tuvo un efecto altamente significativo sobre la tasa de asimilación de CO_2, mostrando una reducción del 27.3%, cuando la dosis de salinidad está por encima de 0,5 meq Na/100g comparado con suelos donde no existe estrés por salinidad (Figura 3.2). Estos resultados son similares a los encontrados por Hussin y col (2017), quienes informaron de una

disminución constante de hasta 47% en la tasa de fotosíntesis neta en plantas de stevia sometidas a condiciones de alta salinidad (100 mol m^3 de NaCl) en función de la radiación fotosintética activa (PAR). En contraste, en éste mismo estudio, la tasa de transporte de electrones fue mejorada progresivamente por la salinidad, alcanzando su máximo al nivel más alto de salinidad del agua (100 mol m^3 de NaCl).

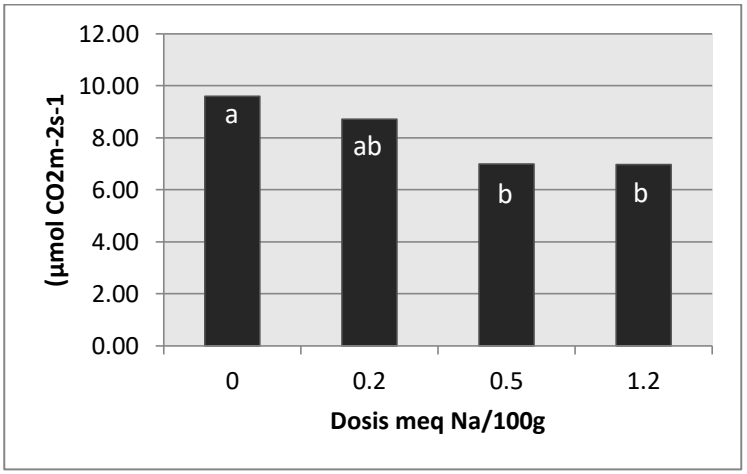

Figura 3.2. Efecto de las dosis salinas sobre la tasa de asimilación de CO_2 de *Stevia rebaudiana* Bert., sometida a cuatro niveles de salinidad.

La tendencia a la disminución de la tasa de asimilación de CO_2 como consecuencia del estrés salino, ha sido relacionada por Parihar y col (2015), como una respuesta inmediata de las plantas sujetas al déficit osmótico impuesto por la alta concentración salina, debido a que la presencia de sal en una solución del suelo disminuye el potencial osmótico del suelo (Parihar y col., 2015).

Da silva y col, (2018), hallaron que el estrés salino moderado a severo, redujo las tasas fotosintéticas de plantas de Jatropha curcas en 49% y 72% por la mañana. Los efectos adversos sobre la fisiología y el metabolismo de las plantas, debido a la exposición al NaCl, son causados, principalmente, por el efecto citotóxico de los iones Na + y Cl- en altas concentraciones y cambios en el equilibrio nutricional (Díaz-López y col. 2012b).

Otra explicación a este comportamiento puede confirmar el hecho que, la absorción excesiva de iones salinos por las plantas, puede provocar toxicidad iónica, que se

acumula en el protoplasma; además, las alteraciones del metabolismo celular afectan la fotofosforilación, la cadena respiratoria, la asimilación de nitrógeno y las tasas de metabolismo de las proteínas, tal como lo propone Munns, en 2002. En éste sentido, Corte-Real y col (2019), reportaron que la adición de NaCl en el sustrato, sobre plantas de Jatropha sometidas a 750 mM de NaCl, absorbieron grandes cantidades de iones de la solución en el suelo, principalmente de Cl^-, lo que posiblemente causó los síntomas visuales de toxicidad caracterizada por clorosis en las hojas más viejas, seguida de abscisión.

Las altas concentraciones de iones Cl^- en las hojas, pueden causar degradación de la clorofila, causando daños en los fotosistemas (Asada 1999; Pompelli y col. 2010c; Tavakkoli y col. 2011), lo que favorecería la caída de la tasa de fotosíntesis y daños en el aparato fotosintético.

El contenido de pigmentos fotosintéticos, no mostró efectos del genotipo, dosis salinas y/o la interacción de ambos, como se detalla en tabla 3.2. En general, existe una fuerte evidencia de que el estrés salino puede reducir la concentración de clorofila, hecho que se ha atribuido a la disminución de la capacidad de recuperación del aparato fotosintético o a la disminución de la síntesis de clorofila causada por la disminución del número de enzimas específicas involucradas en la síntesis de pigmentos (Sharma y Hall , 1991; Vajpayee y col., 2000; Meeta y col., 2013). A pesar de estos hallazgos, los resultados contrastantes de la presente investigación pueden deberse a dos factores, a saber, la exposición prolongada al estrés durante 90 días y la no significancia entre la dosis más baja y el nivel 0 de NaCl en los genotipos.

Tabla 3.2. Cuadrados medios para los pigmento fotosintéticos; Chl, Clorofila a; Chl b, clorofila b, Chl total; clorofila total y carotenos.

Fuente de variación	Chl a	Chl b	Chl Total	Carotenos
Genotipo	0.03	272.14	276.76	15.79
Dosis NaCl	6.38	11.34	34.65	0.61
Interacción Dosis*genotipo	0.03	244.83	249.40	15.07
Error	15.50	107.22	167.37	6.35
CV (%)	19.48	33.07	25.15	70.39

Da Silva y y col (2018), encontraron que la degradación de la clorofila bajo estrés salino puede indicar posibles daños al sistema fotosintético en las hojas de *J. curcas.* Por su parte, Campos y col. (2012), también mostraron una disminución del contenido total de clorofila en dicha especie cultivada en condiciones de salinidad, pero no se observó tal efecto en el contenido de carotenoides.

Los valores promedios detallados en la tabla 3.3 muestran un mayor contenido de clorofila b (60%) respecto a la clorofila a (40%), mientras que el contenido de carotenoides no superó el 7% de los contenidos totales de pigmentos fotosintéticos. Cantabella y otros (2017), encontraron que el estrés por NaCl a largo plazo no produce cambios en las concentraciones de clorofila en las hojas de stevia, lo que refleja un mecanismo para proteger el proceso de fotosíntesis. Curiosamente, se produjo un aumento en el contenido de clorofila b (Chlb) en las plantas más antiguas estudiadas, lo que coincide con los valores promedios registrados en la presente investigación.

Tabla 3.3 Valores promedios de pigmentos fotosintéticos de dos clones de stevia, sometidos a estrés salino.

Genotipo	Dosis	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila Total	Carotenoides
C04	0	20.62	36.88	57.42	2.23
	0,2	19.69	30.22	49.84	3.86
C19	0	20.61	26.27	46.82	4.82
	0,2	19.80	30.44	50.17	3.77

Se ha informado que Chlb pasa la luz absorbida a Chla para conducir la fotosíntesis. Además, los restos Chlb absorben luz en la región azul, mientras que Chla absorbe luz en la región roja. La luz roja juega un papel importante en el desarrollo de la maquinaria fotosintética, y la luz azul es importante para la formación de clorofila (Ouzounis y col., 2015). Los niveles de clorofila pueden verse como un marcador bioquímico de tolerancia a la sal en las plantas. El mantenimiento del contenido de Chl bajo estrés de NaCl, puede considerarse un mecanismo para proteger el proceso de fotosíntesis. Según estudios anteriores, las especies tolerantes a la sal, como *Myrtus communis* y *Eugenia myrtifolia* (Acosta-Motos y col., 2015a, b) muestran niveles aumentados o sin cambios de clorofilas totales en condiciones salinas. En términos de pigmentos fotosintéticos no se puede

concluir la tolerancia o sensibilidad de los genotipos C04 y C19 a condiciones estresantes de salinidad, debido a las condiciones especiales del experimento.

3.5.1.2 Conductancia estomática y transpiración

Las variables de conductancia estomática y transpiración, no mostraron efectos significativos con la variación de los niveles de NaCl (Tabla 3.3). La apertura estomática afecta directamente la transpiración en las plantas, lo que indica que a mayor cantidad de estomas abiertos, mayores serán los niveles de transpiración. Sin embargo, el efecto no significativo de los niveles de sales y de los genotipos, permite suponer que las tasas de conductancia estomática y de transpiración de los genotipos son similares. Aparentemente, la salinidad no tiene un efecto determinante sobre las tasas de apertura y cierre estomático bajo las condiciones ambientales del presente estudio, lo que consecuentemente explica el comportamiento de las tasas de transpiración.

Tabla 3.4. Valores promedios de la conductancia estomática (mmol H_2O $m^{-2}s^{-1}$) y transpiración (mmol H_2O $m^{-2}s^{-1}$).

	Conductancia estomática			**Transpiración**		
Dosis	**C04**	**C19**	**Pr > F**	**C04**	**C19**	**Pr > F**
0	0,07	0,08	0,8568	2,08	1,78	0,56
0,2	0,09	0,07	0,454	1,73	1,80	0,89
0,5	0,02	0,06	0,2631	0,82	1,57	0,19
1,2	0,08	0,04	0,4215	2,19	1,39	0,27

En la literatura se ha documentado ampliamente que la disminución de las tasas fotosintéticas, como efecto de los niveles elevados de NaCl, está muy relacionado con el cierre estomático. Corte-Real y y col (2019), reportaron que el cierre estomático reduce el flujo de CO_2 hacia el interior del espacio subestomático, lo que resulta en una disminución de la tasa fotosintética, la disminución de la disponibilidad y la fijación de CO_2 que compromete la segunda etapa de la fotosíntesis y el suministro de ADP y NADP+, utilizados en la fase fotoquímica.

En la presente investigación, no se hallaron efectos de la conductancia estomática y la transpiración, por lo tanto no podría explicar el comportamiento decreciente de la fotosíntesis. La limitación no estomática de la fijación de CO_2 parece ser una consecuencia del aumento del estrés oxidativo. Éste factor podría ser una razón importante para la limitación de la tolerancia a la sal y la supervivencia de esta especie en hábitats salinos; sin embargo, el arsenal de los metabolitos secundarios involucrados en el sistema antioxidante de las plantas, no fue considerado en el presente estudio y, podría significar por tanto, que sería un segundo paso en la investigación de salinidad en stevia.

Considerando entonces que las respuestas en conductancia estomática y transpiración no explicarían los resultados decrecientes de la fotosíntesis en este estudio en stevia, valdría la pena considerar que, en estudios con otras especies, se ha observado una reducción en las tasas fotosintéticas como consecuencia de la inhibición no estomática en condiciones de estrés (Farooq y col., 2009). Las limitaciones no estomáticas también pueden explicar las reducciones en la tasa fotosintética neta, particularmente en condiciones estresantes severas, como resultado de la reducción de la captura de luz (actividad del fotosistema II, PSII) y/o la disminución de la carboxilación de RuBP catalizada por Rubisco (Jia y Gray, 2004).

Las alteraciones en la capacidad fotosintética pueden ser el resultado de un cambio en el contenido de hojas de la maquinaria fotosintética, y/o la eficiencia con la que opera esta maquinaria (Lawlor y Tezara, 2009). En consecuencia, esto condujo a una reducción de la captación de CO_2, que se considera un mecanismo importante para reducir el flujo de excesivo de electrones de los fotosistemas y, por lo tanto, la generación de especies reactivas de oxígeno ROS en condiciones estresantes (Geissler y col., 2015; Hussin y col., 2017). De esta manera, se puede reducir la conducción de energía por los complejos de captación de luz y, por lo tanto, el flujo excesivo de electrones a través de los fotosistemas y la transferencia de electrones resultante a sumideros de electrones alternativos (fotorrespiración y reacción de Mehler, que generan ROS) (Kitao y col., 2015) . y Lei, 2007; Geissler y col., 2015). Una estrategia alternativa que tenga menos carga metabólica en las plantas estresadas sería evitar la producción de ROS a través de una tasa reducida de transporte de electrones fotosintéticos (Genty y col., 1989; Johnson, 2005; Duarte y col., 2014).

3.5.1.3. Déficit de presión de vapor (DPV) y temperatura interna de la hoja (T° hoja)

En el análisis de varianza (Tabla 3.1), el déficit de presión de vapor evidenció un efecto significativo en la interacción dosis*genotipo. Al descomponer la interacción, tal como se evidencia en la figura 3.3, se reveló que C04 presenta mayores valores de DPV que C19 cuando está bajo una condición de salinidad de 0,5 meq Na/100g; lo anterior indica que la concentración de agua en los espacios intercelulares de la hoja, es mayor que la humedad ambiental. Este resultado podría sugerir que C04 utiliza estrategias fisiológicas de defensa tal como el cierre estomático para evitar la pérdida excesiva de agua, lo que consecuentemente refleja mayor diferencia de humedad con el ambiente. Por otro lado, los valores reducidos del DPV en C19 sugerirían que este genotipo presenta mayor equilibrio relativo del agua del ambiente con el agua interna de la hoja, lo que sugeriría mayor apertura estomática al momento de la medición y probablemente mayores tasas de captura de CO_2 (fotosíntesis) (Figura 3.3).

En los niveles de salinidad 0,2; 0,5 y 1,2 meq Na/100g no existe una tendencia clara, lo que podría sugerir que las diferencias son básicamente genéticas y no son tan evidentes, a excepción del nivel 0,5 meq Na/100g, tal como se discutió anteriormente. Aunque la variable de área foliar específica no fue determinada en éste experimento, es posible que tenga un efecto sobre el DPV (Figura 3.3). Esta afirmación podría sustentarse en la apreciación visual de las hojas de C04, que presentan características de menor tamaño y mayor suculencia, lo que podría generar mayor humedad interna que el C19, cuyas hojas fueron más delgadas y expandidas (menor área foliar específica).

Estudios realizados en plantas de *Jatropha curcas* sometidas a condiciones de estrés por salinidad, han demostrado que la difusión de CO_2 en el espacio subestomático con altos valores de DPV, son permitidos gracias a la apertura parcial de los estomas (Tominaga y col. 2014). Por otro lado, se ha reportado el papel regulatorio del DPV sobre la disipación de energía térmica, el cual es críticamente importante en ambientes con estrés salino. Estos resultados podrían explicar el comportamiento de ésta variable en el genotipo C19, que mostró una clara tendencia al aumento a mayores niveles de salinidad.

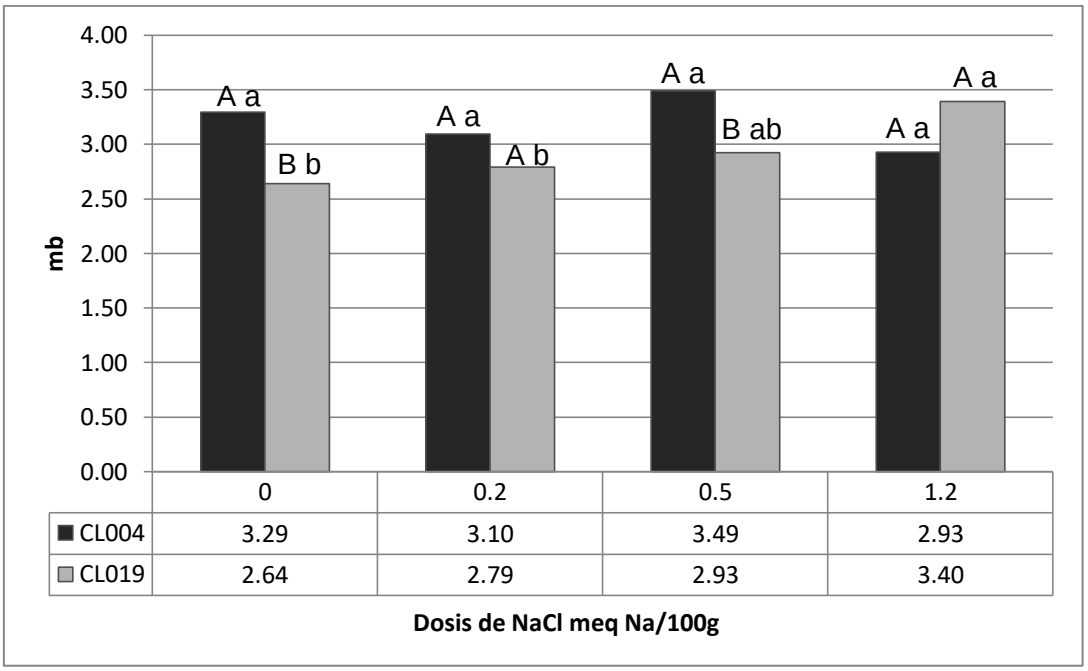

Figura 3.3. Déficit de presión de vapor de dos genotipos de Stevia en condiciones de estrés salino. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre líneas, letras minúsculas indican diferencias dentro de cada genotipo.

La temperatura interna de la hoja, mostró efectos altamente significativos en la interacción dosis*genotipo (Tabla 3.1). Al descomponer la interacción, se pudo determinar que el C04 presentó mayor temperatura interna de hoja que el C19 en la dosis 0 y 0,5 meq Na/100g. Estos resultados son consecuentes con el déficit de presión de vapor registrado en los mismos niveles para ambos genotipos, tal como se discutió en el ítem anterior. La mayor concentración de vapor de agua en las hojas de C04, consecuentemente generaría mayor presión de vapor, lo cual tendría un efecto directo en el aumento de la temperatura interna de la hoja. Sin embargo, la figura 3.4 indica que existiría una tendencia del C19 a incrementar la temperatura interna de la hoja, a medida que aumenta el nivel de salinidad. Esto podría sugerir, que, aunque C19 tiende a mantener estomas más abiertos que C04, esta condición, desde la perspectiva del estrés por salinidad, tendría una tendencia interesante, ya que existiría una predisposición hacia el cierre estomático del C19 al aumentar la salinidad, como se comportaría cualquier especie, ocasionando una mayor concentración de vapor de agua en los espacios aéreos de la hoja, y por lo tanto, conllevando a que la temperatura interna de la hoja aumente.

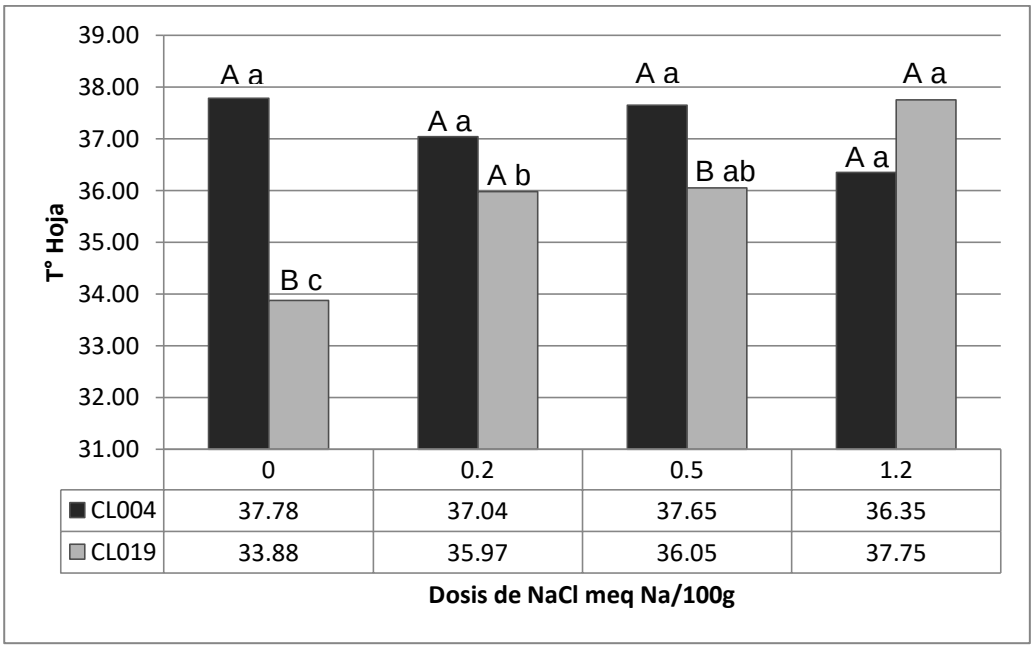

Figura 3.4. Temperatura interna de la hoja en función de diferentes dosis de NaCl

3.5.1.4. Relación de la concentración de CO_2 en el espacio subestomático (Ci/Ca)

La relación de la concentración interna de CO_2 (mol mol^{-1}), en el espacio subestomático presentó efectos de la interacción dosis*genotipo (Tabla 3.1). Al descomponer la interacción en la figura 3.5, se evidencian diferencias altamente significativas de los genotipos a niveles de 1,2 meq Na/100g, observando una mayor reducción en C19.

Los valores positivos de Ci/Ca en los niveles 0 y 0,2 meq Na/100g indican la permanencia de la apertura estomática en ambos genotipos y consecuente intercambio de CO_2 con el ambiente, sin embargo, al incrementar el nivel salino de leve a moderado (0,5 meq Na/100g), los genotipos expresan valores negativos, lo que indica el cierre definitivo de estomas y el consumo excesivo del CO_2 almacenados en los espacios subestomáticos.

De acuerdo con Centritto y col. (2003), un alto Ci/Ca podría indicar que la disminución fotosintética se debió a la reducción inducida por la sal en la conductancia del mesófilo, en lugar de efectos estomáticos. Contrariamente, en la presente investigación sólo se observaron tendencias a la disminución del Ci/Ca.

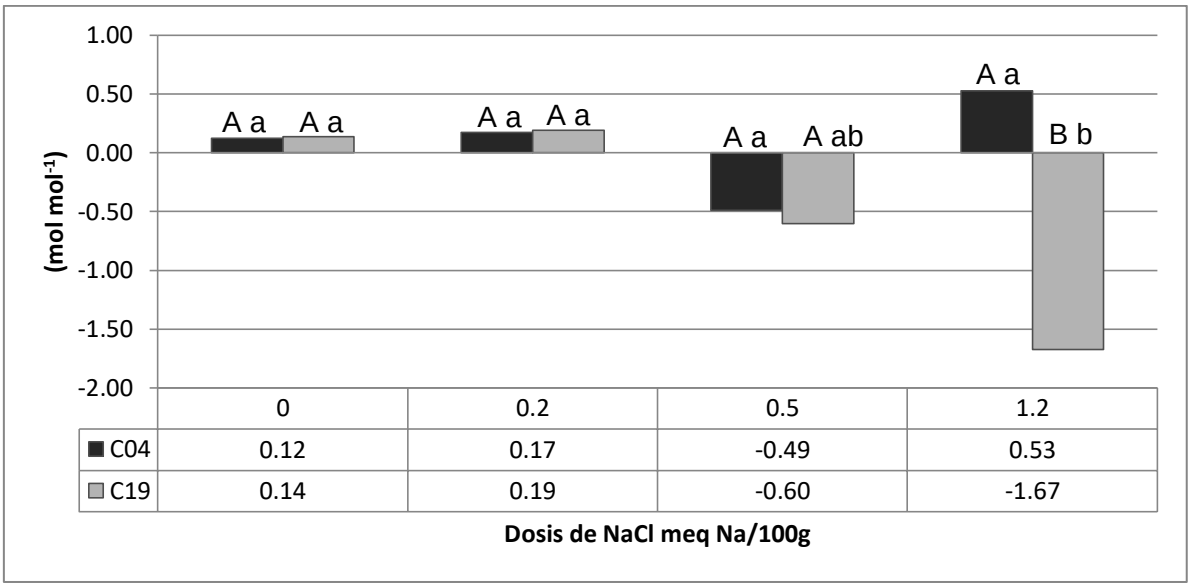

Figura 3.5. Relación de la concentración de CO_2 en el espacio subestomático.

3.6 Conclusiones

Stevia rebaudiana Bert, presentó un comportamiento diferencial en las variables de intercambio gaseoso, como la tasa de asimilación de CO_2, DPV, temperatura interna de la hoja y Ci/Ca, mientras que los valores de conductancia estomática y transpiración no reportaron efectos de las dosis de NaCl y/o los genotipos. El genotipo, C19 presentó niveles superiores de asimilación de CO_2 al compararlo con C04, en un ambiente normal como en condiciones salinas levemente estresantes de 1,2 meq de Na/100g, comportamiento que puede atribuirse a condiciones genéticas intrínsecas a este material. Las dosis de NaCl tuvo un efecto altamente significativo sobre la tasa de asimilación de CO_2, mostrando una reducción del 27.3%, cuando la dosis de salinidad está por encima de 0,5 meq Na/100g comparado con suelos donde no existe estrés por salinidad. Por su parte, el contenido de pigmentos fotosintéticos, no mostró efectos del genotipo, dosis salinas y/o la interacción de ambos.

Aparentemente, la salinidad no tiene un efecto determinante sobre las tasas de apertura y cierre estomático bajo las condiciones ambientales del presente estudio, lo que consecuentemente explica el comportamiento de las tasas de transpiración, por lo tanto,

la conductancia estomática no podría explicar el comportamiento decreciente de la fotosíntesis.

Los valores superiores en el DPV de C04 podría sugerir el uso de estrategias fisiológicas de defensa tal como el cierre estomático para evitar la pérdida excesiva de agua, lo que consecuentemente refleja mayor diferencia de humedad con el ambiente. Por otro lado, los valores reducidos del DPV en C19 sugerirían que este genotipo presenta mayor equilibrio relativo del agua del ambiente con el agua interna de la hoja, lo que sugeriría mayor apertura estomática al momento de la medición y probablemente mayores tasas de captura de CO_2 (fotosíntesis). En este sentido, los resultados de la temperatura interna de la hoja indican que existiría una tendencia del C19 a incrementar la temperatura interna de la hoja, a medida que aumenta el nivel de salinidad, mientras que C04 se mantiene constante. Por último3, Los valores de Ci/Ca tienen una tendencia a disminuir con el aumento de la salinidad, lo que indica un cierre estomático por el uso del CO2 reservado en los espacios intercelulares.

3.7 LITERATURA CITADA

Abbas Momtazi-Borojeni, A., S.-A. Esmaeili, E. Abdollahi and A. J. C. p. d. Sahebkar (2017). "A review on the pharmacology and toxicology of steviol glycosides extracted from Stevia rebaudiana." 23(11): 1616-1622.

Aghighi Shahverdi, M., H. Omidi and S. J. Tabatabaei (2019). "Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) responses to NaCl stress: Growth, photosynthetic pigments, diterpene glycosides and ion content in root and shoot." Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences 18(4): 355-360.

Arbona, V., M. Manzi, C. D. Ollas and A. Gómez-Cadenas (2013). "Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants." 14(3): 4885-4911.

Assaei, R., P. Mokarram, S. Dastghaib, S. Darbandi, M. Darbandi, F. Zal, M. Akmali and G. H. R. J. A. j. o. m. b. Omrani (2016). "Hypoglycemic effect of aquatic extract of Stevia in pancreas of diabetic rats: PPARγ-dependent regulation or antioxidant potential." 8(2): 65.

Barrera, J., D. Suárez and L. M. J. E. e. f. v. M. Melgarejo, LM Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Vegetal. Departamento de Biología. Universidad Nacional de Colombia (2010). "II. Análisis de crecimiento en plantas." 25-39.

Bhasker, S., H. Madhav and M. J. P. Chinnamma (2015). "Molecular evidence of insulinomimetic property exhibited by steviol and stevioside in diabetes induced L6 and 3T3L1 cells." 22(11): 1037-1044.

Cantabella, D., A. Piqueras, J. R. Acosta-Motos, A. Bernal-Vicente, J. A. Hernández, P. J. P. P. Díaz-Vivancos and Biochemistry (2017). "Salt-tolerance mechanisms induced in Stevia rebaudiana Bertoni: Effects on mineral nutrition, antioxidative metabolism and steviol glycoside content." 115: 484-496.

Carrero Fernández, A. L. and K. A. Suárez Molina (2019). "Comercialización de Stevia".

CEDRSSA. (2018). Oportunidades para la agricultura en México: La Estevia. Ciudad De México Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria: 28.

Chaves, M. Flexas and C. Pinheiro (2009). "Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell." 103(4): 551-560.

Davison, P., C. Hunter and P. J. N. Horton (2002). "Overexpression of β-carotene hydroxylase enhances stress tolerance in Arabidopsis." 418(6894): 203-206.

Jarma, A., E. M. Combatt and J. A. J. A. C. Cleves (2010). "Aspectos nutricionales y metabolismo de Stevia rebaudiana (Bertoni). Una revisión." 38(2): 199-208.

Debnath, M., N. Ashwath and D. J. Midmore (2019). "Physiological and morphological responses to abiotic stresses in two cultivars of Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni." South African Journal of Botany 123: 124-132.

Debnath, M. J. J. o. m. p. r. (2008). "Clonal propagation and antimicrobial activity of an endemic medicinal plant Stevia rebaudiana." 2(2): 45-51.

Flores, E. V. and O. H. J. A. B. M. Espinosa (2018). "El género Stevia (Eupatorieae, Asteraceae) en el estado de Morelos, México." (125): 7-36.

Ghaheri, M., S. Miraghaee, A. Babaei, B. Mohammadi, D. Kahrizi, Z. S. Haghighi and G. J. C. M. B. Bahrami (2018). "Effect of Stevia rebaudiana Bertoni extract on sexual dysfunction in Streptozotocin-induced diabetic male rats." 64: 6-10.

Goudriaan, J. and H. Van Laar (1995). Modeling Potential Growth Processes. Textbook with exercises, Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.

Hajar, E. W. I., A. Z. B. Sulaiman and A. M. M. Sakinah (2014). "Assessment of Heavy Metals Tolerance in Leaves, Stems and Flowers of Stevia Rebaudiana Plant." Procedia Environmental Sciences 20: 386-393.

Hernández, J. L., E. M. Combatt, A. Jarma O, J. Polo S and L. Rodríguez P (2016). "Rendimiento y calidad de hojas de Stevia rebaudiana Bert. bajo la oferta edafológica y dos niveles de radiación en cinco regiones de colombia." Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica 19: 77-85.

Jarma, A., T. Rengifo and H. J. A. C. Araméndiz-Tatis (2005). "Aspectos fisiológicos de estevia (Stevia rebaudiana Bertoni) en el Caribe colombiano: I. Efecto de la radiación incidente sobre el área foliar y la distribución de biomasa." 23(2): 207-216.

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

Jarma, O. A. d. J. (2010). "Adaptación de dos clones de Estevia (Stevia rebaudiana bert.) en tres ambientes del Caribe colombiano/Adaptation of two clones of Stevia (Stevia rebaudiana bert.) in three Colombian Caribbean environments."

Jarma Orozco, A., C. Cardona Ayala, C. J. R. U. A. Fernández Herrera and D. Científica (2012). "Temperature and radiation effect on steviol glycosides production in Stevia rebaudiana in the Colombian humid Caribbean region." 15(2): 339-347.

Jarma Orozco, A., C. Cardona Ayala, C. J. R. U. A. Fernández Herrera and D. Científica (2012). "Temperature and radiation effect on steviol glycosides production in Stevia rebaudiana in the Colombian humid Caribbean region." 15(2): 339-347.

Jarma-Orozco, A., E. Combatt-Caballero and J. Jaraba-Navas (2020). "Growth and development of Stevia rebaudiana Bert., in high and low levels of radiation." Current Plant Biology: 100144.

Jarma-Orozco, A., E. Combatt-Caballero and J. J. C. P. B. Jaraba-Navas (2020). "Growth and development of Stevia rebaudiana Bert., in high and low levels of radiation." 100144.

Kim, N.-C. and A. D. Kinghorn (2002). "Highly sweet compounds of plant origin." 25(6): 725-746.

Kurek, J. M. and Z. Krejpcio (2019). "The functional and health-promoting properties of Stevia rebaudiana Bertoni and its glycosides with special focus on the antidiabetic potential – A review." Journal of Functional Foods 61: 103465.

Lemus-Mondaca, R. (2012). "Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects." Food chemistry v. 132(no. 3): pp. 1121-1132-2012 v.1132 no.1123.

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

López, V., S. Pérez, A. Vinuesa, C. Zorzetto, O. J. F. Abian and function (2016). "Stevia rebaudiana ethanolic extract exerts better antioxidant properties and antiproliferative effects in tumour cells than its diterpene glycoside stevioside." 7(4): 2107-2113.

Mohr, H. and P. Schopfer (1995). Biosynthetic metabolism. Plant Physiology, Springer: 275-284.

Muchate, N. S., G. C. Nikalje, N. S. Rajurkar, P. Suprasanna and T. D. J. T. B. R. Nikam (2016). "Plant salt stress: adaptive responses, tolerance mechanism and bioengineering for salt tolerance." 82(4): 371-406.

Munns, R. and Tester (2008). "Mechanisms of salinity tolerance." 59: 651-681.

Munns, R. J. N. p. (2005). "Genes and salt tolerance: bringing them together." 167(3): 645-663.

Murphy, P. e. Lugo and systematics (1986). "Ecology of tropical dry forest." 17(1): 67-88.

Narváez, M., C. Combatt, I. J. R. U. A. Bustamante Barrera and D. Científica (2014). "Spatial Distribution Of The Soil Salinity In The Area Of Influence Of The Sinú River Mouth (Cordoba-Colombia)." 17(2): 433-443.

Nouri, M.-Z., A. Moumeni and S. J. I. j. o. m. s. Komatsu (2015). "Abiotic stresses: insight into gene regulation and protein expression in photosynthetic pathways of plants." 16(9): 20392-20416.

Orozco, J. and A. J. F. d. A. de Jesús "Adaptación de dos clones de Estevia (Stevia rebaudiana bert.) en tres ambientes del Caribe colombiano/Adaptation of two clones of Stevia (Stevia rebaudiana bert.) in three Colombian Caribbean environments."

Palencia Severiche, G., T. Mercado Fernández and E. Combatt Caballero (2006). Estudio agroclimático del departamento de Córdoba, Universidad de Córdoba (Colombia), Facultad Ciencias Agrarias.

Pandey, M. and S. J. o. G. Chikara, ISSN (2015). "Effect of salinity and drought stress on growth parameters, glycoside content and expression level of vital genes in steviol glycosides biosynthesis pathway of Stevia rebaudiana (Bertoni)." 0975-2862.

Parida, A. K., A. B. J. E. Das and e. safety (2005). "Salt tolerance and salinity effects on plants: a review." 60(3): 324-349.

Reis, M., L. Coelho, G. Santos, U. Kienle and J. J. A. W. M. Beltrão (2015). "Yield response of stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) to the salinity of irrigation water." 152: 217-221.

Ritu, M., J. J. J. o. t. S. o. F. Nandini and Agriculture (2016). "Nutritional composition of Stevia rebaudiana, a sweet herb, and its hypoglycaemic and hypolipidaemic effect on patients with non-insulin dependent diabetes mellitus." 96(12): 4231-4234.

Rojas, E., V. Bermúdez, Y. Motlaghzadeh, J. Mathew, E. Fidilio, J. Faria, J. Rojas, M. C. de Bravo, J. Contreras and L. P. J. C. n. r. Mantilla (2018). "Stevia rebaudiana Bertoni and its effects in human disease: emphasizing its role in inflammation, atherosclerosis and metabolic syndrome." 7(3): 161-170.

Roy, S. J., S. Negrão and M. J. C. o. i. B. Tester (2014). "Salt resistant crop plants." 26: 115-124.

Ruiz-Ruiz, J. C., Y. B. Moguel-Ordoñez and M. R. Segura-Campos (2017). "Biological activity of Stevia rebaudiana Bertoni and their relationship to health." Critical Reviews in Food Science and Nutrition 57(12): 2680-2690.

Saibo, N. J., T. Lourenço and M. M. J. A. o. b. Oliveira (2009). "Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses." 103(4): 609-623.

Samuel, P., K. T. Ayoob, B. A. Magnuson, U. Wölwer-Rieck, P. B. Jeppesen, P. J. Rogers, I. Rowland and R. Mathews (2018). "Stevia Leaf to Stevia Sweetener: Exploring Its Science, Benefits, and Future Potential." The Journal of Nutrition 148(7): 1186S-1205S.

Sánchez, J. A. (2017). "Análisis Subsectorial del Cultivo de Stevia (1.1. 1)."

Šic Žlabur, J., S. Voća, N. Dobričević, D. Ježek, T. Bosiljkov and M. J. A. C. S. Brnčić (2013). "Stevia rebaudiana Bertoni-A review of nutritional and biochemical properties of natural sweetener." 78(1): 25-30.

Singh, S. and G. J. S. t. Rao (2005). "Stevia: The herbal sugar of 21 st century." 7(1): 17-24.

Taiz, L. and E. Zeiger (2006). Fisiologia vegetal, Universitat Jaume I.

4. ANEXOS

Anexo 1. Efecto de los tratamientos 15 días después del trasplante (DDT)

TESTIGO - C04

0,2 meq Na/100g - C04

0,5 meq Na/100g - C04

1,2 meq Na/100g - C04

2,0 meq Na/100g - C04

3,0 meq Na/100g - C04

TESTIGO – CL019

0,2 meq Na/100g – CL019

0,5 meq Na/100g – CL019

1,2 meq Na/100g – CL019

2,0 meq Na/100g – CL019

3,0 meq Na/100g – CL019