



"Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible"

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

Trabajo de Tesis

Efecto de micorrizas arbusculares sobre el desarrollo vegetativo de porta injertos de cítricos (*Citrus limon* L.) en el vivero de OIRSA, Masaya

Autores

Br. Jerlin Yolai Rosales Escalon

Br. Lesmar Enrique Pérez Ruiz

Asesores

MSc. Isaías Sánchez Gómez

MSc. Jael Bildad Cruz Castillo

**Managua, Nicaragua
Diciembre, 2020**



"Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible"

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

Trabajo de Tesis

Efecto de micorrizas arbusculares sobre el desarrollo vegetativo de porta injertos de cítricos (*Citrus limón* L.) en el vivero de OIRSA, Masaya

Autores

Br. Jerlin Yolai Rosales Escalon

Br. Lesmar Enrique Pérez Ruiz

Asesores

MSc. Isaías Sánchez Gómez

MSc. Jael Bildad Cruz Castillo

Presentado a la consideración del honorable tribunal examinador como requisito final para optar al grado de Ingeniero en Sistemas de Protección Agrícola y Forestal

Managua, Nicaragua
Diciembre, 2020

Hoja de aprobación del Tribunal Examinador

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable Tribunal Examinador designado por el Decanato de la Facultad de Agronomía como requisito final para optar al título profesional de:

Ingeniero en Sistemas de Protección Agrícola y Forestal

Miembros del Tribunal Examinador

Presidente (Grado académico y nombre)

Secretario (Grado académico y nombre)

Vocal (Grado académico y nombre)

Lugar y Fecha: _____

ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
I INTRODUCCIÓN	1
II OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
III MARCO DE REFERENCIA	4
3.1 Aspectos generales del Limón	4
3.2 Características de la especie	4
3.3 Clasificación de Porta injertos	5
3.3.1 Citrange "Carrizo"	5
3.3.2 Citrange "Troyer"	5
3.4 Clasificación de las micorrizas	5
3.5 Aspectos generales de las micorrizas arbusculares (MA)	5
3.6 Beneficios de las micorrizas en la nutrición de las plantas	6
IV MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1 Ubicación del área de estudio	8
4.2 Diseño experimental	8
4.3 Colecta de muestras de suelo en plantaciones de cítricos	8
4.4 Separación de esporas de micorrizas a partir de muestras de suelo	9
4.4.1 Método de tamizado y decantación en húmedo para separación de esporas de micorrizas en muestras de suelo	9
4.4.2 Método de centrifugación para separación de esporas de micorrizas en muestras de suelo	9
4.5 Identificación de géneros de micorrizas	9

4.6	Inoculación de porta injertos Citrange. Carrizo y Citrange. Troyer	10
4.7	Determinación del porcentaje de colonización de micorrizas en porta injertos	10
4.8	Variables evaluadas	11
4.9	Variables morfológicas	11
4.10	Análisis estadístico	11
V	RESULTADOS Y DISCUSION	12
5.1	Identificación de géneros de micorrizas	12
5.2	Determinación del porcentaje de colonización de micorrizas en raíces de porta injertos	14
5.3	Evaluación de variables morfológicas en porta injertos	16
5.3.1	Determinación de altura de planta, número de hojas, diámetro de tallo y longitud de raíces	16
5.3.2	Determinación de biomasa	19
VI	CONCLUSIONES	21
VII	RECOMENDACIONES	22
VIII	LITERATURA CITADA	23
IX	ANEXOS	26

DEDICATORIA

Primeramente, a Dios padre por brindarme fuerzas y sabiduría para lograr culminar mis estudios.

A mis padres: Alma Leticia Escalon St. Clair (q.e.p.d) y Elmer Martin Rosales Castellón por todo el apoyo y confianza que depositaron en mí.

A mis abuelas: Jerusha Leticia St.clair Hobb y Faustina Castellón Guzmán.

A la Lic. Yahira Tucker Medina por el apoyo y ayuda incondicional que me ha brindado durante todo este proceso.

Br. Jerlin Yolai Rosales Escalon

DEDICATORIA

Al padre eterno que me dio la oportunidad y la bendición de realizar este estudio y de culminar con mi profesión, a mi amada madre Marbelis, a mi padre Lester, quienes, con mucho amor, entrega, sacrificio, sedimentaron en mí, valores, principios morales y éticos, logrando hacer realidad el más grande sueño que un hijo anhela y que no todos tenemos la misma oportunidad.

A mi querido hijo Emmanuel que es gran motivación en cada instante y segundo de mi vida; a Azaria Yarima, la madre de mi hijo.

A mi hermano Yamil Enrique, por su invaluable apoyo y motivación para que siguiera adelante con mis estudios.

Que el padre eterno bendiga a cada una de las personas que estuvieron presente brindándome su apoyo en cada momento de mis estudios; que de una u otra forma hicieron que lograra mis sueños, culminando con esfuerzo y éxito mi carrera profesional.

Br. Lesmar Enrique Pérez Ruiz

AGRADECIMIENTOS

A Dios padre por regalarme la fuerza necesaria para enfrentar cada circunstancia y la sabiduría para tomar decisiones que me permitieron alcanzar esta meta.

A mis padres por todo su esfuerzo y la confianza que me dieron para cumplir una meta más en mi vida.

A mis asesores MSc. Lic. Isaías Sánchez Gómez y MSc. Jael Bildad Cruz Castillo por compartir sus conocimientos, brindarme apoyo y confianza en el transcurso de este trabajo.

A MSc. Markelin Rodriguez e Ing. Eliezer Lanuza por brindarnos su ayuda en la realización de este trabajo.

A la Lic. Yahira Tucker por su apoyo incondicional.

Al Ing. Juan Agustín Chavarría Valdivia, por su apoyo en la realización de esta tesis

A Ing. Jonathan Jirón por el tiempo dedicado y la confianza.

Br. Jerlin Yolai Rosales Escalon

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Agraria, por brindarme su contribución en mi formación profesional.

A mis docentes asesores, Msc. Isaías Sánchez, Msc. Jael cruz, que con arduo trabajo, esfuerzo y dedicación dieron parte a que este trabajo fuera una realidad.

Al organismo internacional regional de sanidad agropecuaria (OIRSA), que contribuyeron en gran parte para que este estudio se realizara.

Al ingeniero Juan Agustín Chavarría Valdivia , por su apoyo en la realización de esta tesis

Al ing. Jonathan Jirón, excelente amigo que estuvo siempre presente en el vivero brindándonos ayuda y apoyo con el ensayo en el vivero del OIRSA.

Br. Lesmar Enrique Pérez Ruiz

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Porcentaje de esporas por géneros de hongos micorrizas identificados en muestras de suelo procedentes de fincas con plantaciones de cítricos	12
2. Análisis de variables fisiológicas según Tukey del porta injerto de la variedad Troyer inoculado con aislados de <i>Glomus</i> sp	17
3. Análisis de variables fisiológicas según Tukey del porta injerto de la variedad Carrizo inoculado con aislados de <i>Glomus</i> sp	17

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1.	Géneros de hongos micorrizas identificados en muestras de suelo procedentes de fincas con cultivos de cítrico, <i>Glomus</i> sp (A) <i>Scutellespora</i> (B) <i>Acaulospora</i> (C) <i>Septoglomus</i> sp (D)	13
2.	Porcentaje de colonización de <i>Glomus</i> sp, en porta injertos de las variedades Troyer y Carrizo	14
3.	Raíces de porta injertos de la variedad Troyer (A y B) y Carrizo (C y D), colonizadas por el hongo del género <i>Glomus</i> sp. Hifas (1), Vesículas (2) y arbuscúlos (3)	15
4.	Porcentaje de materia seca en porta injertos Troyer y Carrizo inoculados con <i>Glomus</i> sp	19

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO		PÁGINA
1.	Colecta de muestras en arboles fincas productoras de cítricos	26
2.	Separación de micorrizas a partir de muestras de suelo	26
3.	Establecimiento del ensayo en invernadero HLB-OIRSA	27
4.	Programa de fertilización invernadero HLB-OIRSA	27
5.	Análisis de varianza de variables fisiológicas en porta injertos de la variedad carrizo	28
6.	Análisis de varianza de variables fisiológicas en porta injerto de la variedad Troyer	31

RESUMEN

Los cítricos son el cultivo frutal de mayor importancia económica en el mundo. En Nicaragua, la producción de cítricos genera 24,5 millones de dólares anuales. Las enfermedades que se pueden prevenir inoculando micorrizas en porta injertos son la podredumbre radicular causada por *Phytophthora* sp y el mal seco de los cítricos por *Fusarium* sp. La introducción de patrones resistentes a enfermedades es una necesidad en la citricultura actual. En las últimas décadas se ha usado los hongos micorrizas arbusculares por el efecto benéfico que producen en sus hospedantes. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de las micorrizas arbusculares sobre el desarrollo vegetativo de porta injertos Citrange Troyer y Citrange Carrizo. Los hongos micorrizas inoculados fueron aislados de las fincas productoras de cítricos Félix, Marino y San José. El género identificado con mayor porcentaje fue *Glomus* sp, con 97 a 99%, mientras que los géneros *Scutellospora* sp, *Gigaspora* sp., *Septoglomus* sp y *Acaulospora* sp, representaron el 1% respectivamente. El porcentaje de colonización de raíces con el género *Glomus* sp, fue del 93% para el porta injerto Troyer y en Carrizo fue de 83 a 100%. El efecto de *Glomus* sp, se evaluó midiendo las variables altura de planta (cm), número de hojas, diámetro de tallo (mm), longitud de raíz (cm) y biomasa (g). Los resultados del análisis de varianza y separación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$), presentan diferencias significativas para el porta injerto Troyer en las variables diámetro de tallo y longitud de raíces con el aislado de la finca San José, en el caso del porta injerto Carrizo el número de hojas, diámetro de tallo y longitud de raíz mostraron los más altos valores con el aislado de la finca Félix.

Palabras clave: Cítricos, Vesículas, *Glomus* sp, Esporas

ABSTRACT

Citrus fruits are the most economically important fruit crop in the world. In Nicaragua, citrus production generates \$ 24.5 million annually. The diseases that can be prevented by inoculating mycorrhizae in rootstocks are root rot caused by *Phytophthora* sp. and the dry disease of citrus by *Fusarium* sp. The introduction of disease resistant patterns is a necessity in today's citrus industry. In the last decades, arbuscular mycorrhizal fungi have been used for the beneficial effect they produce on their hosts. The objective of this study was to evaluate the effect of arbuscular mycorrhiza on the vegetative development of Citrange Troyer and Citrange Carrizo rootstock. The inoculated mycorrhizal fungi were isolated from the Félix, Marino and San José citrus farms. The genus identified with the highest percentage was *Glomus* sp, with 97 to 99%, while the genera *Scutellospora* sp., *Gigaspora* sp., *Septoglomus* sp. and *Acaulospora* sp., represented 1% respectively. The percentage of root colonization with the *Glomus* sp. genus was 93% for the Troyer graft holder and in Carrizo it was 83 to 100%. The effect of *Glomus* sp. was evaluated by measuring the variables plant height (cm), number of leaves, stem diameter (mm), root length (cm) and biomass (g). The results of the analysis of variance and separation of means of Tukey ($\alpha = 0.05$), show significant differences for the Troyer rootstock in the variables stem diameter and root length with the isolate from the San José farm, in the case of the root Carrizo graft the number of leaves, stem diameter and root length showed the highest values with the isolate from the Felix farm.

Keywords: Citrus, Vesicles, *Glomus* sp, Spores

I INTRODUCCIÓN

Los cítricos son unos de los cultivos frutales de mayor importancia económica en el mundo. Dentro del contexto mundial más de 100 países producen cítricos entre ellos los de mayor producción son: Brasil 22%, USA 16%, China 12%, México 9%, y España con 5.8% aportan el 64.8% de la producción. Otros países productores son India, Irán, Italia, Argentina, Egipto, Turquía, Pakistán, Sudáfrica, Grecia, Japón, Cuba, Venezuela, Costa Rica, Paraguay, Argentina, Honduras, Perú, República Dominicana, Nicaragua y Colombia (Vásquez, 2013).

Coronado (2019) argumenta que la producción de cítricos en Nicaragua es de gran importancia económica, generando 24,5 millones de dólares anuales, está a cargo de 11,077 productores, en una superficie aproximada de 21,100 ha, además esta industria genera 4,000 empleos directos y 5,000 indirectos. En Nicaragua el cultivo de naranjas ocupa el 80% (16,880 ha) de la producción total de cítricos, mientras que el 10% (2,110 ha) corresponde a las mandarinas, el 7% (1,477 ha) a limones (Lacayo, 2013).

Según Ayres y Bové (2007), las enfermedades más severas y comunes en los cítricos son: el cáncer de los cítricos causada por un complejo de bacterias del género *Xanthomonas*, clorosis variegada de los cítricos (CVC) causada por *Xylella fastidiosa* Huanglongbing (HLB) ocasionada por *Candidatus liberibacter*, virus de la tristeza de los cítricos (CTV), podredumbre seca de las raíces por *Fusarium solani*; gomosis por *Phytophthora* sp. Luis *et al.*, (2010) en esta última los porta injertos Troyer y Carrizo son resistentes a esta enfermedad.

Vásquez (2013), argumenta que la fruticultura moderna busca mayor productividad sin desmejorar otras características importantes como calidad y la resistencia a condiciones adversas del medio y a problemas fitosanitarios. La introducción de patrones resistentes a enfermedades es una necesidad de la citricultura actual.

Alamar (2002), define que el injerto es una técnica que consiste en juntar íntimamente partes de dos plantas (copa y patrón), en condiciones especiales para facilitar su unión y conseguir que se desarrollen como una sola, manteniendo características propias individuales (Alamar, 2002).

Según López y Cardona. (2007) el uso de porta injertos, ha constituido uno de los grandes artificios utilizado por el hombre a través del cual ha logrado tener ventajas como el incremento de los rendimientos, calidad de los frutos y la explotación en sitios con características adversas

para el normal desarrollo de las diferentes especies de cítricos. Otras ventajas que ha brindado el uso de porta injertos son: la tolerancia a plagas, enfermedades, producción de frutos sin semillas, producción temprana de la copa injertada.

Según Alarcón y Cerrato (1999) en las últimas décadas se les ha dado especial importancia a los hongos micorrícicos, particularmente la micorriza arbuscular, con base en los efectos benéficos que estos micosimbiontes proveen a sus hospedantes; por lo que el manejo que tienen estos endófitos tiene uso potencial en los diferentes procesos de propagación de plantas. Aunque puede aplicarse en campo, con diversas restricciones, la principal aplicación de estos hongos es en aquellos sistemas que requieren de una fase de vivero, antes que se liberen a campo. Las plantas micorrizadas toleran mejor condiciones de estrés fisiológico, como el trasplante, ciclos de sequía, salinidad excesiva o suelos deficientes en nutrientes. Todo ello conduce a una mejor adaptación de las plantas micorrizadas en terrenos pobres en nutrientes y deficientes en agua (Camprubí *et al.*, 2000).

Agustí (2000), señala que los patrones de cítricos difieren sensiblemente en la dependencia de los hongos formadores de micorriza arbuscular. Ésta diferencia es determinada por la capacidad de absorción de fósforo, su densidad radicular y la capacidad de transporte de agua.

El manejo o establecimiento de la biotecnología que representan los hongos micorrícicos arbusculares, se debe de realizar en las primeras fases del crecimiento y/o establecimiento del porta injerto, de modo que reciban el mayor beneficio previamente a su explotación comercial. Por otro lado, se encuentra la importancia que adquieren los viveros en este proceso, ya que son ellos los encargados de producir las plantas que serán utilizadas en las futuras plantaciones (Aravena, 2013).

En este sentido este estudio pretende evaluar el efecto que causan las micorrizas arbusculares sobre el desarrollo vegetativo de los porta injertos Citrange Troyer y Citrange Carrizo.

II OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de las micorrizas arbusculares sobre el desarrollo vegetativo de porta injertos del limón (*Citrus limón* L.) en el vivero de OIRSA, Masaya

2.2 Objetivos específicos

- Identificar géneros de micorrizas en muestras de suelo procedentes de fincas productoras de limón (*Citrus limón* L.)
- Determinar el porcentaje de colonización de los HMA en raíces de los porta injertos evaluados
- Determinar la respuesta de las variables morfológicas, según géneros de hongos micorrizas arbusculares (HMA) inoculados en porta injertos Citrange "Troyer" y Citrange "Carrizo"

III MARCO DE REFERENCIA

3.1 Aspectos generales del Limón

El limón (*Citrus limon*) pertenece a la familia Rutaceae al igual que la toronja (*Citrus paradisi*), la mandarina (*Citrus reticulata*), la naranja agria (*Citrus aurantium*) y otros (Morton, 1987).

Según Davies y Albrigo (1994); Morton (1987), el limón evolucionó en las laderas más bajas de las montañas del Himalaya en el este de la India. Investigaciones moleculares indican que el limón se originó a partir de un cruce de cidra (*C. medica*) y naranja agria (*C. aurantium*) (Moore, 2001).

3.2 Características de la especie

El árbol de limón o limonero es vigoroso, vertical y se extiende, con un hábito de crecimiento abierto (Tucker y Wardowski, 1976). Los árboles pueden alcanzar 10–20 pies (3.1–6.1 m) de altura (Morton, 1987).

Las hojas son alternas, elípticas o largas ovadas, de 2.5–4.5 pulgadas (6.25–11.25 cm) de largo, con márgenes serrados y pecíolos alados delgados. Rojizos al principio, se vuelven verdes a medida que crecen (Morton, 1987; Tucker y Wardowski, 1976). Las hojas maduras son de un verde más pálido que las hojas de naranja.

Las flores son solitarias o en grupos en las axilas de las hojas (Morton, 1987; Tucker y Wardowski, 1976). Según Tucker y Wardowski (1976) las yemas florales son rojizas; las flores abiertas tienen 4-5 pétalos y miden 0.75 pulgadas (2 cm de largo), blancas en la superficie superior y purpurinas en la superficie inferior. Las flores tienen 20–40 estambres con anteras amarillas. Muchas flores son estériles debido al aborto de pistilo; la fertilidad de las flores varía mucho de una floración a otra y de una temporada a otra.

La fruta es ovalada, por lo general con un ápice similar a un pezón en el extremo estelar, y varía entre 5 y 12 pulgadas (5 a 12 cm) (Morton, 1987; Tucker y Wardowski, 1976). La forma de la fruta está influenciada por las temperaturas, y las frutas producidas durante el verano y el otoño son relativamente redondas, mientras que las frutas del invierno y principios de la primavera son ovales (Davies y Albrigo, 1994; Monselise *et al.*, 1981).

La cáscara es de color amarillo claro a amarillo, de 0.25–0.38 pulgadas (6–10 mm) de grosor, lisa a áspera y salpicada de glándulas de aceite (Davies y Albrigo, 1994; Jackson, 1991). La pulpa se divide en 8-10 segmentos, amarillo pálido, jugosa y ácida. Algunas frutas no tienen semillas, la mayoría tiene algunas semillas; Las semillas son pequeñas (0.38 pulgadas; 9.5 mm de largo).

3.3 Clasificación de Porta injertos

3.3.1 Citrange "Carrizo"

Este porta injerto se caracteriza por ser sensible a la caliza, tolerante a exocortis y sensible a woody gall (agallas de la madera). Es incompatible con limón Eureka, tolerante a la tristeza y sensible a la salinidad, además de adelantar la maduración de la fruta en las variedades injertadas.

3.3.2 Citrange "Troyer"

Este porta injerto se caracteriza por ser tolerante a ciertas enfermedades y plagas como, *Phytophthora*, tristeza, *Xyloporosis*, adaptabilidad a suelos y climas, en calcio elevado es bueno, salinidad intermedio, en bajas temperatura es bueno y a sequia intermedio, compatible con la mayoría de yemas de cítricos.

3.4 Clasificación de las micorrizas

Pertenecen al reino Fungí, filo Glomeromycota y al orden Glomeraceae, se caracterizan por colonizar las raíces de los arboles produciendo efectos benéficos (EPPO, 2018)

3.5 Aspectos generales de las micorrizas arbusculares (MA)

Se conoce con el nombre de micorriza a la asociación mutualista establecida entre las raíces de la mayoría de las plantas (tanto cultivadas como silvestres) y ciertos hongos del suelo. Se trata de una simbiosis prácticamente universal, no sólo porque casi todas las especies vegetales son susceptibles de ser micorrizadas, sino también porque pueden estar presente en la mayoría de los hábitats naturales (Hernández, 2003).

El mutualismo supone una relación beneficiosa para los dos organismos implicados (hongo y planta), y tanto el hongo como la planta se ven favorecidos por la asociación: el hongo coloniza

la raíz de la planta y le proporciona minerales y agua, que extrae del suelo por medio de su red externa de hifas, mientras que la planta suministra al hongo sustratos energéticos y carbohidratos que elabora a través de la fotosíntesis (Hernández, 2003).

3.6 Beneficios de las micorrizas en la nutrición de las plantas

El efecto más importante que producen las MA en las plantas es un incremento en la absorción de nutrientes minerales del suelo, que se traduce en un mayor crecimiento y desarrollo de las mismas (Hernández, 2000).

Los hongos formadores de MA ayudan a la captación de elementos minerales del suelo mediante dos mecanismos: uno puramente físico, el micelio del hongo es capaz de extenderse y explorar mayor superficie de suelo; iones como el fosfato, el amonio, el zinc o el cobre, son transportados más rápidamente a través de las hifas del hongo que por difusión a través del suelo. El segundo es un mecanismo bioquímico que incrementa la afinidad de la raíz micorrizada por el fosfato soluble de manera que las raíces captan fosfato a partir de concentraciones más bajas en el suelo (Camprubí *et al.*, 2000).

La necesidad de añadir fertilizantes no se elimina inoculando las plantas con hongos formadores de MA, ya que las micorrizas no producen fósforo ni otros nutrientes, pero sí permiten optimizar el rendimiento del fertilizante, reduciendo de esta manera su aporte (Camprubí *et al.*, 2000).

La micorrización temprana del material vegetal confiere un beneficio inicial a las plantas micorrizadas en cuanto a supervivencia al trasplante y establecimiento en plantación (Camprubí *et al.*, 2000). Los efectos beneficiosos de la introducción artificial de inóculo micorrízico resultan más evidentes en suelos donde las poblaciones de hongos MA nativos no existen, o han sido eliminadas por empleo de prácticas agrícolas desfavorables para su desarrollo como la fumigación del suelo y el cultivo intensivo (Sieverding *et al.*, 1991 citado por Hernández, 2000).

(Camprubí *et al.*, 2000) señalan que el uso de portainjertos de frutales micorrizados con un hongo previamente seleccionado, puede representar una ventaja que permita el replante con garantías de supervivencia y desarrollo del árbol en fase inicial cuando éste es más vulnerable.

Los beneficios económicos se derivan de una mayor y más uniforme producción, una mayor rapidez de crecimiento y entrada en producción de las plantas, una mejor calidad de la cosecha y un ahorro en fertilizantes, riego y productos fitosanitarios (Hernández, 2000).

IV MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación del área de estudio

El estudio se realizó en dos etapas, la primera consistió en identificar los géneros de micorrizas procedente de muestras de suelo y posteriormente la determinación del porcentaje de colonización de muestras de raíces de los porta injertos en estudio, la primera etapa se realizó en el laboratorio de Microbiología Vegetal de la Universidad Nacional Agraria, Facultad de Agronomía, ubicado en el km 12 carretera norte en las coordenadas 12°53'47" latitud norte y 85°53'33" longitud oeste y la segunda etapa en el vivero de cítricos OIRSA, situado en el km 30 carretera Tipitapa-Masaya, ubicado entre las coordenadas 12° 07'15.8" latitud norte y 86° 05'18.3" longitud oeste.

4.2 Diseño experimental

El diseño experimental que se utilizó fue un diseño completo al Azar (DCA), de carácter bifactorial (tratamientos y variedades) con 20 repeticiones y 3 aislados más un testigo para un total de 160 plántulas. El espacio entre bloque fue de un metro, entre cada unidad experimental un espacio de 0.5 m para un área total del ensayo de 320 m².

4.3 Colecta de muestras de suelo en plantaciones de cítricos

Se realizó el muestreo en las comunidades San José, Los Ángeles, Santa Rita y Santo Domingo del municipio de Masatepe, las fincas seleccionadas por comunidad fueron San José, Los Ángeles, Marino, Félix y La Bonita, respectivamente.

Se tomó como criterio de selección de las fincas el acceso y disponibilidad de los productores. Las muestras de suelo se tomaron a una profundidad de 20 cm, con la ayuda de un palin cerca de la zona de goteo en cinco puntos, diferente de cada finca, el suelo colectado se depositó en bolsas plásticas con capacidad de 2.2 kg y se trasladó al laboratorio de Microbiología Vegetal de la Universidad Nacional Agraria, para su posterior análisis.

4.4 Separación de esporas de micorrizas a partir de muestras de suelo

Se aplicó el método de tamizado y decantación en húmedo, así como el método de centrifugación para separación de micorrizas en muestras de suelo procedentes de fincas productoras de cítricos.

4.4.1 Método de tamizado y decantación en húmedo para separación de esporas de micorrizas en muestras de suelo

Se pesaron 100 gramos de suelo y se mezcló con 1000 ml de agua en un Beaker plástico con capacidad de 1500 ml, posteriormente se agitó manualmente con la ayuda de una espátula por un período de cinco a diez minutos y se dejó reposar por tres minutos, con el propósito de eliminar las partículas grandes de suelo por sedimentación, luego la solución se pasó a través de una columna de tamices graduados colocados en orden decreciente (500, 250, 150, 25 μm). Se agregó agua al decantado, para reposar y pasar nuevamente por la columna de tamices, este paso se repitió nuevamente dos veces más (Modificado de Gerdemann y Nicolson, 1963), la fracción de suelo obtenida de cada tamiz se colectó en un tubo Falcon de 50 ml para someterlo al método de centrifugación.

4.4.2 Método de centrifugación para separación de esporas de micorrizas en muestras de suelo

Se colectó la fracción de suelo obtenida de los tamices de 150 y 25 μm en tubo Falcon de 50 ml, se le adicionó 30 ml de agua y se centrifugó por 5 minutos a 1,800 rpm, posteriormente se eliminó el sobrenadante, se adicionó 30 ml de solución de sacarosa al 50 % y se centrifugó por 2 minutos a 1,800 rpm. Se decantó la solución en el tamiz de 25 μm y se lavaron las esporas con agua. Posteriormente se pasaron a un plato petri para separar y contar las esporas (Modificado de Jenkins, 1964).

4.5 Identificación de géneros de micorrizas

La identificación de los HMA a nivel de género se efectuó con ayuda de claves taxonómicas ilustradas de González, 1989 e INVAM, el porcentaje de géneros de HMA se calculó por regla de tres con base a cien esporas.

4.6 Inoculación de porta injertos Citrange. Carrizo y Citrange. Troyer

Se seleccionaron 80 plántulas del porta injerto Troyer con altura promedio de 37 cm y 80 plántulas de 15 cm de altura del porta injerto Carrizo, previamente trasplantadas en bolsas de 6 x 12 pulgadas, con 50% tierra, 30% lombrihumus y 20% arena poma, como sustrato, se expusieron las raíces extrayendo suelo con una espátula metálica. Posteriormente se inocularon aproximadamente 20-25 esporas ml⁻¹ en zona aledaña al sistema radicular del porta injerto de las especies de micorrizas que predominaron en el proceso de identificación por finca muestreada. Posteriormente a los 90 días después de la inoculación se realizó la medición de las variables morfológica y muestreo destructivo de las plántulas para separar raíces de tallos y hojas, secar a 80 °C por 48 horas y pesar (Hernández *et al.*, 2008).

Se utilizó un testigo absoluto que consistió en plántulas sin inocular y al momento de exponer raíces se adicionó agua destilada estéril, este último fue evaluado al igual que las plantas inoculadas. Las plantas evaluadas se fertilizaron según el programa de fertilización del invernadero HLB-OIRSA (Anexo 4).

4.7 Determinación del porcentaje de colonización de micorrizas en porta injertos

Para determinar el porcentaje de colonización de micorrizas en raíces de porta injertos, se realizó el método descrito por Phillips y Hayman (1970), que consiste en evaluar microscópicamente la morfología interna de la micorriza. Se colocaron las raíces coloreadas en laminillas, al menos 100 segmentos por tratamiento, se le agregó de una o tres gotas de Lactofenol o Lacto glicerol en los extremos de las raíces, de manera vertical sobre la preparación luego se dejó caer suavemente un portaobjetos evitando burbujas de aire, con ayuda del microscopio óptico en el aumento de 100X se observó la presencia de las estructuras fúngicas.

La estimación del porcentaje de colonización de micorrizas en raíces fue realizada mediante tres pasajes equidistantes sobre cada segmento, cuando una parte de la raíz atravesase el campo óptico del microscopio, si contiene hifas vesículas o arbusculos, independientemente del estado de intensidad de la micorrización, se le dio el valor de uno, para cada estructura, y dependiendo del número de observaciones.

El porcentaje de colonización se calculó según la fórmula descrita por Phillips y Hayman (1970):

$$\% \text{ de colonización} = \frac{\text{Número de campos colonizados}}{\text{Número total de campos observados}} \times 100$$

4.8 Variables evaluadas

Géneros de micorriza identificadas: se empleó el método de separación de esporas en suelo y se identificaron con claves taxonómicas.

Efecto de las micorrizas arbusculares sobre las variables morfológicas evaluadas. Se realizó conteo de hojas, medición de altura de planta, diámetro de tallo y longitud de raíces.

Porcentaje de colonización en raíces de porta injertos Citrange "Troyer" y Citrange "Carrizo": Se realizó observación al microscopio de estructuras de hongos micorrizas.

4.9 Variables morfológicas

Se determinó el número de hojas directamente de la planta, altura (cm) de planta con una cinta métrica, diámetro (mm) de tallo con un vernier y longitud de raíz (cm) fue medido con una cinta métrica, cada uno de los datos expresados en cm. El porcentaje de materia seca del área foliar y de raíces de los porta injertos, fue determinado a partir del peso fresco y peso seco (g) medidos en una balanza analítica OHAOS después de 48 horas de secado del área foliar y de raíces de los porta injertos. El cálculo de porcentaje de materia seca se realizó con la fórmula (Vílchez, 2002):

$$\% \text{ de materia seca} = \frac{\text{Peso seco}}{\text{Peso fresco}} \times 100$$

4.10 Análisis estadístico

Los datos de las variables fisiológicas altura, número de hojas, diámetro de tallo y longitud de raíces fueron organizados en una hoja de cálculo Excel 2013, posteriormente se realizaron pruebas de análisis de varianza ($\alpha=0.05$) y separación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$), en el programa estadístico *Infostat* versión 2013.

V RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Identificación de géneros de micorrizas

El género de hongo micorriza identificado con mayor porcentaje en la finca Marino fue *Glomus* sp con un 98%, en la finca San José 97% y en la finca Félix 99%. Los géneros con menores porcentajes fueron *Scutellospora* sp, *Gigaspora* sp, *Septoglomus* sp y *Acaulospora* sp, con 1% respectivamente según fincas (Cuadro 1, Figura 1). Las muestras de la finca La Bonita y Los Ángeles presentaron pocas estructuras de hongos micorrizas y abundante presencia de nematodos fitopatógenos, por tanto, se decidió excluirlas del estudio.

Cuadro 1. Porcentaje de esporas por género de hongos micorrizas identificados en muestras de suelo procedentes de fincas con plantaciones de cítricos.

Género identificado	Fincas		
	Marino	San José	Félix
<i>Glomus</i> sp	98%	97%	99%
<i>Scutellospora</i> sp	1%	1%	0%
<i>Gigaspora</i> sp	0%	1%	0%
<i>Septoglomus</i> sp	0%	0%	1%
<i>Acaulospora</i> sp	1%	1%	0%

En 30 muestras analizadas se obtuvo un porcentaje de ocurrencia de un 97 a un 99% para *Glomus* sp., similar al estudio realizado por Vega Miranda (2012), quien identificó micorrizas vesículo-arbusculares en especies agrícolas y forestales en la zona de Tingo María- Perú, los resultados obtenidos en 81 muestras analizadas reflejaron que el género *Glomus* sp, predominó con un porcentaje de ocurrencia del 100%.

Alvarado *et al.*, (2004), en su investigación realizaron caracterizaciones edáficas y presencia de micorrizas en plantaciones de teca (*Tectona Grandis* L.f.), en sus resultados afirma que en los sitios muestreados y analizados, se presentaron altos valores de infección de raíces y número de esporas en el suelo por hongos micorrízicos perteneciente a la amplia diversidad del género *Glomus* sp, además supone que este género es el más infectivo y efectivo en plantaciones de teca de Costa Rica.

Prieto *et al.*, (2012) afirman que durante la identificación de hongos micorrizicos arbusculares en sistemas agroforestales de cacao en el trópico húmedo ecuatoriano, el hongo del género *Glomus* sp predominó en comparación con los géneros *Scutellospora* sp, *Acaulospora* sp, y *Gigaspora* sp.

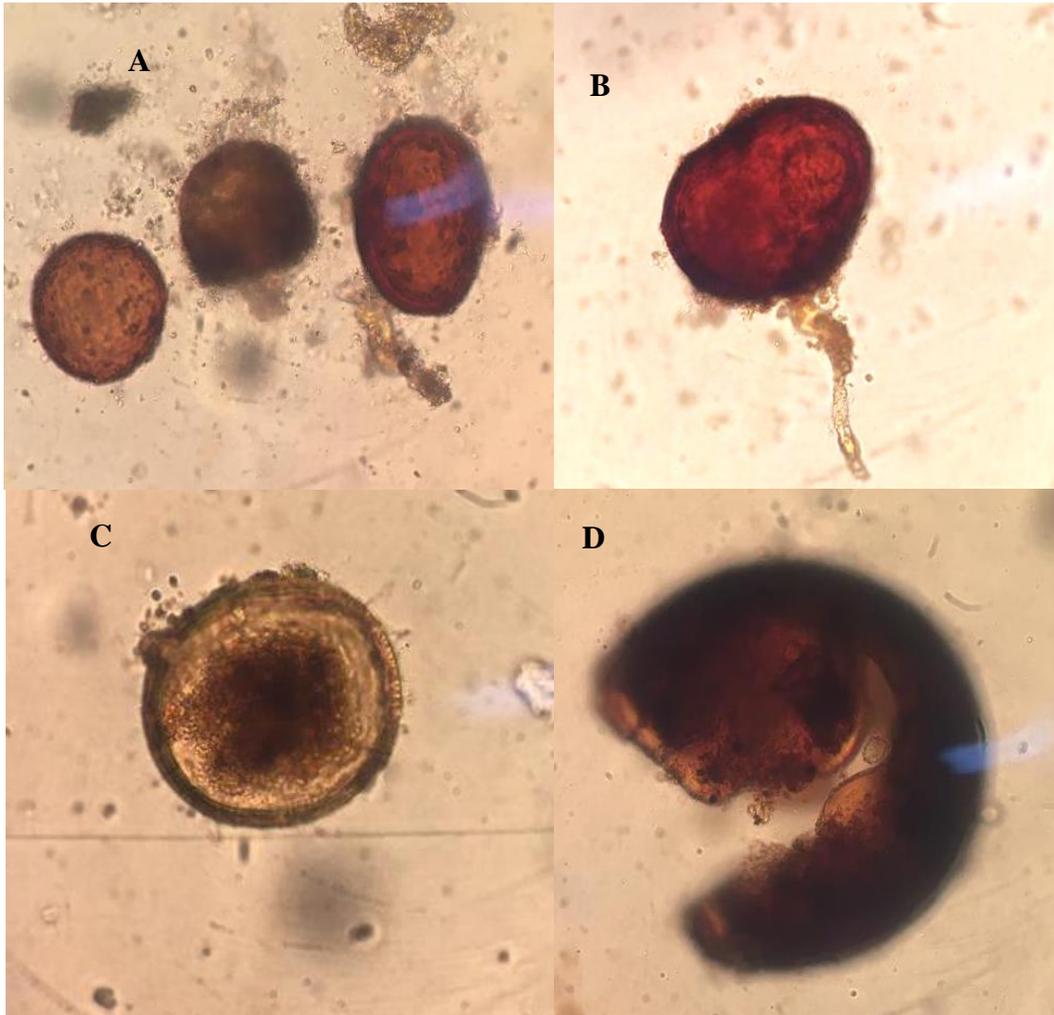


Figura 1. Géneros de hongos micorrizas identificados en muestras de suelo procedentes de fincas con cultivos de cítrico, *Glomus* sp (A) *Scutellospora* sp (B) *Acaulospora* sp (C) *Septoglomus* sp (D)

5.2 Determinación del porcentaje de colonización de micorrizas en raíces de porta injertos

Los hongos del género *Glomus* sp, procedentes de la finca Félix alcanzaron el 93 % de colonización en el porta injerto Troyer y un 83% en el porta injerto Carrizo, mientras que el aislado de la finca San José colonizó el 93% en la variedad Troyer y 100% en la variedad carrizo, en relación al aislado de la finca Marino el porcentaje de colonización fue de 93 % en el sistema radicular de los porta injerto Troyer y Carrizo (Figura 2). Las estructuras del hongo observadas al microscopio en cortes de raíces teñidos fueron hifas, arbuscúlos y vesículas (Figura 3).

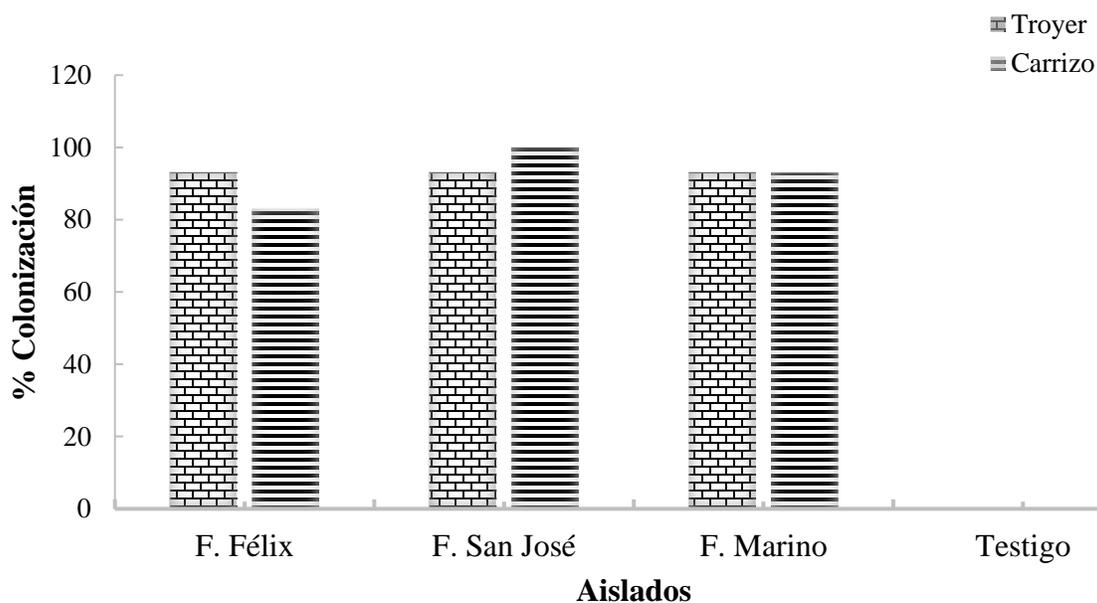


Figura 2. Porcentaje de colonización de *Glomus* sp, en porta injertos de las variedades Troyer y Carrizo.

En este estudio el porcentaje de colonización osciló entre el 93 al 100% para el porta injerto de la variedad Carrizo y del 83 a 93% para la variedad Troyer, según aislado por finca, a diferencia de Chávez *et al.*, (2000), se seleccionaron sustratos de crecimiento en micro plántulas de cítricos inoculadas con *Glomus* sp, afirma que obtuvieron resultados de porcentaje de colonización en raíces para la variedad carrizo de 47 a 80 % y en el caso de la variedad Troyer de 37 a 64%, según sustrato evaluados.

Mosse (1973), afirma que en suelos con fosfato adicional, la respuesta de crecimiento de las plantas con micorriza vesícula arbusculares, no siempre tiene una relación estricta entre la tasa de colonización y la repuesta de crecimiento de las plantas hospedantes.

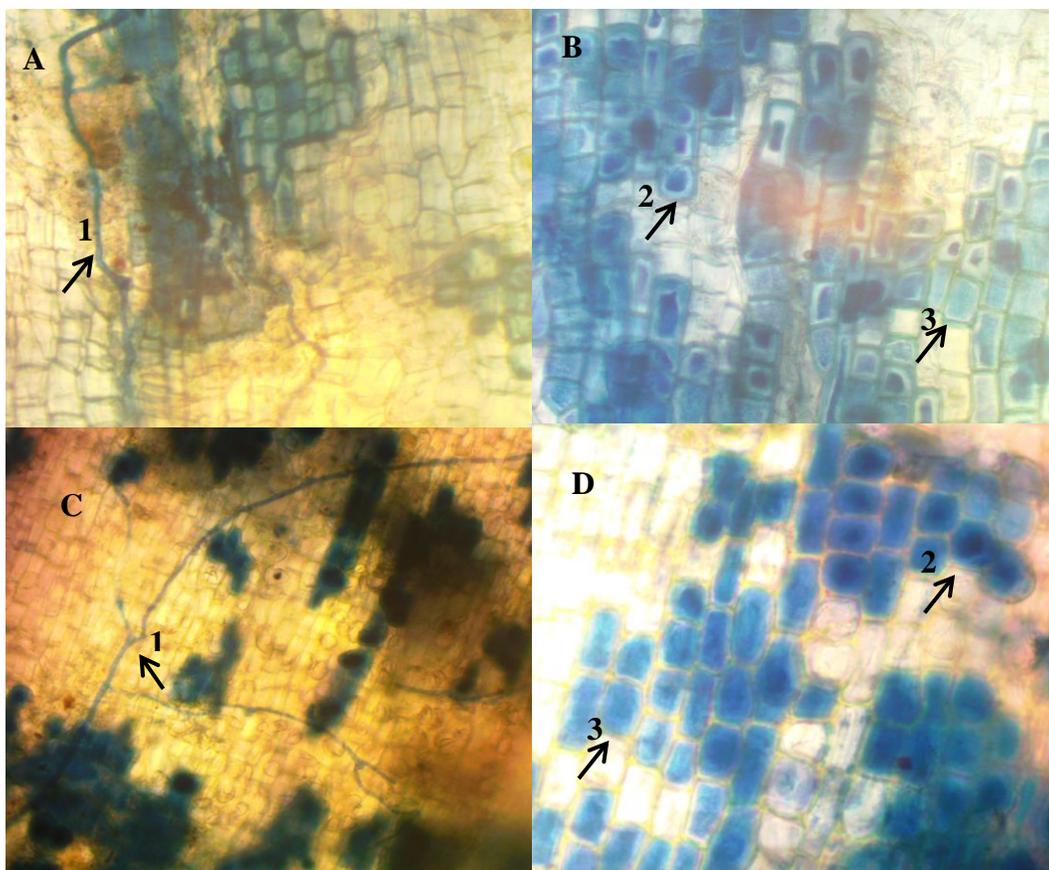


Figura 3. Raíces de porta injertos de la variedad Troyer (A y B) y Carrizo (C y D), colonizadas por el hongo del género *Glomus* sp. Hifas (1), Vesículas (2) y arbusculos (3).

Estudio realizado por Villafañe *et al.*, (1989), en porta injertos de limón rugoso (*Citrus jambhiri*) y mandarina cleopatra (*Citrus reshni*), inoculados con cepas de HMA, tales como, *Glomus manihotis*, *Acaulospora longula* y *Entrophospora colombiana*; en dos diferentes niveles de desinfección, obtuvieron resultados favorables con diferencias estadísticas significativas para las variables altura de planta, área foliar, materia seca y longitud de raíz.

Aravena (2013) evaluó diferentes cepas de HMA en porta injertos, *Citrus macrophylla*, *Citrange carrizo* y *Mexicola* (*Persea americana* Mill.), con tres dosis de fertilización. Los resultados obtenidos en los porcentajes de colonización en la variedad *Citrange carrizo* en el

estudio fue de 46,68%, mientras que para el porta injertos *Citrus macrophylla* con un 46.53% y para el *Mexicola* (*Persea americana* Mill) fue del 56.53% lo cual indica que, aunque estos datos sean bajos, obtuvieron una colonización adecuada, para esto recomienda aumentar el tiempo de evaluación para que se logren apreciar diferencias en el crecimiento de plantas, debido a que los primeros cambios del mutualismo se da a los 90 días. En este estudio el porcentaje de colonización fue adecuado considerando que el período de incubación fue corto hasta la evaluación de cuatro meses, donde lo más recomendado sería a los 6 meses..

5.3 Evaluación de variables morfológicas en porta injertos

La determinación del efecto de *Glomus* sp sobre los porta injertos fue evaluada con las variables morfológicas, altura de planta, número de hojas, diámetro de tallo y longitud de raíces y biomasa.

5.3.1 Determinación de altura de planta, número de hojas, diámetro de tallo y longitud de raíces

El análisis de varianza realizado a las variables altura de planta, número de hojas, diámetro de tallo y longitud de raíces, en porta injertos Troyer y Carrizo, mostró diferencias estadísticas significativas para los aislados de *Glomus* sp., inoculados (Anexo 5, 6).

El porta injerto Troyer presentó mayor altura de planta cuando fue inoculado con los aislados de la finca Félix, con (77.07cm) y finca San José con (75.13cm), el mejor promedio para número de hojas con 41.13 hojas lo obtuvo el aislado de la finca Félix presentando diferencias significativas en comparación con los otros aislados; mientras que el mayor promedio para diámetro de tallo fueron los aislados de la finca San José(7.07mm) y finca Félix (7.04mm), en longitud de raíz el mayor promedio fue para los aislados de la finca Félix (34.10 cm) y el testigo (33.05 cm) (Cuadro 2).

El porta injerto Carrizo inoculado con *Glomus* sp de la finca San José logró mayor altura de planta con un promedio de (34.93 cm) siendo estadísticamente diferente a los otros aislados, el aislado de la finca Félix alcanzó el mayor número de hojas, diámetro de tallo y longitud de raíz con promedios de (42.6, 4.95 mm) y (46.7 cm), respectivamente (Cuadro 3).

El porta injerto Troyer con aplicaciones del aislado de la finca San José favorece las características fisiológicas de la planta y propicia un mejor desarrollo a la vez logra mayor diámetro de tallo y longitud de raíces. En cambio, el porta injerto Carrizo con aplicaciones del aislado de la finca Félix aumenta el número de hojas, diámetro de tallo y longitud de raíces.

Cuadro 2. Análisis de variables fisiológicas según Tukey el porta injerto de la variedad Troyer inoculado con aislados de *Glomus* sp.

Aislados	Variables fisiológicas Troyer			
	Altura Planta (cm)	N°. Hojas	Diametro Tallo(mm)	Longitud. Raíz(cm)
F. Marino	67.33b	35.53c	6.69b	29.65b
F. San José	75.13a	39.33b	7.07a	34.10a
F. Félix	77.07a	41.13 ^a	7.04a	30.05b
Testigo	70.23b	35.93c	6.62b	33.05a
R ²	0.93	0.95	0.91	0.93
CV	4.29	3.51	2.60	7.45
p-valor	<0.00001	<0.00001	<0.00001	0.0003

* Medias con una letra común, entre columnas no son significativamente diferentes ($p > 0.05$), según Tukey ($\alpha=0.05$)

Cuadro 3. Análisis de variables fisiológicas según Tukey el porta injerto de la variedad Carrizo inoculado con aislados de *Glomus* sp.

Aislados	Variables fisiológicas Carrizo			
	Altura de Planta (cm)	N°. hojas	Diametro de Tallo(mm)	Longitud de Raíz(cm)
F. Marino	27.6c	23.73c	4.15b	43.4bc
F. San José	34.93a	27.33b	4.78a	46.5ab
F. Félix	30.23bc	42.63 ^a	4.95a	46.7a
Testigo	31.67b	23.47c	4.22b	42.0c
R ²	9.44	8.47	3.94	0.94
CV	0.89	0.96	0.97	5.96
p-valor	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0008

* Medias con una letra común, entre columnas no son significativamente diferentes ($p > 0.05$), según Tukey ($\alpha=0.05$)

En este estudio la altura de planta en los porta injertos Troyer y Carrizo manifestaron buenos resultados a los 90 días después de la inoculación con promedios de 67.33cm a 77.07 cm para Troyer y 27.6cm a 34.9 cm para el porta injerto Carrizo. Roldan (1985), afirma que los HMA naturalmente presentes en el suelo provocan una abundante colonización de las raíces de naranjo

(*Citrus sinensis*), y consecuentemente, una respuesta en estimulación del crecimiento y concentración de P (fósforo) en la hoja.

Caro *et al.*, (2018) realizaron su estudio en plantas de Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) y observaron que desde los 97 días después de la siembra hasta los 136 días después de la siembra (final del período vegetativo) se registraron valores de 1,84 m y 1,24 cm para altura y diámetro de planta, considerándose mayores numéricamente que otros tratamientos del estudio.

Medrano y Meléndez (2008), obtuvieron respuestas positivas en tres de los cuatro tratamientos inoculados con micorrizas versículos arbusculares, obteniendo diferencias estadísticas significativas en cuanto a la altura de planta de sandía (*Citrullus lanatus*), con promedios entre 3.22 y 4.24 cm, al comparar estas con el testigo de HMA, con promedios de 2.96 cm, afirmando que la aplicación de HMA incrementó de manera significativa la altura de las plantas de sandía de manera proporcional al incremento de HMA aplicada.

Chávez *et al.*, (2000) observó que al inocular cepas del género *Glomus* sp en porta injertos de C. Carrizo y C. Troyer, obtuvo menor respuesta a las variables estudiadas en comparación con el porta injerto de la variedad Troyer. Los incrementos de las variables estudiadas fueron observados a los 135 días después de la inoculación, además fueron estadísticamente significativo al compararlos con el testigo no inoculado. Los incrementos correspondieron a 284, 66, 134, 231, 292 y 94% en altura, diámetro de tallo, número de hojas, área foliar, peso seco de la parte aérea y volumen radical en Carrizo y de 815, 300, 512, 2297, 1760 y 566%, respectivamente, en Troyer. Los resultados indican la importancia de la inoculación en este tipo de planta (*Citrus limon*), es altamente dependiente de la simbiosis micorrízica para expresar un máximo desarrollo.

Según Villafañe (1989), los hongos micorrícicos (HM) incrementaron significativamente la altura de planta limón rugoso (*Citrus jambhiri*), y mandarina cleopatra (*Citrus reshni*), así como el área foliar; materia seca y longitud de la raíz de ambos porta injertos.

Alarcon, Gonzales y Ferrera (2003), argumentan que la inoculación con *Glomus* Zac-19 en plantas de *Citrus volkameriana* Tan & Pasq indujo incrementos significativos en altura, diámetro de tallo y materia seca total de las plantas. En el caso de la altura y el diámetro del

tallo, se estableció un sinergismo de la micorriza con las dosis de P (fósforo) aplicado, sobresaliendo las de 20 mg y 80 mg, respectivamente.

5.3.2 Determinación de biomasa

En el porta injerto carrizo, la finca san José con 41.63% logró el mayor porcentaje de materia seca aérea foliar, igual que finca marino con 40.22%, el menor porcentaje de materia seca aérea foliar lo obtuvo la finca Félix con 36.43% (Figura 4). El mayor porcentaje de materia seca de raíces lo obtuvo el testigo con 50.10% (Anexo 5). En relación al porta injerto Troyer no hay diferencias significativas, para el porcentaje de materia seca aérea ($P=0.1545$) y materia seca de raíz ($P=0.0716$), entre los aislados de cada finca y el testigo (Anexo 6).

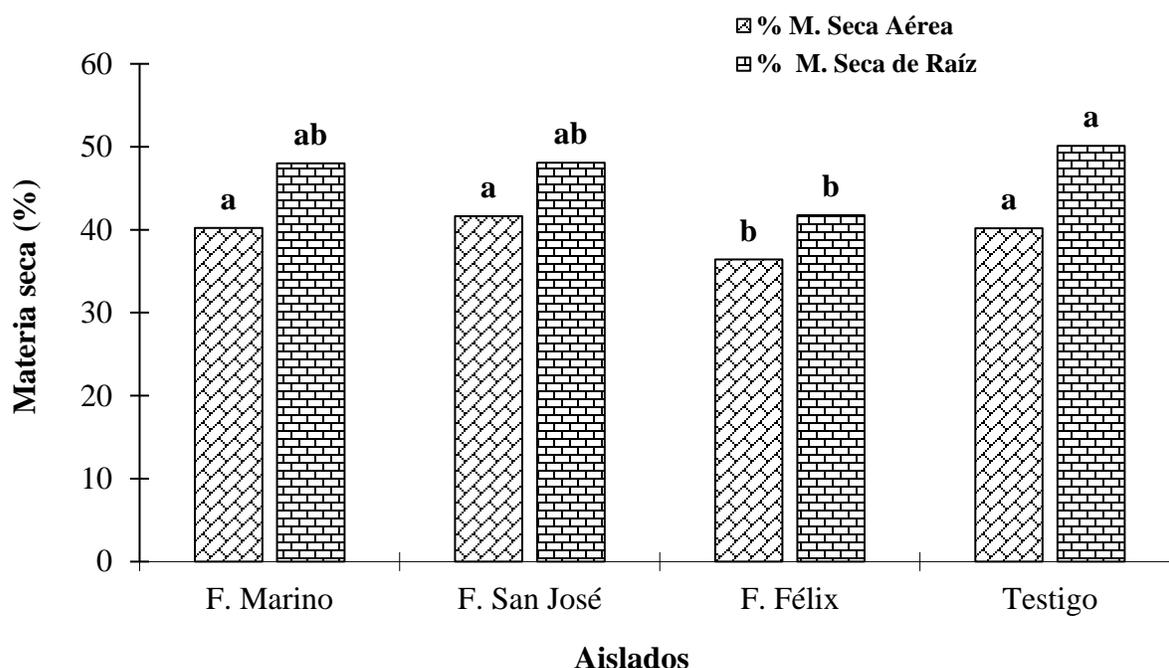


Figura 4. Porcentaje de materia seca en porta injertos Carrizo inoculados con *Glomus* sp.

La distribución de la materia seca es un proceso básico, la absorción de la luz por las plantas suple la energía para la asimilación del carbono, el crecimiento y desarrollo. Los niveles de fijación del CO₂, los productos de los procesos de la fotosíntesis primaria y los carbohidratos formados en el ciclo de Calvin son usados para la producción de biomasa (Pörs *et al.*, 2001).

Estudio realizado por Aravena (2013) en plantas de aguacate y dos especies de cítricos, reveló que los resultados obtenidos en cuanto al efecto de las micorrizas en aumento de promedio de materia seca aérea de aguacate fue producto de la fertilización, las cepas inoculadas y de la interacción entre ambas.

Según estudio de Alarcon *et al.*, (2003) a los 70 días de la inoculación con HMA produjo efectos significativos en el diámetro de la base del tallo y en la tasa de crecimiento acumulado del tallo de plantas de *Citrus volkameriana* Tan & Pasq. Sin embargo, las plantas inoculadas acumularon mayor materia seca (parte aérea, raíz y total) y área foliar.

Alarcón *et al.*, (2003), afirman que la existencia de simbiosis micorrízica favoreció una distribución uniforme del crecimiento de plantas de cítricos (*Citrus volkameriana* Tan & Pasq), tanto hacia la parte aérea, como hacia la raíz, es decir, que por cada gramo de materia seca producido por una planta inoculada, 500 mg se distribuyen tanto a la parte aérea, como al sistema radical; mientras que en plantas no inoculadas, el crecimiento se da en mayor proporción hacia la parte aérea, en especial cuando se tiene limitación por fósforo.

VI CONCLUSIONES

Los géneros de hongos micorrizas identificados fueron *Glomus*, *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Septoglomus*, *Scuthelospora*. El género que predominó fue *Glomus* con un 97 a un 99% en muestras de suelo de las fincas Marino, San José y Félix.

El porcentaje de colonización con el género *Glomus* sp, para el porta injerto Troyer fue de 83 a 93%, y para el porta injerto Carrizo fue de 93% a 100%.

El efecto de las micorrizas arbusculares sobre el desarrollo vegetativo del porta injerto Carrizo fue positivo para las variables número de hojas, diámetro de tallo y longitud de raíces con los aislado de la finca Félix, por su parte el porta injerto Troyer mostró mejores resultados con el aislado de la finca San José en las variables diámetro de tallo y longitud de raíz.

VII RECOMENDACIONES

Realizar estudios que determinen la dependencia de fósforo en plantas inoculadas con HMA.

Identificar mediante pruebas moleculares las especies de hongos micorrizas arbusculares y posteriormente determinar sus efectos en plantas de cítricos.

Realizar estudios de período de injertación en plantas inoculadas con HMA.

Realizar estudios con otros géneros de HMA en porta injertos de cítricos, tales como Volkameriano, Cleopatra, Flying dragon, entre otros.

VIII LITERATURA CITADA

- Agustí, M. 2000. Citricultura. Barcelona Ediciones mundi prensa. Barcelona. 416p
- Alamar, J. C. (2002). El injerto de cítricos en campo (I).
- Alarcón, A., del Carmen González-Chávez, M., y Ferrera-Cerrato, R. 2003. Crecimiento y fisiología de *Citrus volkameriana* Tan & Pasq en simbiosis con hongos micorrízicos arbusculares. *Terra Latinoamericana*, 21(4), 503-511.
- Alarcón, A., y Cerrato, R. F. 1999. Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas. *Terra Latinoamericana*, 17(3), 179-191.
- Alarcón, A., y Ferrera-Cerrato, R. 2003. Aplicación de fósforo e inoculación de hongos micorrízicos arbusculares en el crecimiento y estado nutricional de *Citrus volkameriana* Tan & Pasq. *Terra Latinoamericana*, 21(1), 91-99.
- Alvarado, A., Chavarría, M., Guerrero, R., Boniche, J., & Navarro, J. R. 2004. Características edáficas y presencia de micorrizas en plantaciones de teca (*Tectona grandis* Lf) en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 28(1), 89-100.
- Aravena Herrera, C.M., 2013. Efecto de la micorrización en plantas de vivero de palto y cítricos bajo diferentes dosis de fertilización. Trabajo de Graduación. Universidad Católica de Valparaíso, Chile.
- Ayres, A., and Bové, J. M. 2007. Etiology of three recent diseases of citrus in Sao Paulo State: sudden death, variegated chlorosis and Huanglongbing. *IUBMB Journals* (59): 346- 354. doi: <https://doi.org/10.1080/15216540701299326>.
- Camprubí, A., Calvet, C., y Estaún, V. 2000. Micorrizas arbusculares en producción agrícola. *Horticultura: Revista de industria, distribución y socio economía hortícola: frutas, hortalizas, flores, plantas, árboles ornamentales y viveros*, (144), 38-41.
- Caro, L. A. P., Zumaqué, L. E. O., & Violeth, J. L. B. 2018. Efecto de la micorrización y el lombriabono sobre el crecimiento y desarrollo del Sacha inchi *Plukenetia volubilis* L. *Temas agrarios*, 18-28.
- Chávez, M. G., Cerrato, R. F., Monter, A. V., & Oropeza, J. L. 2000. Selección de sustratos de crecimiento en micro plántulas de cítricos inoculadas con *Glomus* sp. Zac-19. *Terra latinoamericana*, 18(4), 0.
- Coronado Gómez, H. T. 2019. *Detección molecular de candidatus liberibacter sp (Huanglongbing) y Xylella fastidiosa en el cultivo de cítricos en el banco de germoplasma INTA-Masatepe* (Tesis de grado, Universidad Nacional Agraria).
- Davies, F.S. and L.G. Albrigo. 1994. Citrus. ISBN# 0-851988679. p. 41-43, 220-22
- EPPO, G. 2018. EPPO Global database. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO).
- Forner J.B. y Forner giner M.A. 2003. Comportamiento de los nuevos patrones en las diferentes zonas de cultivo y relación con la tolerancia a condiciones bióticas y abióticas XX jornadas Agrícolas El Monte Huelva 19-20 de Noviembre pp. 48-49.

- Gerdemann, J.W & Nicolson, T.H. 1963 Spores of Mycorrhizal Endogone Species Extracted from Soil by Wet Sieving and Decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, 46, 235-244. [http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536\(63\)80079-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536(63)80079-0).
- González Chávez, MCA. (1989). *Principios de taxonomía de la endomicorriza V-A*. Montecillo, MX. 27 p.
- Hernández Dorrego, A. 2003. Las micorrizas, (on line). www.terraia.com, 1999. Micorrización temprana de porta injertos de frutales como alternativa biotecnológica para el control de nemátodos. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. 187 pp.
- Hernández Dorrego, Adriana. 2000. Las micorrizas. *Terralia* 14, [12-18]. Ediciones Agro técnicas. Madrid. www.terraia.com.
- Hernández-Cuevas, L., Guadarrama-Chávez, P., Sánchez-Gallen, I., & Ramos-Zapata, J. (2008). Micorriza arbuscular. Colonización intraradical y extracción de esporas del suelo. *Técnicas de Estudio de las Asociaciones Micorrízicas y sus Implicaciones en la Restauración. Ciudad de México: Las prensas deficiencias UNAM*, 1-15.
- International culture collection (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungí. Claves taxonómicas <https://invam.wvu.edu/>
- Jackson, L. 1991. *Citrus growing in Florida*, 3rd Edition. University of Florida Press, Gainesville, Fla. p. 44–48.
- Jenkins, W.R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant. Disease*. 48: 692.
- Lacayo, L.N. 2013. Cítricos amenazados. Consultado 14 marzo 2019. *El nuevo diario*. Recuperado de: <http://www.elnuevodiario.com.ni/economia/288686-citricos-amenazados/>.
- López, J. A., & Cardona, J. H. 2007. Evaluación de portainjertos de cítricos en la zona central cafetera de Colombia.
- Luis, M., Peña, M., Collazo, C., Ramos, P., & Llauger, R. (2010). Enfermedades bacterianas y fungosas en viveros de cítricos: características y control. *FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, InterAmerican Citrus NETWORK, Grupo Empresarial Frutícola (GEF), Instituto de Fruticultura Tropical (IIFT). Viveros de cítricos en el contexto fitosanitario actual. 1ed. Havana, Cuba: IIFT*, 101-126.
- Medrano Lacayo, I., & Meléndez Flores, M. 2008. *Evaluación de efecto de diferentes dosis de micorrizas vesiculo arbuscular (MVA) sobre patógenos de suelo y desarrollo fenológico del cultivo de Sandía, (Citrullus lanatus), en el Campus Agropecuario, UNAN-León, durante el ciclo agrícola 2008* (Tesis Doctoral).
- Monselise, S.P., Goren, R., Costo., J., & Simkhi. M 1981. Development of lemon fruits originating at different blossom dates around the year. *Scientia Horticulturae* 15(1), 23-32.
- Moore, G.A. 2001. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. *Trends in Genetics* 17:536–540.

- Morton, J.F. 1987. Fruits of warm climates. J.F. Morton Publisher. ISBN# 0-9610184-1-0. p.160–168.
- Mosse, B. 1973. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist*, 72(1), 127-136.
- Organismo internacional regional de sanidad agropecuaria (OIRSA). 2019. Vivero de cítrico en Nicaragua. Flying dragón Consultado: 20 de mayo de 2019 <https://sites.google.com/view/vivero-citricos-nicaragua/patrones/flying-dragon>
- Organismo internacional regional de sanidad agropecuaria (OIRSA). 2019. Vivero de cítrico en Nicaragua. Carrizo. Consultado: 20 de mayo de 2019 <https://sites.google.com/view/vivero-citricos-nicaragua/patrones/carrizo>
- Phillips, J. M., & Hayman, D. S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British mycological Society*, 55(1), 158-161.
- Pörs, Y., Hansen, U., & Hoffmann, P. 2001. Compensation of differences in light absorption at the levels of photosynthetic primary processes, CO₂ uptake and growth of tobacco plants. *Journal of plant physiology*, 158(12), 1555-1564.
- Prieto-Benavides, O. O., Belezaca-Pinargote, C. E., Mora-Silva, W. F., Garcés-Fiallos, F. R., Sabando-Ávila, F. A., & Cedeño-Loja, P. E. 2012. Identificación de hongos micorrízicos arbusculares en Sistemas Agroforestales con cacao en el Trópico Húmedo Ecuatoriano. *Agromía mesoamericana*, 23(2), 233-239.
- Roldán Fajardo, B. E. 1985. Micorrizas VA en cultivos arbóreos: almendro, naranjo y olivo.
- Sieverding, E., Friedrichsen, J., & Suden, w. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. sonderpublikation der gtz (germany).
- Tucker, D. P. H. y Wardowski, W. F. 1973. The florida citrus industry's commitment to a better environment. *Journal of Environmental Quality*, 2(1), 70-74.
- Vásquez A, H. 2013. Evaluación de (poncirus trifoliata) var. monstruosa flying dragon como portainjerto enanizante para naranja y mandarina comparado con otros patrones. Trabajo de graduación. Universidad nacional de Colombia.
- Vega Miranda, M. V. 2012. Identificación de micorrizas vesiculo-arbusculares en especies agrícolas y forestales en la zona de Tingo María.
- Vílchez, L. O. (Ed.). 2002. *Inventarios forestales para bosques latifoliados en América Central* (No. 50) P 207. CATIE.
- Villafañe, V. E., Muñoz F., J. E., & Torres, H. R. 1989. Floración, crecimiento y maduración de la naranja valle Washington, citrus sinensis Osbek. *Acta Agronómica*, 39(3-4), 142-149. Recuperado de https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/15424

IX ANEXOS

Anexo 1. Colecta de muestras en arboles de fincas productoras de cítricos en las comunidades de estudio



Anexo 2. Separación de micorrizas a partir de muestras de suelo



Anexo 3. Establecimiento del ensayo en invernadero HLB-OIRSA



Anexo 4. Programa de fertilización invernadero HLB-OIRSA

PROGRAMA DE FERTILIZACION INVERNADERO HLB-OIRSA														
Productos	Días													
	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre		
Fertilizantes Foliar														
Plasma Vegetal	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	cada 15 días
Basfoliar Algae	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	Cada 2 meses
Foltron XL	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	cada 15 días
Fertilizantes Edáficos														
Haifa Multi combi (EM)	A		A		A		A		A		A		A	Cada 2 meses
Nitrato de Potasio (13-0-46)		A		A		A		A		A		A		Cada 2 meses
Ply- Feed (19-19-19+E.M)	A		A		A		A		A		A		A	Cada 2 meses
Triple 15-15-15		A		A		A		A		A		A		Cada 2 meses
Urea al 46 %		A		A		A		A		A		A		
Completo 18-46-0	A	A	A	A										Primeros 4 mese:
Observaciones														
una vez al mes cada 15 días														
una vez cada 2 meses														
una vez al mes cada 15 días														
aplicación al drench, 2 kg en 200 litros de agua, aplico 100 m por p														
aplicación al drench, 2 kg en 200 litros de agua, aplico 100 m por p														
aplicación al drench, 2 kg en 200 litros de agua, aplico 100 m por p														
aplicación al drench para el desarrollo y crecimiento de las														
plantas, 100 ml por planta/ 5lb de cada producto en 200litros de														
aplicación al drench para el desarrollo del sistema radicular, 100 ml por planta/ 5lb en 200litros de agua.														

Anexo 5. Análisis de varianza de variables fisiológicas en porta injertos de la variedad carrizo

Altura de plantas

Variable N R² R² Aj CV

A. planta 60 0.89 0.84 9.44

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	2829.73	17	166.45	19.32	<0.0001
Tratamiento	420.25	3	140.08	16.26	<0.0001
Repetición	2409.48	14	172.11	19.98	<0.0001
Error	361.82	42	8.61		

Total 3191.55 59

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=2.86686

Error: 8.6147 gl: 42

Tratamiento Medias n E.E.

F. San José	34.93	15	0.76	A
Testigo	31.67	15	0.76	B
F. Félix	30.23	15	0.76	B C
F. Marino	27.60	15	0.76	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Numero de hojas

Variable N R² R² Aj CV

No. hojas 60 0.96 0.94 8.47

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	5700.00	17	335.29	54.45	<0.0001
Tratamiento	3699.91	3	1233.30	200.27	<0.0001
Repetición	2000.08	14	142.86	23.20	<0.0001
Error	258.65	42	6.16		

Total 5958.65 59

_Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=2.42392

Error: 6.1583 gl: 42

<u>Tratamiento</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
F. Félix	42.63	15	0.64	A
F. San José	27.33	15	0.64	B
F. Marino	23.73	15	0.64	C
Testigo	23.47	15	0.64	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Diámetro de Tallo

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
D. Tallo	60	0.97	0.95	3.94

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	37.92	17	2.23	70.12	<0.0001
Tratamiento	7.10	3	2.37	74.36	<0.0001
Repetición	30.82	14	2.20	69.20	<0.0001
Error	1.34	42	0.03		
Total	39.25	59			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.17421

Error: 0.0318 gl: 42

<u>Tratamiento</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>	
F. Félix	4.95	15	0.05	A
F. San José	4.78	15	0.05	A
Testigo	4.22	15	0.05	B
F. Marino	4.15	15	0.05	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Longitud de raíces

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
L. Raíz-Carrizo	40	0.94	0.91	5.96

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	3045.70	12	253.81	35.80	<0.0001
Tratamiento	162.10	3	54.03	7.62	0.0008
Repetición	2883.60	9	320.40	45.20	<0.0001
Error	191.40	27	7.09		
Total	3237.10	39			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=3.25844*Error: 7.0889 gl: 27*Tratamiento Medias n E.E.

F. Félix	46.70	10	0.84	A
F. San José	46.50	10	0.84	A B
F. Marino	43.40	10	0.84	B C
Testigo	42.00	10	0.84	C

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)***Porcentaje de materia seca aérea**

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
%MS-Aéreo-Carrizo	36	0.62	0.44	4.98

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	150.67	11	13.70	3.52	0.0048
Finca	133.94	3	44.65	11.48	0.0001
Repetición	16.73	8	2.09	0.54	0.8164
Error	93.32	24	3.89		
Total	243.99	35			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=2.56430*Error: 3.8884 gl: 24*Finca Media n E.E.

San José	41.63	9	0.66	A
Marino	40.22	9	0.66	A
Testigo	40.18	9	0.66	A
Félix	36.43	9	0.66	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)***Porcentaje de materia seca en raíces**

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
%MS-Raíz-Carrizo	32	0.49	0.24	10.67

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	500.68	10	50.07	1.99	0.0881
Finca	314.82	3	104.94	4.18	0.0182
Repetición	185.86	7	26.55	1.06	0.4239
Error	527.66	21	25.13		
Total	1028.34	31			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=6.98595*Error: 25.1266 gl: 21*

<u>Finca</u>	<u>Media</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>
Testigo	50.10	8	1.77 A
San José	48.08	8	1.77 A B
Marino	48.01	8	1.77 A B
Félix	41.75	8	1.77 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 6. Análisis de varianza de variables fisiológicas en porta injerto de la variedad Troyer

Altura de plantas

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
A. planta	60	0.93	0.90	4.29

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	5103.47	17	300.20	31.05	<0.0001
Tratamiento	894.11	3	298.04	30.83	<0.0001
Repetición	4209.36	14	300.67	31.10	<0.0001
Error	406.08	42	9.67		
Total	5509.55	59			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=3.03714*Error: 9.6685 gl: 42*

<u>Tratamiento</u>	<u>Medias</u>	<u>n</u>	<u>E.E.</u>
F. Félix	77.07	15	0.80 A
F. San José	75.13	15	0.80 A
Testigo	70.23	15	0.80 B
F. Marino	67.33	15	0.80 B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)***Número de hojas**

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
Nº. hojas	60	0.95	0.93	3.51

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	1370.48	17	80.62	45.45	<0.0001
Tratamiento	329.25	3	109.75	61.87	<0.0001
Repetición	1041.23	14	74.37	41.93	<0.0001
Error	74.50	42	1.77		
Total	1444.98	59			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.30089*Error: 1.7738 gl: 42*Tratamiento Medias n E.E.

F. Félix	41.13	15	0.34	A
F. San José	39.33	15	0.34	B
Testigo	35.93	15	0.34	C
F. Marino	35.53	15	0.34	C

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)***Diámetros de Tallos**

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
D. Tallo	60	0.91	0.88	2.60

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	13.68	17	0.80	25.37	<0.0001
Tratamiento	2.41	3	0.80	25.29	<0.0001
Repetición	11.27	14	0.81	25.39	<0.0001
Error	1.33	42	0.03		
<u>Total</u>	<u>15.01</u>	<u>59</u>			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.17392*Error: 0.0317 gl: 42*Tratamiento Medias n E.E.

F. San José	7.07	15	0.05	A
F. Félix	7.04	15	0.05	A
F. Marino	6.69	15	0.05	B
Testigo	6.62	15	0.05	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)***Longitud de raíces**

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
L. Raíz-Troyer	40	0.93	0.91	7.45

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	2169.58	12	180.80	32.36	<0.0001
Tratamiento	145.07	3	48.36	8.65	0.0003
Repetición	2024.51	9	224.95	40.26	<0.0001
Error	150.87	27	5.59		
<u>Total</u>	<u>2320.44</u>	<u>39</u>			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=2.89293*Error: 5.5877 gl: 27*Tratamiento Medias n E.E.

F. San José	34.10	10	0.75	A
Testigo	33.05	10	0.75	A
F. Félix	30.05	10	0.75	B
F. Marino	29.65	10	0.75	B

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)***Porcentaje de materia seca de raíces**

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
%MS-Raíz- Troyer	36	0.68	0.53	6.39

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	353.99	11	32.18	4.57	0.0009
Finca	56.08	3	18.69	2.65	0.0716
Repetición	297.91	8	37.24	5.28	0.0007
Error	169.12	24	7.05		
Total	523.11	35			

Porcentaje de materia seca aérea

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R² Aj</u>	<u>CV</u>
%MS-Aéreo-Troyer	36	0.38	0.10	6.12

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	87.81	11	7.98	1.35	0.2579
Finca	33.90	3	11.30	1.91	0.1545
Repetición	53.91	8	6.74	1.14	0.3733
Error	141.80	24	5.91		
Total	229.61	35			