



“Por un Desarrollo
Agrario
Integral y Sostenible”

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

Trabajo de Tesis

**Uso eficiente del Nitrógeno en el patrón
Citrange Carrizo bajo aplicación de ^{15}N y
asociado con microorganismos de la rizósfera
en condición de vivero, 2019-2020**

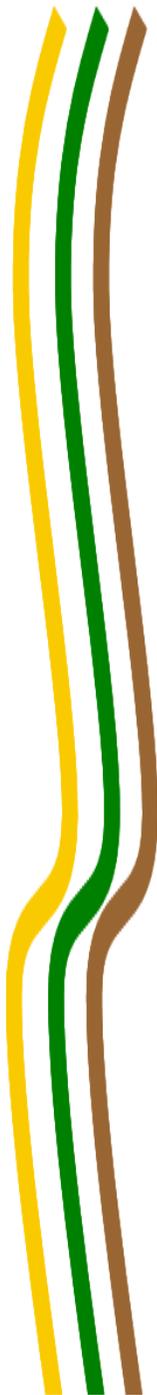
Autores

**Br. Beyner Omar Acevedo Acuña
Br. Jeyson René Lira Castellón**

Asesores

**M.Sc. Rodolfo de Jesús Munguía Hernández
M.Sc. Leonardo García Centeno
M.Sc. Martha Gutiérrez Castillo
Dr. José Antonio Vera**

**Managua, Nicaragua
Agosto 2021**





“Por un Desarrollo
Agrario
Integral y Sostenible”

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

Trabajo de Tesis

Uso eficiente del Nitrógeno en el patrón
Citrange Carrizo bajo aplicación de ^{15}N y
asociado con microorganismos de la rizósfera
en condición de vivero, 2019-2020

Autores

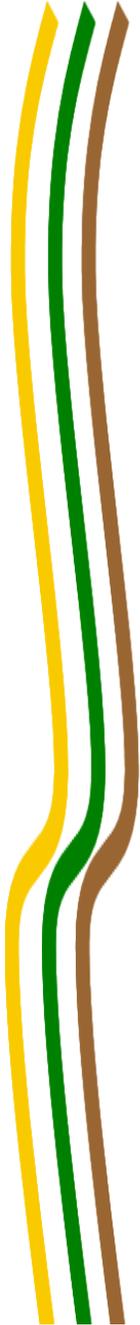
Br. Beyner Omar Acevedo Acuña
Br. Jeyson René Lira Castellón

Asesores

MSc. Rodolfo de Jesús Munguía Hernández
MSc. Leonardo García Centeno
MSc. Martha Gutiérrez Castillo
Dr. José Antonio Vera

Presentado a la consideración del honorable tribunal
examinador como requisito final para optar al grado
de Ingeniero Agrónomo

Managua, Nicaragua
Agosto 2021



Hoja de aprobación del Comité Evaluador

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

Ingeniero Agrónomo

Miembros del Honorable Comité Evaluador

Dr. Víctor Aguilar Bustamante
Presidente

Ing. José Rene Jarquín
Secretario

Ing. Luis Ruiz Obando
Vocal

Lugar y Fecha

Managua, Nicaragua 19 de agosto del 2021

INDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE CUADROS	iv
INDICE DE FIGURAS	v
INDICE DE ANEXOS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos específicos	3
III. MARCO DE REFERENCIA	4
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	10
4.1. Ubicación del área de estudio	10
4.2. Diseño metodológico	10
4.2.1. Descripción de los factores de estudio	11
4.2.2. Aplicaciones de los microorganismos	13
4.2.3. Variables evaluadas	13
4.2.4. Recolección de datos	14
4.2.5. Análisis de los datos	15
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
5.1. Influencia de la aplicación de ¹⁵ N y microorganismos en el crecimiento vegetativo	16
5.1.1. Altura de planta (cm)	16
5.1.2. Diámetro del tallo (mm)	18
5.1.3. Número de hojas por planta	20
5.2. Influencia de la aplicación de ¹⁵ N y microorganismos en la producción de biomasa y contenido de clorofila	22
5.2.1. Biomasa seca por planta (g)	22
5.2.2. Contenido relativo de clorofila	24

5.3. Eficiencia de la absorción de Nitrógeno influenciado por la aplicación de ^{15}N y asociados a los microorganismos de la rizósfera	26
5.3.1. Respuesta de ^{15}N aplicado a los 0 días después del trasplante	27
5.3.2. Respuesta de ^{15}N aplicado a los 30 días después del trasplante	29
5.3.3. Respuesta de ^{15}N aplicado a los 60 días después del trasplante	32
5.3.4. Respuesta de ^{15}N aplicado a los 90 días después del trasplante	35
VI. CONCLUSIONES	39
VII. RECOMENDACIONES	40
VIII. LITERATURA CITADA	41
IX. ANEXOS	47

DEDICATORIA

Dedico el esfuerzo y realización del trabajo de investigación a Dios padre celestial quien me ha dado la vida, su amor, sabiduría e inteligencia y por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida y por qué supo guiarme por el buen camino.

A mis padres Alba Martínez y Almer Carrasco y mis hermanitos Almer Acevedo, Lauren Acevedo y Yomar Acevedo por su apoyo incondicional durante toda mi vida, consejos, amor comprensión, por motivarme a levantarme y seguir luchando aun en los momentos que me sentía derrotado y por brindarme los recursos necesarios para hacer posible este logro.

A mi tío Ariel Acevedo (q.e.p.d), por haberme inculcado valores, principios, perseverancia y carácter para conseguir mis objetivos.

A mi familia y amigos por estar siempre presentes y por brindarme su incondicional apoyo, el cual fue fundamental en mi formación profesional.

A cada uno de los profesores, que aportaron sus conocimientos para poder consolidar mi aprendizaje y lograr mi formación como profesional, les agradezco de todo corazón por sus valiosas enseñanzas.

A mi amigo hermano y compañero de tesis Br. Jeyson Rene Lira Castellón por su apoyo incondicional en todo el trayecto de esta investigación.

A mis compañeros y colegas que durante nuestra carrera universitaria compartimos momentos inolvidables.

Br. Beyner Omar Acevedo Acuña

DEDICATORIA

Al concluir con una de las metas propuestas he decidido dedicarles este trabajo a todas aquellas personas que de una u otra manera me han ayudado a lograrla; lo cual un día era un simple sueño y hoy lo es realidad.

Primeramente, a Dios padre por darme la salud, sabiduría y entendimiento para poder seguir adelante a lo largo de mi vida y llegar hasta esta etapa, doy gracias por darme una familia maravillosa, y permitirme estar al lado de ellos.

A mis queridos padres Ing. René Alberto Lira Lovo y Prof. Elida Del Rosario Castellón Tinoco por educarme con buenos valores, lo cual ha sido muy útil en mi vida, quienes, con sus esfuerzos a diario, consejos, motivaciones, comprensión, con amor de padres, me han apoyado en todo momento de mi vida, y me han guiado a ser una persona de bien.

A mis hermanitos Rony Alberto Lira C y Seydi Nazaret Lira C por ser especiales en mi vida y estar siempre pendientes.

A toda mi familia por brindarme todo el apoyo incondicional, a mis abuelitos queridos Pio De los Ángeles Lira, Justo Martin Castellón y mis abuelitas Casta Lidia Lovo, Carmen Del Socorro Tinoco, mis tías y tíos, en especial Rosa María Castellón y Jorge Luis Lira Lovo, a primos en especial a Jorge Luis Lira Hernández.

A, Ana Suyapa Acevedo por ser una persona muy especial en mi vida que siempre estuvo al pendiente, aconsejándome y apoyándome incondicionalmente, por todo su cariño brindado en esta etapa de nuestras vidas, por sus deseos de superación para mí, lo cual me motivaron a seguir adelante y dar este gran pasó.

A mi amigo, hermano y compañero de tesis Br. Beyner Omar Acevedo por su apoyo incondicional y comprensión en todo el trayecto de esta investigación.

A todos mis compañeros que durante toda la carrera universitaria compartimos momentos inolvidables. En especial al Ing. José René Jarquín por su apoyo incondicional.

Br. Jeyson René Lira Castellón

AGRADECIMIENTOS

A Dios, nuestro señor padre celestial por brindarnos su amor, la vida, la salud y el tiempo para culminar este trabajo y alcanzar una de nuestras metas.

A nuestros asesores:

A nuestro buen amigo M.Sc. Rodolfo de Jesús Munguía, por todas sus enseñanzas y orientaciones que nos brindó y sobre todo por dedicar su valioso tiempo durante la realización de este trabajo.

Al M.Sc. Leonardo García por su valiosa ayuda, conocimientos brindados y por su disposición para la elaboración de este escrito.

A la M.Sc. Martha Gutiérrez, por sus aportes para el enriquecimiento de este trabajo.

Al Dr. José Antonio Vera, por ser parte de nuestra investigación.

A la Universidad Nacional Agraria (UNA), Facultad de Agronomía (FAGRO) y a todos los docentes de la facultad por habernos formado en el ámbito profesional.

Al Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) por la realización de los análisis del Nitrógeno.

Al Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA), por acceder a la realización del estudio y cooperación con las plantas cítricas.

Al Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CNIA), por brindar los microorganismos.

A todas las personas que de una u otra manera contribuyeron con este trabajo investigativo.

Br. Beyner Omar Acevedo Acuña

Br. Jeyson Rene Lira Castellón

INDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Fraccionamiento del ^{14}N y ^{15}N	11
2. Niveles de fraccionamiento en la aplicación del ^{15}N a base de urea y la interacción de los microorganismos de la rizósfera	12
3. Resultados de la aplicación de ^{15}N a los 0 ddt del patrón Citrange carrizo en la respuesta de Nitrógeno total (Nt), Nitrógeno derivado del fertilizante (Nddf) y Uso eficiente del Nitrógeno (UEN) en las mediciones realizadas a los 30, 90 y 120 ddt	28
4. Efecto individual de los microorganismos de la rizósfera en la aplicación de ^{15}N a los 0 ddt del patrón Citrange carrizo en la respuesta de Nitrógeno total (Nt), Nitrógeno derivado del fertilizante (Nddf) y Uso eficiente del Nitrógeno (UEN) medidos a los 30 ddt	29
5. Resultados de la aplicación de ^{15}N a los 30 ddt del patrón Citrange carrizo en la respuesta de Nitrógeno total (Nt), Nitrógeno derivado del fertilizante (Nddf) y Uso eficiente del Nitrógeno (UEN) en las mediciones realizadas a los 90 y 120 ddt	31
6. Efecto individual de los microorganismos de la rizósfera en la aplicación de ^{15}N a los 30 ddt del patrón Citrange carrizo en la respuesta de Nitrógeno total (Nt), Nitrógeno derivado del fertilizante (Nddf) y Uso eficiente del Nitrógeno (UEN) medidos a los 90 ddt	31
7. Resultados de la aplicación de ^{15}N a los 60 ddt del patrón Citrange carrizo en la respuesta de Nitrógeno total (Nt), Nitrógeno derivado del fertilizante (Nddf) y Uso eficiente del Nitrógeno (UEN) en las mediciones realizadas a los 90 y 120 ddt	34
8. Efecto individual de los microorganismos de la rizósfera en la aplicación de ^{15}N a los 60 ddt del patrón Citrange carrizo en la respuesta de Nitrógeno total (Nt), Nitrógeno derivado del fertilizante (Nddf) y Uso eficiente del Nitrógeno (UEN) medidos a los 90 ddt	34
9. Resultados de la aplicación de ^{15}N a los 90 ddt del patrón Citrange carrizo en la respuesta de Nitrógeno total (Nt), Nitrógeno derivado del fertilizante (Nddf) y Uso eficiente del Nitrógeno (UEN) en la medición realizada a los 120 ddt	36
10. Efecto individual de los microorganismos de la rizósfera en la aplicación de ^{15}N a los 90 ddt del patrón Citrange carrizo en la respuesta de Nitrógeno total (Nt), Nitrógeno derivado del fertilizante (Nddf) y Uso eficiente del Nitrógeno (UEN) medidos a los 120 ddt	37
11. Resultados de Nitrógeno total (Nt), Nitrógeno derivado del fertilizante (Nddf) y Uso eficiente del Nitrógeno (UEN) por microorganismos inoculados según momentos de aplicación y evaluados a los 30 días posteriores	38

INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1.	Ubicación geográfica de la finca El Plantel, Masaya.	10
2.	Comportamiento de altura (cm) de planta a efectos de los microorganismos inoculados al momento del trasplante en cada aplicación de ^{15}N en etapa de vivero del patrón Citrange carrizo.	17
3.	Comportamiento de diámetro del tallo (mm) de planta a efectos de los microorganismos inoculados al momento del trasplante en cada aplicación de ^{15}N en etapa de vivero del patrón Citrange carrizo.	19
4.	Comportamiento de número de hojas por planta a efectos de los microorganismos inoculados al momento del trasplante en cada aplicación de ^{15}N en etapa de vivero del patrón Citrange carrizo.	21
5.	Comportamiento del peso seco (g) de planta a efectos de los microorganismos inoculados al momento del trasplante en cada aplicación de ^{15}N en etapa de vivero del patrón Citrange carrizo.	23
6.	Comportamiento del contenido relativo de clorofila a efectos de los microorganismos inoculados al momento del trasplante en cada aplicación de ^{15}N en etapa de vivero del patrón Citrange carrizo.	25

INDICE DE ANEXOS

ANEXO		PÁGINA
1.	Significancia estadística de altura del patrón (cm) según los momentos de aplicación del ^{15}N con los tratamientos evaluados.	46
2.	Significancia estadística de diámetro del tallo (mm) según los momentos de aplicación del ^{15}N con los tratamientos evaluados.	47
3.	Significancia estadística de número de hojas por planta según los momentos de aplicación del ^{15}N con los tratamientos evaluados.	48
4.	Significancia estadística del contenido de Clorofila según los momentos de aplicación del ^{15}N con los tratamientos evaluados.	49
5.	Momentos de aplicación de ^{15}N solo o asociado con microorganismos de la rizósfera en el patrón Citrange carrizo.	50

RESUMEN

La presente investigación se realizó en el invernadero de reproducción de árboles de diferentes especies de cítricos a cargo de OIRSA, ubicado en áreas de la finca El Plantel, propiedad de la Universidad Nacional Agraria, carretera Tipitapa – Masaya km 32. La investigación versó en determinar el uso eficiente del Nitrógeno del patrón Citrange Carrizo, su respuesta en el crecimiento vegetativo a la aplicación del isótopo ^{15}N solo o en interacción con microorganismos presentes en la rizósfera de la planta. El ^{15}N se aplicó de manera fraccionada en cuatro momentos (0, 30, 60 y 90 ddt), mientras que los microorganismos se incorporaron en el sustrato al momento del trasplante. El diseño utilizado fue un arreglo bifactorial en DCA, que consistió de 4x4 equivalente a un total de 16 tratamientos con 7 plantas cada una para un total de 112 unidades experimentales. Las variables evaluadas fueron: Altura de plantas (cm), diámetro del tallo (mm), número de hojas por planta, peso seco de plantas (g), contenido de clorofila y el Uso Eficiente del Nitrógeno (UEN). Estos datos fueron procesados utilizando el software estadístico SAS 9.1, aplicando el ANDEVA y la prueba de rangos múltiples de Duncan ($P \leq 0.05$). Para las variables de crecimiento vegetativo el resultado de la utilización de los tres microorganismos asociados presenta un aporte positivo diferenciado en comparación con el tratamiento Control. En la variable peso seco de la planta, mostró que el tratamiento *Trichoderma* sola obtuvo mayor peso seco a partir de la aplicación 30 y 60 ddt ^{15}N , y asociada *Trichoderma* más *Micorriza* en la aplicación 90 ddt ^{15}N . El análisis de los valores SPAD muestran el mayor contenido de clorofila en la aplicación 90 ddt ^{15}N en los tratamientos. De acuerdo con la información obtenida en el UEN en patrón Carrizo fue muy bajo.

Palabras claves: Microorganismos, rizósfera, isótopo ^{15}N , eficiencia, trasplante

ABSTRACT

The present research was carried out in the greenhouse of reproduction of trees of different species of citrus fruits in charge of the OIRSA, located in the areas of the farm El Plantel, property of the Universidad Nacional Agraria, road Tipitapa – Masaya km 32. The research was based on determining the efficient use of Nitrogen of the Carrizo patterns response in vegetative growth to the application of the isotope ^{15}N alone or in interaction with microorganisms present in the rhizosphere of the plant. The ^{15}N was applied in a fractional way in four moments (0, 30, 60 and 90 ddt), while the microorganisms were incorporated into the substrate at the time of transplantation. The design used was a bifactorial arrangement in DCA, which consisted of 4x4 equivalent to a total of 16 treatments with 7 plants each for a total of 112 experimental units. The variables evaluated were: Plant height (cm), stem diameter (mm), number of leaves per plant, dry weight of plants (g), chlorophyll content and Efficient Use of Nitrogen (UEN). These data were processed using SAS 9.1 statistical software, applying ANOVA and Duncan's multiple range test ($P \leq 0.05$). For the vegetative growth variables, the result of the use of the three associated microorganisms presents a differentiated positive contribution compared to the Control treatment. In the variable dry weight of the plant, it showed that the Treatment *Trichoderma* alone obtained higher dry weight from the application 30 and 60 ddt ^{15}N , and associated the *Trichoderma* plus *Mycorrhiza* in the application 90 ddt ^{15}N . The analysis of the SPAD values show the highest chlorophyll content in the application 90 ddt ^{15}N in the treatments. According to the information obtained in the UEN in Carrizo pattern was very low.

Keywords: Microorganisms, rhizosphere, ^{15}N isotope, efficiency, transplant

I. INTRODUCCIÓN

Los frutos de los cítricos, para el ser humano son importantes para el consumo diario, aportan vitaminas, tienen bajo contenido de calorías, minerales, además de ello, se obtienen productos industriales a escala comercial como: medicinas, jugos, mermeladas, yogurt, aceites esenciales, entre otros.

En Nicaragua, la producción de cítricos es una alternativa alimentaria que enriquece la dieta de la familia, también tienen una función ambiental, social y económica, Lacayo (2013) afirma que:

La producción de cítricos en Nicaragua genera unos 24.5 millones de dólares anuales, participan unos 11,077 productores, en una superficie aproximada de 21,100 ha. El cultivo de naranja dulce ocupa el 80 % de la producción total de cítricos, mientras que el 10 % corresponde a las mandarinas, 7 % a limones y el 3 % a otros productos (párr. 5).

El uso de portainjertos es una estrategia que mejora la calidad y rendimiento de los cultivos debido a que son tolerantes a ciertas adversidades, según Fernandez y Nuñez (2003):

El patrón Citrange Carrizo presenta muchas similitudes al Troyer debido a su procedencia genética morfológica y en cuanto a sus requerimientos de suelo. Por lo tanto, su comportamiento agronómico presenta ventajas por ser más tolerante a enfermedades como el Virus Tristeza de los Cítricos (CTV), Psorosis y Cachexia / Xiloporosis y permite una mayor productividad, ya que es sensible para Exocortis y Nematodos (p. 12).

Entre los diferentes elementos nutritivos de los vegetales, el Nitrógeno es el elemento que todas las plantas requieren para su crecimiento y desarrollo, una de las grandes ironías de la naturaleza es que la mayoría de los seres vivos (plantas y animales) son incapaces de fijar Nitrógeno, el cual conforma el 80 % de la atmósfera para sus procesos bioquímicos vitales. Las plantas son capaces de utilizarlo en forma de nitrato o amonio, estos compuestos están presentes en el suelo en cantidades limitadas, se pierden fácilmente por lavado en los suelos y por la reducción biológica de nitratos (Llovera, 1999).

“Para que el N_2 pueda ser asimilado, es necesario que sea reducido, los únicos seres vivos capaz de realizar esta reacción son las Eubacteria y Archea, por el proceso denominado fijación biológica de Nitrógeno (FBN)” (Baca *et al.*, 2000, p. 43).

El manejo de la fertilización nitrogenada aporta el elemento esencial para el desarrollo y crecimiento de las plantas que pueden ayudar a mejorar los rendimientos, Gonzales (2012), expresa que “por ello, se requieren métodos que evalúen la eficiencia del uso de Nitrógeno y su potencial de incrementar la producción en estos sistemas. El uso de técnicas isotópicas con elementos modificados en su composición nuclear como es el caso del ^{15}N ” (p. 2).

Otro componente del manejo de la nutrición vegetal para el crecimiento y desarrollo de las plantas está influenciado por la actividad microbiana del suelo, la que ayuda a mejorar la disponibilidad de agua y de nutrientes, a medida que las plantas crecen en el suelo, liberan aminoácidos, azúcares y ácidos orgánicos que suministran alimento a los microbios, por tanto los microorganismos proporcionan nutrientes en las formas disponibles y otros beneficios a las plantas, toda esta actividad hace de la rizósfera un entorno edáfico extremadamente dinámico (Brahmaprakash *et al.*, 2017).

Para Guerra (2008) “El papel de la actividad microbiana influye en la cinética de los procesos que se llevan a cabo en el suelo, tales como: la mineralización e inmovilización de nutrientes, e igualmente en la participación activa en el ciclado de nutrientes” (p. 192).

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar el uso eficiente del Nitrógeno en el patrón Citrange Carrizo, su respuesta en el crecimiento vegetativo en ausencia o incorporando microorganismos de la rizósfera a través de la técnica del isotopo ^{15}N .

2.2. Objetivos específicos

Determinar el efecto de la incorporación de microorganismos de la rizósfera o su ausencia en el crecimiento vegetativo de plantas del patrón Citrange Carrizo en diferentes momentos de aplicación del ^{15}N .

Medir los niveles de clorofila en hojas de plantas de patrón Citrange Carrizo en presencia de microorganismos de la rizósfera o su ausencia y en diferentes aplicaciones de ^{15}N .

Estimar el Uso Eficiente del Nitrógeno en plantas del patrón Citrange Carrizo incorporando microorganismos de la rizósfera o su ausencia en diferentes momentos de aplicación del isotopo ^{15}N .

III. MARCO DE REFERENCIA

A nivel mundial las especies cítricas que se producen en mayor abundancia son naranjas, limones y mandarinas. De acuerdo con Salazar *et al.*, (2012) estos “son los frutales más importantes, su cultivo y consumo se realiza por igual en los cinco continentes, siendo explotados en forma comercial en todos los países donde las condiciones del clima son óptimas para su desarrollo” (p. 5). Por otra parte, Almenares *et al.*, (2015) afirman que “en el mundo se dedican 8.7 millones de hectáreas a su cultivo y la producción asciende a 122.3 millones de toneladas, de ellas el 56.4 % corresponde a naranjas” (p. 56).

Los cítricos son amenazados por plagas y enfermedades que pueden causar pérdidas a los citricultores, uno de estos problemas es el virus de la tristeza de los cítricos (CTV), señalándose por Pedraza *et al.*, (2016) “que está distribuido en todo el mundo y ocasiona una de las enfermedades más destructivas en el cultivo, ha sido considerada como la virosis más importante y devastadora de la citricultura a escala mundial” (p. 30).

En el manejo de los frutales en general, se recomienda el uso de árboles provenientes de dos individuos genéticamente similares siendo estos la variedad y el patrón. Por ello, Gonzales y Arguello (2019) expresan, que “las plantas cítricas tienen que estar necesariamente injertadas combinando dos especies o variedades para obtener una planta de mayor calidad” (p. 31). Mientras tanto, “en el ámbito de la citricultura mundial se utilizan diferentes tipos de patrones, los cuales se seleccionan sobre la base de resultados de investigación a lo largo del tiempo, para así lograr una adaptación ecológica óptima en cada lugar” (Vanegas, 2002, p. 13).

La elección correcta de un patrón es importante ya que puede mejorar la productividad del cultivo y obtener plantas vigorosas con resistencia a algunas enfermedades, al momento de elegir un patrón, no solo se debe tomar en cuenta la producción y el tamaño del fruto; sino también, la capacidad de resistencia del árbol a factores adversos (sequía, frío, salinidad y alcalinidad), además, es la interacción injerto patrón la que capacita al árbol para resistir efectos adversos de plagas y enfermedades (Hernandez, 2000).

El nitrógeno es uno de los macronutrientes esenciales que todas las plantas requieren, contribuye de manera importante en su crecimiento y desarrollo. Gaspar (2017) señala que:

Mediante el uso de fertilizantes marcados con isótopos estables de ^{15}N , esta técnica ayuda a determinar la cantidad óptima de fertilizante que debe aplicarse una vez que el cultivo se satura de nitrógeno, el resto permanece en la tierra y es propenso a lixiviarse. El mismo autor menciona que los primeros resultados han mostrado que al aplicar juiciosamente el nitrógeno a los cultivos de arroz se ahorra cerca de un 30 % de fertilizantes y se reduce en un 20 % la pérdida de fertilizante en el medio ambiente, a la vez que se optimiza el rendimiento. (p. 18)

La técnica de enriquecimiento en ^{15}N o dilución isotópica es una técnica que se basa en la alteración intencionada de la abundancia isotópica del N en el sistema mediante la adición de una cantidad conocida de un compuesto nitrogenado con una abundancia isotópica alterada (enriquecido o empobrecido en ^{15}N), que se comporta de este modo como trazador (Alcantara, 2010, p. 21).

Los isótopos como el ^{15}N han demostrado ser de gran utilidad en la investigación agrícola, Ramachandran *et al.*, (2007) mencionan “que desempeñan un papel importante en el avance de los estudios de suelo y fertilidad, su disponibilidad y ventajas de utilizarlos en la investigación agrícola, como una herramienta definitivamente resultaría en una mayor producción de alimentos” (p. 345).

En la rizósfera se pueden encontrar gran cantidad de microorganismos lo cual establecen una asociación con las raíces que pueden ser benéfico o nocivo. Pedraza *et al.*, (2010) mencionaron que “los microorganismos interactúan con las raíces de las plantas, estas interacciones entre suelo, raíces y microorganismos da lugar al desarrollo de un ambiente dinámico conocido como rizósfera, donde una variedad de formas microbianas puede desarrollarse activamente y en equilibrio” (p. 156). Mientras que Guerra (2008) “ha mostrado cómo los microorganismos influyen no solo en el desarrollo y crecimiento de las plantas, sino, también, en la contribución a la protección de la planta contra patógenos del suelo” (p. 192).

Los microorganismos necesitan de nutrientes que se encuentran en los exudados que genera la planta y que utilizan como su fuente de energía, existen factores abióticos que influyen en la vida de los microorganismos en el suelo como es el pH, por lo tanto, una modificación de éste puede activar o casi inactivar las enzimas de los microorganismos; el pH también actúa sobre la disponibilidad o fijación de minerales nutritivos (Vélez *et al.*, 2008).

Los hongos micorrizicos arbusculares (HMA) son organismos del suelo que viven simbióticamente con la mayoría de las plantas, el tipo de asociación hongo raíz más extendido en la naturaleza es la llamada endomicorriza, está formada por ciertos zigomicetos, los cuales no desarrollan red de Hartig (“El hongo también desarrolla una estructura laberíntica a través del apoplasto de la raíz, donde se lleva a cabo la transferencia de nutrientes entre las células fúngicas y vegetales”) (Brundrett, 2004), citado por (Galindo-Flores *et al.*, 2015, p. 855) y colonizan intracelularmente la corteza de la raíz por medio de estructuras especializadas denominadas arbusculos y vesículas (Aguilera *et al.*, 2007).

Mientras que Torres (2010) explica que la “primera estructura denominada arbusculo tiene la función de transferir nutrimentos desde-hacia la planta y la segunda estructura llamada vesícula funciona como almacén de nutrimentos”. El mismo autor menciona que la “micorriza arbuscular tiene gran importancia en la agricultura y fruticultura, ya que promueve un mejor desarrollo y aumenta la producción en diferentes especies de leguminosas, cítricos, papaya, aguacate, manzana, mango, fresa y durazno, entre muchos otros” (p. 88).

Las micorrizas son asociaciones benéficas entre las raíces de las plantas con ciertos hongos del suelo, estas asociaciones facilitan la absorción de nutrientes del suelo para transportarlos a la planta. Martin *et al.*, (2015) expresan que “las micorrizas reciben fuentes carbonadas provenientes de la planta, mientras que a través de las estructuras fúngicas se incrementa en las plantas, la absorción de nutrientes, el crecimiento y desarrollo”. (p. 23) Alarcon y Cerrato (1999) mencionan que “la simbiosis micorrízica a las plantas está determinado por la actividad del micelio externo del hongo, ya que éste posee mayor capacidad de absorción de los nutrimentos del suelo mediante la extensa red de hifas que el hongo pueda generar”. (p. 180)

Investigadores como Jiménez y Gallo (1993) afirman:

Que el caso de los cítricos micorrizados pueden ser 26 veces más desarrollados que los cítricos no micorrizados. Estos hongos aumentan las concentraciones de nutrientes que están presentes en cantidades inadecuadas a nivel foliar y disminuye las concentraciones foliares de nutrientes que podrían ser absorbidos en exceso, de esta manera se establece una forma de regulación de concentraciones internas de nutrientes en los cítricos. (p. 64)

“Los hongos micorrizicos arbusculares además de su efecto directo en la nutrición de las plantas inducen cambios fisiológicos que comprenden un aumento en la tasa fotosintética y redistribuyen del carbono fijado en mayor proporción hacia las raíces” (Blanco y Salas, 1997, p. 58).

El uso de hongos micorrízicos arbusculares son muy importantes en la agricultura sostenible, Guerra (2008) señala que:

A nivel ambiental, contribuyen al aumento de productividad de los cultivos, regeneración de comunidades vegetales degradadas y mantenimiento del equilibrio del ecosistema, a nivel económico, contribuyen sustancialmente al aprovechamiento eficiente de fertilizantes, y a nivel social contribuyen a un desarrollo rural integrado, con el uso de recursos naturales (desarrollo de inóculos nativos) a escala local, favoreciendo así al establecimiento de agroecosistemas de producción sostenida. (p. 197)

Otro organismo importante que actúan a nivel de la rizósfera de manera sinérgica en plantas leguminosas es la bacteria *Rhizobium* spp. Según Paredes (2013), “está dentro del orden Eubacteriales, familia Rhizobiaceae, son bacterias Gram negativas que no esporulan, son móviles debido a flagelos peritricos, con bacilos de 0.5 a 0.9 μ m de ancho y 1.2 a 3.0 μ m de longitud” (p. 14). Autores como Cuadrado *et al.*, (2009) señalan que:

Este grupo de bacterias al que se conoce colectivamente como rizobios inducen en las raíces o en el tallo de las leguminosas la formación de estructuras especializadas (nódulos), dentro de los cuales el nitrógeno gaseoso se reduce a amonio. Se estima que este proceso contribuye entre el 60-80 % de la fijación biológica de nitrógeno (FBN), y esta simbiosis aporta una parte considerable del nitrógeno combinado en la tierra y permite a las plantas leguminosas crecer sin fertilizantes nitrogenados y sin empobrecer los suelos. (p. 80)

La *Rhizobium* spp, es un organismo que vive en el suelo que tiene la capacidad de unirse a las raíces de las plantas leguminosas y fijar el Nitrógeno del aire, haciéndolo disponible para la planta y evitando al agricultor el uso de fertilizantes nitrogenados. Algunos investigadores como Neyra, *et al.*, (2013) expresan que el organismo se “caracteriza por su habilidad de facilitar directa o indirectamente el desarrollo de la raíz y del follaje de las plantas”. Estos mismos

autores mencionan que el *Rhizobium* “ha sido estudiada porque la agricultura sustentable demanda mejorar la eficiencia de la fijación de nitrógeno a través del uso de bacterias competitivas capaces de extender la ventaja de la simbiosis a otros cultivos no leguminosos” (p. 12). Mientras tanto Caballero y Soriano (2014) expresan que:

Ha sido ampliamente estudiada en los últimos años con el fin de verificar si la fijación de nitrógeno es factible en plantas no leguminosas. En efecto, el beneficio que proporciona *Rhizobium* a leguminosas en términos de fijación biológica de nitrógeno es conocido y se ha verificado que estas bacterias simbióticas tienen el potencial para ser empleadas como promotores de crecimiento de plantas no leguminosas. Por otra parte, mencionan que se han realizado estudios de aislamiento de *Rhizobium* en plantas no leguminosas como en lechuga, en cuyas semillas se detectó la presencia de microorganismos endófitos fijadores de nitrógeno. (p. 2)

A sí mismo, el carácter único de la *Rhizobium* es que puede activar el N_2 atmosférico. García (2011) expresa, “que para romper este triple enlace son necesarias grandes cantidades de energía, donde la enzima nitrogenasa es la encargada de romper dicho enlace, para lo cual necesita 16 moléculas de ATP por N_2 reducido” (p. 176).

El género *Trichoderma* es un hongo muy común en el suelo que es utilizado en la agricultura como agente de control biológico. Según Villalobos y Vanegas (2008) “es un tipo de hongo anaerobio facultativo que se encuentra de manera natural en un número importante de suelos agrícolas, pertenece a la subdivisión Deuteromicete que se caracteriza por no presentar un estado sexual determinado” (p. 14). Pacheco (2009) menciona que:

Este hongo se encuentra muy distribuido por el mundo, y se presenta naturalmente en diferentes hábitats, especialmente los que tienen una buena cantidad de materia orgánica en descomposición, así mismo en residuos de cultivos especialmente aquellos que son atacados por otros hongos, su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces las cuales son colonizadas rápidamente por estos microorganismos. (p. 30)

El beneficio que proporciona *Trichoderma* al aplicarse en la agricultura es que mejoran la nutrición debido a que realizan el proceso de mineralización de los nutrientes produciendo

mayor disponibilidad para las plantas, también ayudan al control del crecimiento de algunos patógenos que podrían estar presentes en la rizósfera, actuando como bioestimulador y su potencial fijación biológica del fósforo, logra disminuir la incidencia de enfermedades en el cultivo en más del 60 % y estimula el desarrollo vegetativo del cultivo observándose mayor vigor, tallos normales con abundante follaje y mejor crecimiento radical (Neyra *et al.*, 2013).

Por otra parte, Chiriboga *et al.*, (2015) mencionan que el hongo *Trichoderma*:

Tiene la capacidad de tomar los nutrientes de los hongos patógenos; compite con ellos o los degrada, también se alimenta de los materiales orgánicos, degradándolos, por ello, las incorporaciones de materia orgánica y compost favorecen su establecimiento en el suelo. El hongo requiere de humedad para poder germinar, además, tiene una velocidad bastante alta de crecimiento, por lo que es capaz de establecerse en el suelo y controlar enfermedades que afectan a los cultivos. (p. 1)

La *Trichoderma* coloniza la rizósfera, tiene la capacidad de crear un ambiente favorable al desarrollo radical de las plantas funcionando como una capa protectora donde hay un sinergismo entre la raíz – hongo. Según Gonzalez *et al.*, (2019) “las especies del género *Trichoderma*, se encuentran dentro de las más estudiadas, debido a su elevada capacidad reproductiva, plasticidad ecológica y mecanismos de acción directos e indirectos, dichos mecanismos le proporcionan a la planta mejor adaptabilidad en el medio” (p. 2). Por lo tanto, Infante *et al.*, (2009) recalcan “que es un excelente modelo para ser estudiado debido a su fácil aislamiento y cultivo, rápido desarrollo en varios sustratos y por su condición de controlador biológico de una amplia gama de fitopatógenos” (p. 15).

La competencia por nutrientes de *Trichoderma*, es principalmente por carbono, nitrato y hierro. De forma general, entre las cualidades que favorecen la competencia de este antagonista se encuentran, la alta velocidad de crecimiento que posee gran parte de sus aislamientos y la secreción de metabolitos de diferente naturaleza, que frenan o eliminan a los competidores en el microambiente. Este modo de acción influye en bloquear el paso al patógeno y resulta importante para la diseminación del antagonista (Martinez *et al.*, 2013, p. 4).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación del área de estudio

El experimento se realizó en las instalaciones del vivero de reproducción de plantas cítricos dirigido por el Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA), ubicado en área de la finca El Plantel, propiedad de la Universidad Nacional Agraria (UNA), carretera Tipitapa – Masaya km 32.

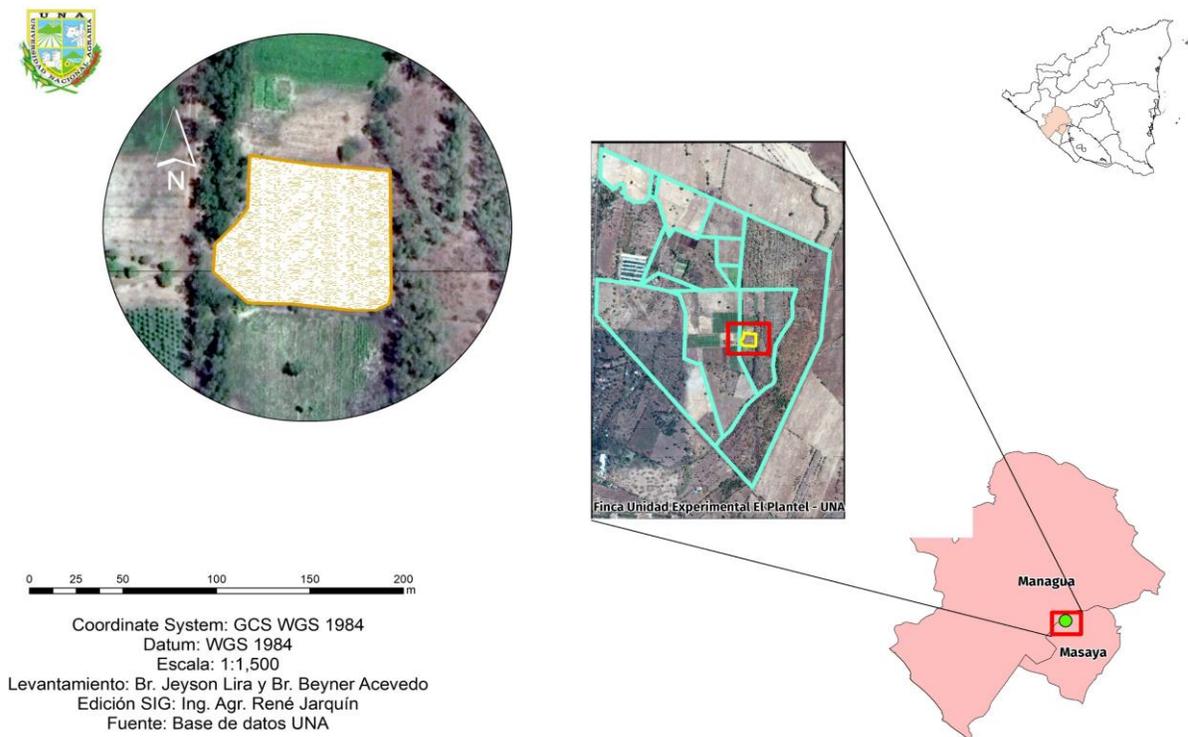


Figura 1. Ubicación geográfica de la finca El Plantel, Masaya.

4.2. Diseño metodológico

Se desarrolló una investigación de tipo experimental con enfoque cuantitativo. Este experimento se estableció en condiciones controladas bajo invernadero, por tanto, no existió una variabilidad de los factores ambientales, de igual forma las unidades experimentales fueron homogéneas en cuanto al tipo de sustrato que se utilizó.

Debido a las exigencias de precisión del experimento, se utilizó un arreglo bifactorial en diseño completamente al azar (DCA), que consistió de 4 x 4 equivalente a un total de 16 tratamientos con 7 repeticiones o plantas, para un total de 112 unidades experimentales.

4.2.1. Descripción de los factores de estudio

Se utilizaron plantas con tres meses de edad del patrón Citrange Carrizo (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*), A continuación, se describen los factores evaluados:

Factor A: Momento de aplicación del ^{15}N y Urea (46%)

Las aplicaciones del isótopo ^{15}N como fuente Urea enriquecida al 5.22 %, se realizaron en cuatro variantes de manera fraccionada en el tiempo de la siguiente forma: a un total de 28 maceteras a los 0, 30, 60 y 90 días después del trasplante fueron aplicados 0.52 g de ^{15}N por macetera, por lo que se utilizaron en cada momento un total de 14.56 g de ^{15}N . La cantidad de ^{15}N por maceteras se disolvió en 100 ml de agua, utilizando un total de 2.8 litros para regarse en las 28 maceteras (Anexo 5).

Cuadro 1. Fraccionamiento del ^{14}N y ^{15}N

Momentos de aplicación	04 octubre 2019	04 noviembre 2019	04 diciembre 2019	03 enero 2020
0 ddt	^{15}N	^{14}N	^{14}N	^{14}N
30 ddt	^{14}N	^{15}N	^{14}N	^{14}N
60 ddt	^{14}N	^{14}N	^{15}N	^{14}N
90 ddt	^{14}N	^{14}N	^{14}N	^{15}N

Complementando la aplicación de ^{15}N , aportará nitrógeno de ^{14}N en base a fuente Urea 46 %. La aplicación se realizó de manera fraccionada en los cuatro momentos 0, 30, 60, y 90 días después del trasplante en cada arreglo de macetera, a la misma dosis (0.52 g en 100 ml de agua) se aplicó en cada uno de los momentos. La preparación fue diluir en un balde 43.68 gramos de urea (46%) en 8.4 litros de H_2O , donde se aplicó 100 ml por unidad experimental.

Factor B: Microorganismos de la rizósfera

Se seleccionaron los microorganismos *Trichoderma*, *Rhizobium* y *Micorriza* lo que posibilitó las aplicaciones diferenciadas a partir de la presencia de un microorganismo para observar la contribución biológica en las plantas de cítricos.

A continuación, se estructuró las siguientes asociaciones conformando tratamientos:

1. Control (sin microorganismos de la rizósfera)
2. *Trichoderma*
3. *Trichoderma* + *Micorriza*
4. *Trichoderma* + *Micorriza* + *Rhizobium*

Interacciones entre los factores

La combinación de momentos de aplicación y microorganismos asociados, da como resultado los siguientes tratamientos:

Cuadro 2. Niveles de fraccionamiento en la aplicación del ^{15}N a base de urea y la interacción de los microorganismos de la rizósfera

Nº		Momento de aplicación con ^{15}N	Microorganismos de la rizósfera
1			b1:Control
2	a1	0 días	b2: <i>Trichoderma</i>
3			b3: <i>Trichoderma</i> + <i>Micorriza</i>
4			b4: <i>Trichoderma</i> + <i>Micorriza</i> + <i>Rhizobium</i>
5			b1:Control
6	a2	30 días	b2: <i>Trichoderma</i>
7			b3: <i>Trichoderma</i> + <i>Micorriza</i>
8			b4: <i>Trichoderma</i> + <i>Micorriza</i> + <i>Rhizobium</i>
9			b1:Control
10	a3	60 días	b2: <i>Trichoderma</i>
11			b3: <i>Trichoderma</i> + <i>Micorriza</i>
12			b4: <i>Trichoderma</i> + <i>Micorriza</i> + <i>Rhizobium</i>
13			b1:Control
14	a4	90 días	b2: <i>Trichoderma</i>
15			b3: <i>Trichoderma</i> + <i>Micorriza</i>
16			b4: <i>Trichoderma</i> + <i>Micorriza</i> + <i>Rhizobium</i>

4.2.2. Aplicaciones de los microorganismos

Una vez que las maceteras contenían el sustrato, con la ayuda de un palustre, se introdujeron 15 cm de profundidad del suelo donde fue inoculado con uno, dos o tres organismos biológicos, según tratamiento.

La aplicación de *Trichoderma* y *Micorriza* se realizó con cuchara a razón de 2 g del producto biológico por unidad experimental. La preparación de *Rhizobium* consistió en tomar 134 ml del producto diluido en 1.5 litros de agua.

Se utilizó un total de 1,366 ml de agua más los 134 ml de microorganismos para ser distribuidos en 28 maceteras (Se aplica 50 ml de *Rhizobium* por macetera), que corresponden a siete plantas por momento de aplicación (0, 30, 60 y 90 ddt de las plantas patrón de cítricos).

4.2.3. Variables evaluadas

El periodo del ensayo se realizó en 4 meses (octubre 2019 – febrero 2020), durante este tiempo se realizaron las siguientes mediciones:

- a) Altura de planta (cm): Con una cinta métrica se midió desde la base del tallo hasta la inserción de la última hoja del ápice de la planta. Las mediciones se realizaron a los 0 y 30 ddt (7 plantas), a los 60 y 90 ddt (6 plantas), y a los 120 ddt solo 5 plantas.
- b) Diámetro del tallo (mm): Se realizó a una altura de 3 cm de la superficie del suelo utilizando un Vernier o pie de rey. Fueron realizadas las mediciones en los momentos señalados en altura de planta.
- c) Número de hojas por planta: Consistió en realizar un conteo del número de hojas presentes en cada una de las plantas desde su parte inferior hasta la superior.
- d) Contenido de clorofila en las hojas: Se realizó a través del medidor de clorofila SPAD 502 Plus donde se tomó una hoja por planta para detectar la cantidad de clorofila. A los 0, 30, 60 y 120 días.

e) Peso seco (g) de hoja, tallo y raíz: Se realizó a los 0, 30, 90, 120 días del trasplante donde se procedió a la destrucción de una planta por tratamiento separando las partes estructurales (hoja, tallo, raíz), utilizando una tijera. Dicho material se secó al horno a temperatura de 65°C por tres días y pesados en una balanza analítica.

d) Uso Eficiente del Nitrógeno

La eficiencia del uso de fertilizantes es un factor principal para determinar la dosis necesaria, la expresión es la siguiente:

$$Rto\ N\ Total\ (g\ N\ pta) = \frac{N\ Total\ aérea\ (\%)}{100} * Biomasa\ seca\ aérea$$

$$Rto\ 15_N\ (g\ 15N\ pta) = \frac{15_N\ atm.\ exce\ (\%)}{100} * Biomasa\ seca\ aérea$$

$$\% Nddf = \frac{\% 15_N\ a.\ e\ en\ la\ muestra\ vegetal}{\% 15_N\ a,\ e\ en\ el\ fertiliznte\ marcado} * 100$$

$$\% UEN = \frac{Rto\ N\ en\ la\ planta\ derivado\ del\ fertilizante}{Cantidad\ de\ nutriente\ aplicado\ como\ fertilizante} * 100$$

4.2.4. Recolección de datos

A los 0, 30, 90 y 120 ddt, se procedió a la extracción de las plantas del patrón Citrange Carrizo por macetera, a los cuales se separaron las partes estructurales (hojas, tallos, raíces) y fueron pesados en fresco. Se conformó una muestra y se colocó en bolsa de papel kraft etiquetada, la que fueron puestas al horno a temperatura de 65 grados Celsius por tres días, fueron pesadas. Posteriormente, se unieron los tallos y hojas en cada muestra y se trituraron utilizando un molino con tamiz de 0.05 mm, se empacaron agregando 2 gramos por cada muestra.

Cada muestra triturada fue puesta en una bolsa (12 x 7 cm) de plástico codificadas, las que se remitieron vía aérea a un laboratorio de la Universidad de Florida, Estados Unidos la unidad

Stable Isotope Mass Spectrometry Lab. En dicho laboratorio determinaron los contenidos de Nitrógeno total y ^{15}N para cada muestra.

4.2.5. Análisis de los datos

Para el análisis de datos, primero se procedió a digitalizar todos los valores obtenidos de las mediciones de campo a una hoja electrónica del software Excel 2019, las variables morfológicas como altura de planta (cm), diámetro de tallo (mm), clorofila de la hoja, número de hojas por planta, las cuales se sometieron a análisis de varianza (ANDEVA) con el software SAS 9.1.

El Modelo Aditivo Lineal (MAL) que se aplicó a los datos, corresponde a un arreglo que permitirá observar los efectos principales de las interacciones sobre la absorción del nitrógeno en las plantas. El Modelo aditivo lineal del DCA es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \theta_j + (\tau\theta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ij} = variable de interés o variable medida

μ = media general del experimento

T_i = efecto de 1, 2, 3 y 4 i-esimo momento de aplicación de ^{15}N .

Θ_j = efecto de 1, 2, 3 y 4 j-esimo microorganismo de la rizósfera

$(T\Theta)_{ij}$ = efecto de la interacción del i-esimo momento de aplicación ^{15}N con el j-esimo microorganismo de la rizósfera

ε_{ijk} = error aleatorio asociado a la respuesta

El objetivo fue determinar si existe una diferencia significativa entre los tratamientos, para lo cual se comparó si la “varianza del tratamiento” contra la “varianza del error” y se determina si la primera es lo suficientemente diferente.

Posteriormente los datos obtenidos de Nitrógeno total y ^{15}N , fueron organizados en una base de datos en el que se realizó un procedimiento matemático para calcular la eficiencia en la absorción del ^{15}N .

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Influencia de la aplicación de ^{15}N y microorganismos en el crecimiento vegetativo

El crecimiento vegetativo de las plantas se expresa en variables como la altura de plantas, el diámetro del tallo y el número de hojas por planta, las que fueron medidas y analizadas utilizando el método del análisis de varianza.

5.1.1. Altura de planta (cm)

La altura es una característica fisiológica de gran importancia en el crecimiento y desarrollo de la planta. “Es una variable fácil de medir, y en ella intervienen varios factores como luz, humedad, calor y nutrientes. La altura ideal de cada especie está determinada por un rango que ha sido obtenido por el éxito de las plantaciones” (Birchler *et al.*, 1998, p. 115).

El análisis de varianza realizado en la aplicación de ^{15}N a los 0 días (Anexo 1), para la variable altura de plantas se detectó diferencia significativa en la medición a los 30 ddt ($p > f: 0.0369$), siendo el tratamiento Control el que obtuvo la mayor altura con 15.49 cm ubicándose en la primera categoría, seguido de los tratamientos *Trichoderma* sola con 14.30 cm y *Trichoderma* más *Micorriza* con 13.49 cm y el que demostró un menor crecimiento longitudinal fue el *Trichoderma* más *Micorriza* y *Rhizobium* con 11.77 cm, probablemente resultó una interacción de competencia entre los organismos del suelo con la planta, por tanto, el patrón Citrange Carrizo no se ve favorecido en el crecimiento. Donde Kuzyakov y Xu, (2013) mencionan que “la demanda de todos los organismos vivos de los mismos nutrientes constituye la base de la competencia interespecífica entre plantas y microorganismos en el suelo, esta competencia es especialmente fuerte en la rizosfera”. (p.656). Por el contrario, en las mediciones realizadas a los 60, 90 y 120 ddt no se aprecian diferencias significativas, ubicándose todos los tratamientos en una sola categoría debido a que presentaron resultados similares entre sí (Figura 2).

Aunque se observa en la Figura 2, que las aplicaciones de ^{15}N realizadas a los 30 y 90 días tanto el Control, *Trichoderma* sola y *Trichoderma* más *Micorriza* fueron superior al tratamiento *Trichoderma* más *Micorriza* y *Rhizobium* durante el tiempo de evaluación de 120 días. Según los datos obtenidos del Análisis de varianza, manifestó que no existe diferencia estadística entre los tratamientos. (Anexo 1).

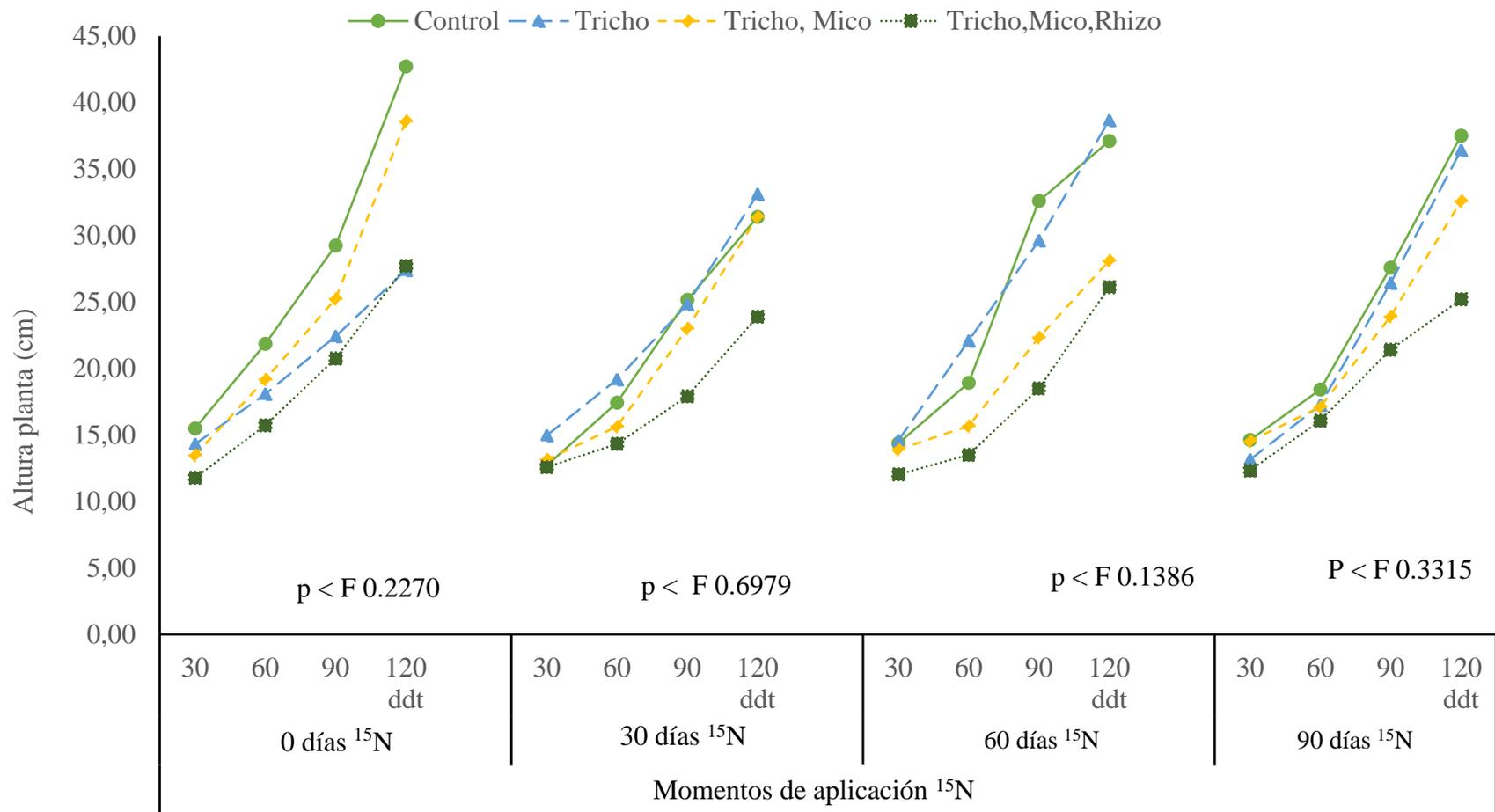


Figura 2. Comportamiento de altura (cm) de planta a efectos de los microorganismos inoculados al momento del trasplante en cada aplicación de ¹⁵N en etapa de vivero del patrón Citrange carrizo.

El ANDEVA realizado en la aplicación de ^{15}N a los 60 días, se encontraron diferencias significativas en la medición 60 ddt ($p < 0.0487$), siendo el tratamiento *Trichoderma* sola el que presentó mayor altura con 22.08 cm, superior a los demás tratamientos, y en la medición 90 ddt ($p < 0.0219$), el Control demuestra mayor altura con 32.58 cm, seguido de los tratamientos *Trichoderma* sola con 29.63 cm y *Trichoderma* más *Micorriza* con 22.33 cm, por último se ubica el tratamiento *Trichoderma* más *Micorriza* y *Rhizobium* con 18.50 cm. Por el contrario, en las mediciones realizadas a los 30 y 120 ddt no se aprecian diferencias estadísticas en los tratamientos (Anexo 1).

De forma general, se observa que los tratamientos que fueron inoculados con los tres microorganismos presentan un menor crecimiento longitudinal en comparación con el tratamiento Control, esto demuestra que la asociación de estos organismos no favorece el crecimiento del patrón Citrange carrizo. Estos resultados son similares a los reportados por Duarte y Chavarria (2016) quienes mencionan que las Micorrizas y *Rhizobium* con y sin fertilización sintética como opción agroecológica para la nutrición en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), realizado en Ticuantepe, encontraron que el Control presenta superior altura con respecto a los tratamientos inoculados.

5.1.2. Diámetro del tallo (mm)

Hartman y Kester (1997) mencionan que “el diámetro es un parámetro cuántico que permite conocer el vigor de las plántulas en estudio” (p. 23). Esta variable tiene gran importancia agronómica para la obtención de altos rendimientos debido a que un grosor apropiado le dará resistencia a la planta contra factores adversos.

De acuerdo con el análisis de varianza realizado en las aplicaciones de ^{15}N a los 0 y 90 días (Anexo 2), muestran que no se detectaron diferencias significativas en las mediciones 30, 60, 90 y 120 ddt, debido a que los tratamientos presentaron similares resultados.

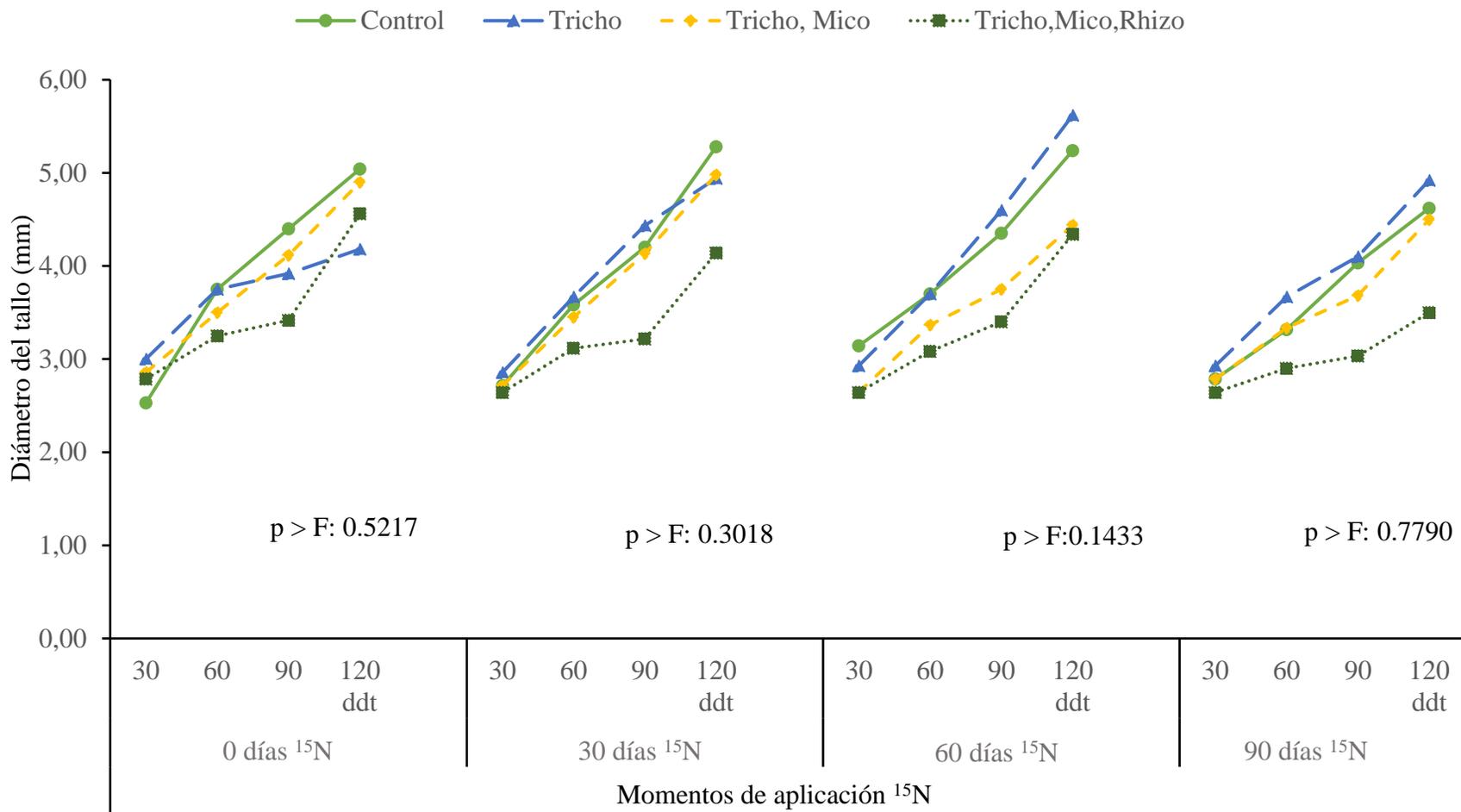


Figura 3. Comportamiento de diámetro del tallo (mm) de planta a efectos de los microorganismos inoculados al momento del trasplante en cada aplicación de ¹⁵N en etapa de vivero del patrón Citrange carrizo.

Se puede observar en la Figura 3, que la aplicación de ^{15}N realizada a los 30 días muestran que no existen diferencias significativas en las mediciones a los 30, 60 y 120 ddt, por el contrario, a los 90 ddt ($p < 0.0405$) los tratamientos Control, *Trichoderma* sola y *Trichoderma* más *Micorriza* presentaron diferencias estadísticas ubicándose en la primera categoría en comparación con el tratamiento *Trichoderma* más *Micorriza* y *Rhizobium* que presentó un menor diámetro de 3.22 mm. Así mismo, en la aplicación de ^{15}N realizada a los 60 ddt se encontró diferencia significativa en la medición 30 ddt ($p < 0.0494$), siendo el tratamiento Control con el mayor diámetro 3.14 mm y estadísticamente superior a los demás tratamientos. En cambio, en las mediciones 60, 90 y 120 ddt no se aprecian diferencia estadística entre los tratamientos (Anexo 2).

5.1.3. Número de hojas por planta

Los principales órganos para la realización de la fotosíntesis en la planta son las hojas y la concentración de nutrientes en la misma influyen en el crecimiento y rendimiento del cultivo.

El análisis estadístico realizado en la aplicación de ^{15}N a los 0 días (Anexo 3), muestra que en la medición a los 30 ddt ($p < F: 0.0090$), el tratamiento Control obtuvo diferencia significativa con respecto a los otros. En cambio, en las mediciones 60, 90 y 120 ddt no hubo diferencia estadística entre los tratamientos.

Así mismo el ANDEVA realizado en la aplicación de ^{15}N a los 60 días, señala que la medición a los 30 ddt presenta diferencia significativa ($p < F 0.0366$), siendo el tratamiento *Trichoderma* que resultó superior con 16.14 hojas, seguido el Control con 15.29 hojas y los tratamientos *Trichoderma* más *Micorriza* y *Trichoderma* más *Micorriza* y *Rhizobium* con 13 hojas. Por el contrario, en las mediciones realizadas a los 60, 90 y 120 ddt no existieron diferencias estadísticas en los tratamientos (Anexo 4).

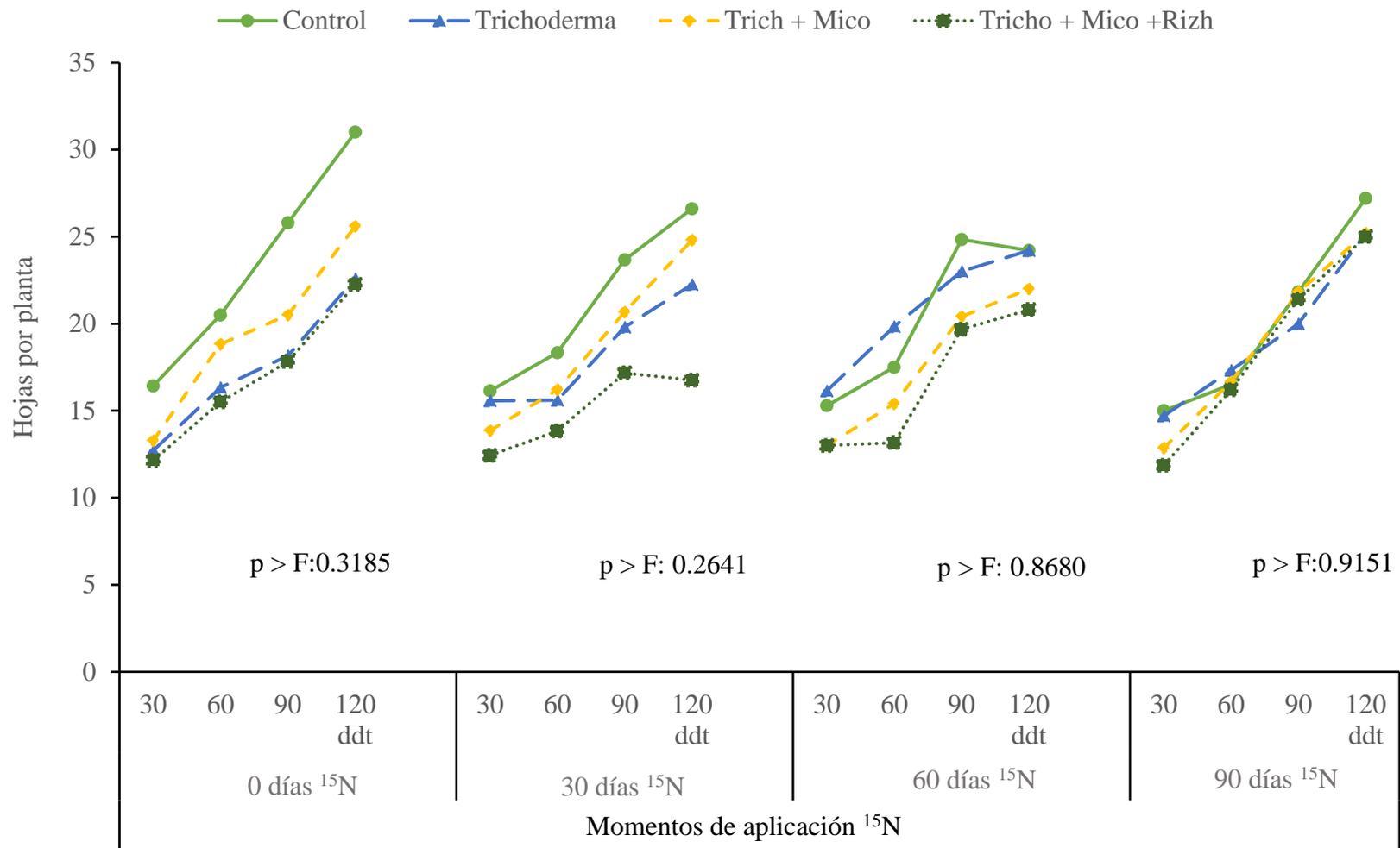


Figura 4. Comportamiento de número de hojas por planta a efectos de los microorganismos inoculados al momento del trasplante en cada aplicación de ¹⁵N en etapa de vivero del patrón Citrange carrizo.

Se aprecia en la Figura 4, que las aplicaciones realizadas de ^{15}N a los 30 y 90 días no se encontraron diferencias significativas en las mediciones 30, 60, 90 y 120 ddt, debido a que los tratamientos presentaron similares resultados. Se determinó que el tratamiento que no favoreció al patrón fue la asociación de los tres microorganismos debido a la competencia por nutrientes que se expresa en una inmovilización de nutrientes por los organismos biológicos que interactúan con la planta. Por el contrario, el tratamiento Control posee una mayor tendencia en obtener mayor número de hojas.

5.2. Influencia de la aplicación de ^{15}N y microorganismos en la producción de biomasa y contenido de clorofila

5.2.1. Biomasa seca por planta (g)

La producción de biomasa seca de una planta está relacionada con las características morfológicas y fisiológicas, siendo las especies de mayor crecimiento las que habitualmente obtienen una mayor producción de biomasa.

Se evidencia en la Figura 5, que en la aplicación de ^{15}N realizada a los 0 ddt el tratamiento que obtuvo mayor peso seco durante el periodo hasta los 120 ddt fue el Control con 6.38 g y la de menor peso fue el tratamiento *Trichoderma* más *Micorriza* y *Rhizobium* con 2.46 g, los tratamientos *Trichoderma* más *Micorriza* con 5.85 g y la *Trichoderma* sola con 3.81 g presentaron pesos intermedios respecto a los demás tratamientos. Así mismo, en la aplicación de ^{15}N a los 30 ddt el Control nuevamente obtuvo un mayor peso seco con 6.12 g, en segundo lugar, presenta el tratamiento *Trichoderma* sola con 4.51 g, seguido de *Trichoderma* más *Micorriza* con 3.86 g y por último *Trichoderma* más *Micorriza* y *Rhizobium* con un valor de 1.50 g.

De acuerdo con el tiempo en la aplicación de ^{15}N a los 60 ddt se aprecia una diferencia más notable donde el tratamiento *Trichoderma* supera a los demás tratamientos con un peso seco de 6.80 g, seguido el tratamiento de los tres organismos biológicos con 3.35 g, en tercer lugar, el Control con 2.85 y por último ubica al tratamiento *Trichoderma* más *Micorriza* con 2.56 g.

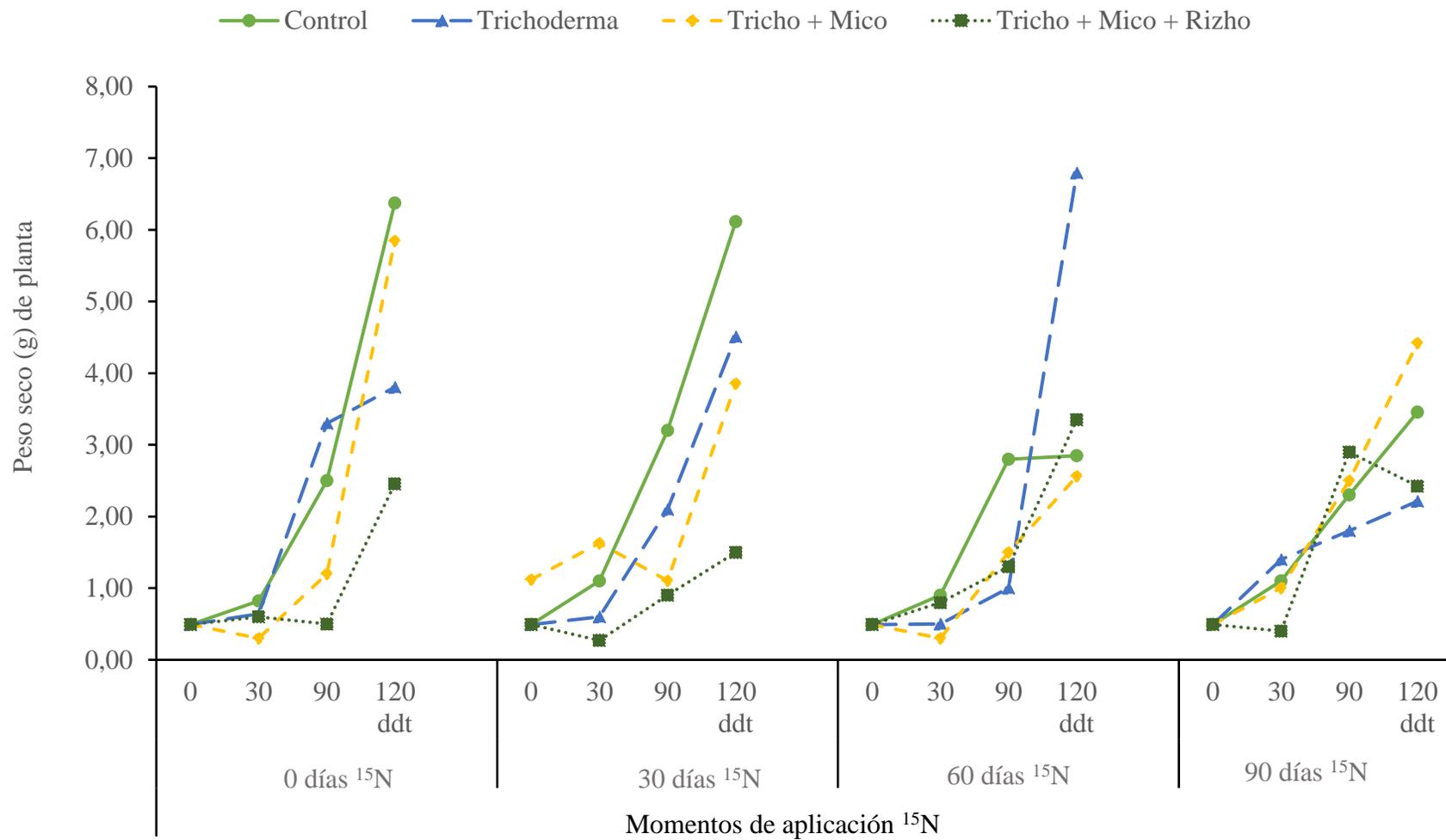


Figura 5. Comportamiento del peso seco (g) de planta a efectos de los microorganismos inoculados al momento del trasplante en cada aplicación de ^{15}N en etapa de vivero del patrón Citrange carrizo.

En la aplicación de ^{15}N realizada a los 90 ddt el tratamiento que presenta mayor peso seco es la *Trichoderma* más *Micorriza* con 4.42 g, en segundo lugar, el tratamiento Control con 3.46 g, seguido se ubica la *Trichoderma* más *Micorriza* y *Rhizobium* con 2.43 g y por último encontramos *Trichoderma* sola con 2.22 g. Estos resultados concuerdan por Cubillos *et al.*, (2009) donde realizaron un estudio en plantas de maracuyá (*Passiflora edulis*) al evaluar *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal, y observó que desde los 60 días después de la inoculación, se presentaron resultados significativamente superiores de peso seco con respecto al Control.

5.2.2. Contenido relativo de clorofila

El uso del clorofilómetro SPAD-502 es una herramienta de análisis foliar que proporciona valores correspondientes al contenido de clorofila en las hojas, sin destruir el tejido. Según Montolla y Ordoñez (2009):

El medidor de clorofila es una herramienta de diagnóstico portátil, que estima en forma instantánea el contenido relativo de este compuesto en las hojas, sin destruir el tejido. Este valor se calcula en base a la luz transmitida por la hoja en dos longitudes de onda, en las cuales la absorbancia de luz (que es inversamente proporcional a la reflectancia) es diferente. (p. 11)

De acuerdo con el análisis de varianza realizado para la aplicación de ^{15}N a los 0 días (Anexo 4, Figura 6), para los valores relativos de Clorofila con el SPAD, se encontró diferencias significativas en la medición a los 30 ddt ($p < 0.0053$), siendo el tratamiento *Trichoderma* más *Micorriza* el que presentó mayor contenido con 74.99 ubicándose en la primera categoría, en segundo lugar *Trichoderma* con un contenido de 71.49, seguido la *Trichoderma* con 64.50 y por último se encontró el Control con un valor de 59.34. Por el contrario, en las mediciones realizadas a los 60 y 120 ddt no existieron diferencias significativas, por lo que los resultados fueron similares entre tratamientos.

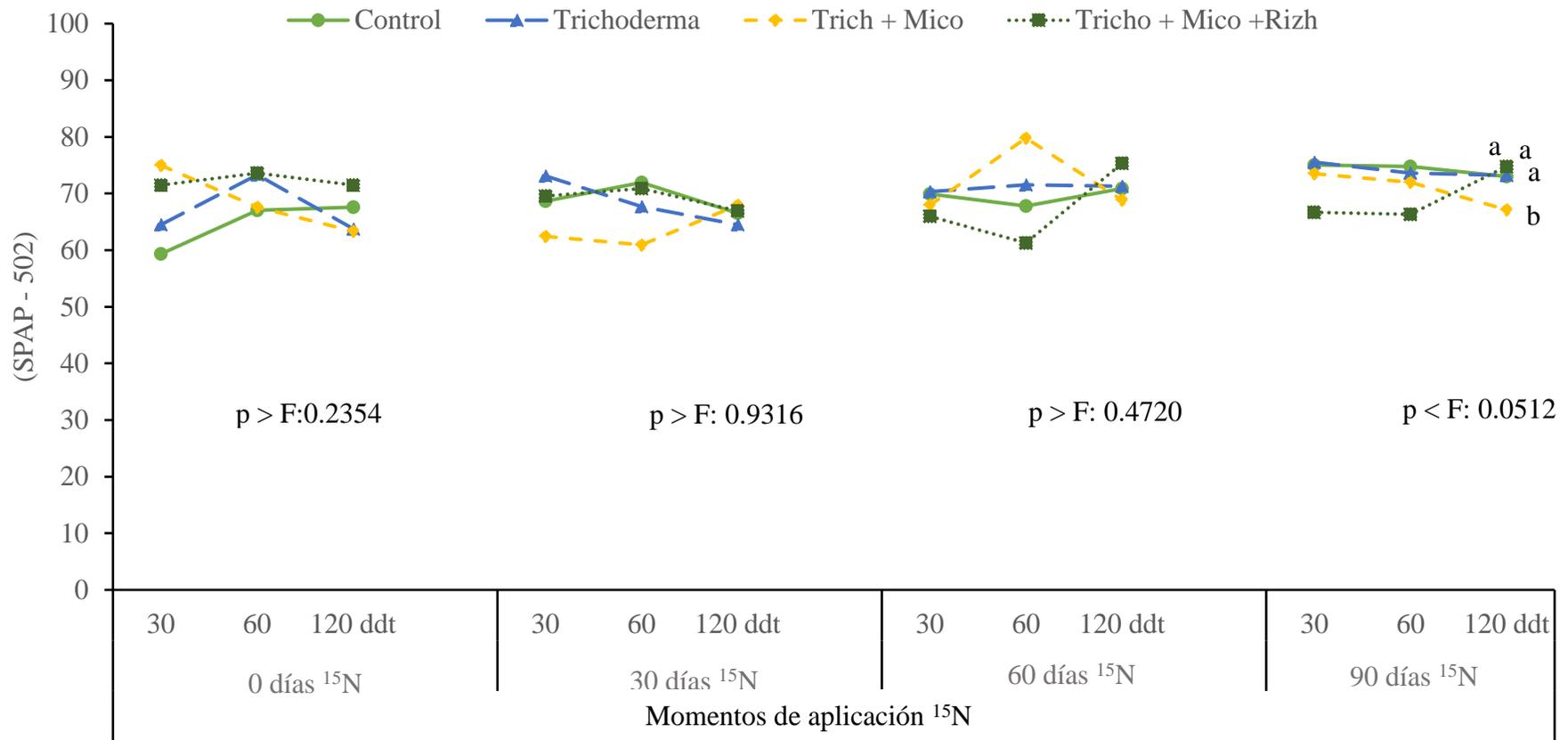


Figura 6. Comportamiento del contenido relativo de clorofila a efectos de los microorganismos inoculados al momento del trasplante en cada aplicación de ¹⁵N en etapa de vivero del patrón Citrange carrizo.

Se puede observar en la Figura 6 que la aplicación de ^{15}N a los 0 días el tratamiento *Trichoderma* más *Micorriza* y *Rhizobium* presentan valores más altos relativos de clorofila durante el periodo de evaluación a los 30, 60 y 120 ddt respecto a los demás tratamientos. Seguidamente se aprecia que en la aplicación de ^{15}N a los 60 días el tratamiento *Trichoderma* sola muestra una tendencia mayor.

Se aprecia que en las aplicaciones de ^{15}N realizadas a los 30 y 60 días no se detectaron diferencias significativas en las mediciones 30, 60, 90 y 120 ddt, donde los tratamientos presentaron similares valores al contenido de clorofila (Anexo 4).

En el ANDEVA realizado para la aplicación de ^{15}N a los 90 días no se encontraron diferencias significativas en las mediciones a los 30 y 60 ddt, obteniendo diferencia estadística entre los tratamientos en la medición 120 ddt, donde el Control, *Trichoderma* sola y *Trichoderma* más *Micorriza* y *Rhizobium* fueron superior al tratamiento *Trichoderma* más *Micorriza*. que mostro el menor valor con el SPAD de 67.14. (Anexo 4).

5.3. Eficiencia de la absorción de Nitrógeno influenciado por la aplicación de ^{15}N y asociados a los microorganismos de la rizósfera

El nitrógeno permite el crecimiento vegetativo y reproductivo de las plantas. Por ello. Besantes (2015), expresa que:

El nitrógeno es un elemento esencial para la vida de las plantas y su carencia conduce a la muerte de las células, donde el suelo, la atmósfera y los fertilizantes constituyen las fuentes de nitrógeno para la planta, el cual ha sido determinado en plantas leguminosas fijadoras y no fijadoras.

El mismo autor menciona que para estudiar el destino del nitrógeno en el sistema suelo-planta se utiliza el isótopo estable ^{15}N . De acuerdo con esta técnica es posible determinar con precisión la distribución de nitrógeno en el sistema suelo-planta, inclusive su acumulación en diferentes partes de la planta como en diferentes camadas del perfil del suelo. (p. 139)

5.3.1. Respuesta de ^{15}N aplicado a los 0 días después del trasplante

El análisis estadístico realizado a la variable Nitrógeno total evaluadas a los 30 ddt ($\text{Pr} < \text{F} 0.0001$) y 90 ddt ($\text{Pr} < \text{F} 0.0089$) muestran diferencias significativas, por el contrario, en la medición a los 120 ddt ($\text{Pr} > \text{F} 0.1414$), no hay efecto significativo para los tratamientos, como se muestra en el Cuadro 3.

Se puede observar en el Cuadro 3, que el patrón evaluado a los 30 días después del trasplante el ^{15}N , el tratamiento con *Trichoderma* más *micorriza* y *Rhizobium* incorporados a los 0 ddt, presenta la mayor absorción de Nitrógeno total con 2.75 %, seguido el Control 2.62 %, en tercer lugar, ubica *Trichoderma* más *micorriza* 1.97 % y por último *Trichoderma* sola con 1.46 %.

Según porcentajes de absorción del Nitrógeno total en la planta, el tratamiento *Trichoderma* sola en comparación con el Control presenta un efecto negativo de -1.16 %, donde implica una probable competencia del organismo con la planta. De igual manera el tratamiento *Trichoderma* más *Micorriza* no favorece una mayor absorción -0.65 % con respecto al Control. Donde, la *Micorriza* aporta el +0.51 % más la absorción de nutrientes, lo que demuestra que el organismo *Trichoderma* es la que presenta una acción negativa (Cuadro 4). Con respecto al tratamiento con los tres organismos biológicos asociados e incorporados en el sustrato, el Control tiene una mayor absorción de +0.13 %. Al eliminar el efecto *Trichoderma* resulta que la *Micorriza* y *Rhizobium* aportan un valor mayor de +1.29 %. Por lo tanto, *Rhizobium* sin los dos organismos muestra un aporte al patrón de +0.78 %. Santillana *et al.*, (2005) afirma que “las asociaciones entre rizobios y plantas no leguminosas pueden mejorar el crecimiento de las plantas, aunque no se ha demostrado que sea mediante la fijación de nitrógeno” (p. 50).

El ANDEVA realizado a la variable Nitrógeno derivado del fertilizante (Nddf), indica que cada una de las mediciones realizadas a los 30 ddt ($\text{Pr} < \text{F} 0.0001$), 90 ddt ($\text{Pr} < \text{F} 0.0001$) y 120 ddt ($\text{Pr} < \text{F} 0.0010$) se encontraron diferencias significativas (Cuadro 3).

De forma general, se observa que las plantas extraídas y medidas a los 30 ddt incrementaron el mayor porcentaje de Nddf., siendo el tratamiento *Trichoderma* más *Micorriza* el que presentó mayor acumulación creciente de 46.78 %, siendo estadísticamente superior a los demás tratamientos (Cuadro 3).

En el Cuadro 4, se muestran los porcentajes de absorción del Nitrógeno derivado del fertilizante donde el tratamiento *Trichoderma* sola en comparación con el Control presenta un -23.64 %, donde involucra una disminución del fertilizante a la planta, puesto que el microorganismo lo está asimilando. Por el contrario, el tratamiento *Trichoderma* más *Micorriza* demuestran un mayor incremento de +7.05 %. Donde la *Micorriza* considerablemente acumula una cantidad creciente de ¹⁵N procedente del fertilizante del +30.69 %, lo cual se estableció un sinergismo de la *Micorriza* con la dosis de ¹⁵N aplicado.

Se puede observar que el tratamiento *Trichoderma* más *Micorriza* y *Rhizobium* en comparación con el Control presenta un efecto negativo de -10.72 % donde no benefician al patrón Citrange carrizo en obtener una mayor absorción. Al excluir el efecto *Trichoderma* resulta que la *Micorriza* y *Rhizobium* aportan un mayor incremento de +12.92 %. Por lo tanto, *Rhizobium* sin los dos organismos muestra un bloqueo en la absorción con un -17.77 % (Cuadro 4).

El Uso Eficiente del Nitrógeno (UEN), muestra que existen diferencias significativas (Cuadro 3) en cada una de las extracciones realizadas a los 30 ddt (Pr < F 0.0001), 90 ddt (Pr < F 0.0001) y 120 (Pr < F 0.0009) ddt.

Cuadro 3. Resultados de la aplicación de ¹⁵N a los 0 ddt del patrón Citrange carrizo en la respuesta de Nitrógeno total (Nt), Nitrógeno derivado del fertilizante (Nddf) y Uso eficiente del Nitrógeno (UEN) en las mediciones realizadas a los 30, 90 y 120 ddt

Mediciones	Microorganismos				Pr = F
	Control	<i>Trichoderma</i>	<i>Tricho+Mico</i>	<i>Tricho+Mico+Rhi</i>	
Nt (%)	2.62 b	1.46 d	1.97 c	2.75 a	0.0001
30 ddt ¹⁵ Nddf (%)	39.73 b	16.09 d	46.78 a	29.01 c	0.0001
UEN (%)	1.64 a	0.29 d	0.53 c	0.92 b	0.0001
Nt (%)	2.62 b	2.86 a	2.86 a	2.78 a	0.0089
90 ddt ¹⁵ Nddf (%)	28.44 a	16.00 c	17.35 b	14.74 d	0.0001
UEN (%)	3.58 a	2.90 b	1.14 c	0.39 d	0.0001
Nt (%)	2.23	2.52	2.38	2.78	0.1414
120 ddt ¹⁵ Nddf (%)	10.16 b	24.26 a	14.40 b	14.64 b	0.001
UEN (%)	2.76 b	4.28 a	3.67 a	1.79 c	0.0009

ddt: días después del trasplante.

En el Cuadro 3, se aprecia que las plantas evaluadas en la medición 30 ddt del ^{15}N , el tratamiento Control presenta la mayor eficiencia con 1.64 %, siendo superior a los demás tratamientos.

Se evidencia en el Cuadro 4, el uso de eficiencia del nitrógeno donde el tratamiento *Trichoderma* sola en comparación con el Control presenta una menor eficiencia en -1.35 %, lo que demuestra que este organismo a los 30 días después de inoculación no favorece en tener una mejor concentración de ^{15}N a la planta debido a que está en el proceso de adaptación. De igual manera el tratamiento *Trichoderma* más *Micorriza* es menos eficiente con -1.11 %. Por tanto, la *Micorriza* hace una mayor transferencia de ^{15}N a la planta de +0.24 %.

Se puede observar que el tratamiento *Trichoderma* más *Micorriza* y *Rhizobium* en comparación con el Control presenta un efecto negativo de -0.72 % donde estos no benefician a la planta en obtener una mayor eficiencia. Al eliminar el efecto *Trichoderma* resulta que la *Micorriza* y *Rhizobium* la eficiencia aumenta +0.63 %. Por lo tanto, la *Rhizobium* sin los dos organismos muestra un aporte de +0.39 % (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto individual de los microorganismos de la rizósfera en la aplicación de ^{15}N a los 0 ddt del patrón Citrange carrizo en la respuesta de Nitrógeno total (Nt), Nitrógeno derivado del fertilizante (Nddf) y Uso eficiente del Nitrógeno (UEN) medidos a los 30 ddt

Aplicación ^{15}N	Microorganismos	Medición a los 30 ddt		
		Nt	$^{15}\text{Nddf}$	UEN
0 ddt	Control	2.62	39.73	1.64
	<i>Trichoderma</i>	1.46	16.09	0.29
	<i>Micorriza (Trichoderma)</i>	0.51	30.69	0.63
	<i>Rhizobium (Trichoderma + Micorriza)</i>	0.78	-17.77	0.39

Nota: Entre paréntesis, se excluye el aporte del o los microorganismos, ddt: días después del trasplante.

5.3.2. Respuesta de ^{15}N aplicado a los 30 días después del trasplante

El ANDEVA realizado (Cuadro 5) para Nitrógeno total muestran diferencias significativas ($\text{Pr} < \text{F} 0.0006$) en la medición 90 dda, ubicándose en la primera categoría los tratamientos *Trichoderma* más *Micorriza* con 3.20 % y *Trichoderma* sola con 3.19 %, siendo superior a los tratamientos de los tres microorganismos asociados y el Control. Por

el contrario, en la medición a los 120 ddt ($Pr > F 0.8534$), no se aprecian diferencias significativas en los tratamientos debido a que presentaron resultados similares.

Según los porcentajes de absorción del Nitrógeno total mostrados en el cuadro 6, el tratamiento *Trichoderma* sola en comparación con el Control tiene una mayor absorción de +0.7 %. De igual manera el tratamiento *Trichoderma* asociado con la *Micorriza* alcanzó en este momento de aplicación del ^{15}N el mayor incremento de Nitrógeno total con +0.71 %, lo que indica que estos dos microorganismos a los 60 días después de incorporados favorecen en una mayor acumulación del Nt a la planta, donde la *Micorriza* solo contribuye el +0.01 %.

Se puede observar en el Cuadro 6, que el tratamiento de los tres organismos biológicos asociados con la planta en comparación con el Control tiene una mayor absorción de +0.4 %. Al separar el efecto *Trichoderma* resulta que la *Micorriza* y *Rhizobium* se reduce en -0.3 % la absorción del Nitrógeno total por el patrón. A sí mismo, *Rhizobium* sin los dos organismos presenta un valor negativo de -0.31 %, lo que indica que en este momento de aplicación de ^{15}N esta bacteria no tiende a contribuir una mayor absorción al patrón Citrange carrizo.

El análisis estadístico realizado (Cuadro 5) a la variable Nitrógeno derivado del fertilizante indica que la medición realizada a los 90 dda ($Pr < F 0.0001$) estiman diferencias significativas donde el tratamiento *Trichoderma* más *Micorriza* y *Rhizobium* dieron un incremento del Nddf con 24.20 %, seguido de *Trichoderma* sola con 19.84 %, en tercer lugar, ubica el tratamiento *Trichoderma* más *Micorriza* con 13.68 %, por último, se encuentra el Control con 13.52 %. Seguidamente en la medición 120 ddt ($Pr < F 0.0761$), muestran que no se detectaron diferencias significativas.

En el Cuadro 6, se muestra los porcentajes de absorción del Nitrógeno derivado del fertilizante donde el tratamiento *Trichoderma* sola en comparación con el Control presenta un incremento de +6.32 %. De igual manera el tratamiento *Trichoderma* más *Micorriza* demuestran una absorción positiva de +0.16 %. Sin embargo, la *Micorriza* presenta el -6.16 %, donde no favorece a la planta en obtener una mayor absorción de nitrógeno procedente del fertilizante. Se puede observar que el tratamiento *Trichoderma* más *Micorriza* y *Rhizobium* en comparación con el Control presenta un efecto positivo de +10.68 % donde presenta un beneficio al patrón Citrange carrizo en obtener una mayor absorción. Al eliminar el efecto *Trichoderma* resulta que de igual manera la *Micorriza* y

Rhizobium aportan de forma positiva el +4.16 %. Por lo tanto, *Rhizobium* sin los dos organismos muestra un incremento mayor de +10.52 %.

Los resultados del UEN en el patrón (Cuadro 5), el análisis dio ser estadísticamente diferente en cada una de las mediciones realizadas a los 90 ddt (Pr < F 0.0001) y 120 (Pr < F 0.0278) ddt. Donde en la medición 90 días después del trasplante el ¹⁵N el tratamiento *Trichoderma* presenta la mayor eficiencia con 2.56 %, el segundo mejor fue Control con 2.07 % y por último se encontró que los tratamientos *Trichoderma* más *Micorriza* y *Rhizobium* con 1.21 % y *Trichoderma* más *Micorriza* con 1.18 %.

Cuadro 5. Resultados de la aplicación de ¹⁵N a los 30 ddt del patrón Citrange carrizo en la respuesta de Nitrógeno total (Nt), Nitrógeno derivado del fertilizante (Nddf) y Uso eficiente del Nitrógeno (UEN) en las mediciones realizadas a los 90 y 120 ddt

Mediciones		Microorganismos				Pr = F
		Control	<i>Trichoderma</i>	<i>Tricho+Mico</i>	<i>Tricho+Mico+Rhi</i>	
90 ddt	Nt (%)	2.49 c	3.19 a	3.20 a	2.89 b	0.0006
	¹⁵ Nddf (%)	13.52 d	19.84 b	13.68 c	24.20 a	0.0001
	UEN (%)	2.07 b	2.56 a	1.18 c	1.21 c	0.0001
120 ddt	Nt (%)	2.50	2.38	2.52	2.55	0.8534
	¹⁵ Nddf (%)	17.73	14.59	9.89	12.42	0.0761
	UEN (%)	5.23 a	3.16 ab	1.81 b	0.81 b	0.0278

ddt: días después del trasplante.

Cuadro 6. Efecto individual de los microorganismos de la rizósfera en la aplicación de ¹⁵N a los 30 ddt del patrón Citrange carrizo en la respuesta de Nitrógeno total (Nt), Nitrógeno derivado del fertilizante (Nddf) y Uso eficiente del Nitrógeno (UEN) medidos a los 90 ddt

Aplicación ¹⁵ N	Microorganismos	Medición a los 90 ddt		
		Nt	¹⁵ Nddf	UEN
30 ddt	Control	2.49	13.52	2.07
	<i>Trichoderma</i>	3.19	19.84	2.56
	<i>Micorriza (Trichoderma)</i>	0.01	-6.16	-1.38
	<i>Rhizobium (Trichoderma + Micorriza)</i>	-0.31	10.52	0.03

Nota: Entre paréntesis, se excluye el aporte del o los microorganismos. ddt: días después del trasplante.

Con respecto al Uso eficiente del nitrógeno la presencia del *Trichoderma* sola en el sustrato mostró un mayor incremento con +0.49 % en comparación con el Control. Por el contrario, el tratamiento *Trichoderma* más *Micorriza* resultó con una eficiencia menor de

-0.89 %. Mientras el microorganismo *Micorriza* en combinación con *Trichoderma* presentó un resultado menor con -1.38 % de eficiencia (Cuadro 6).

A si mismo se observa en el cuadro cuadro 6, que el tratamiento de los tres microorganismos biológicos en comparación con el Control presenta un efecto negativo de - 0.86%, resultado que indica que el patrón dispone de menos ^{15}N y por lo tanto menor eficiencia. Al eliminar el efecto *Trichoderma* resulta que la *Micorriza* y *Rhizobium* indica un valor de -1.35 %. Al separar el efecto de *Trichoderma* y *Micorriza* del *Rhizobium*, este último muestra un aporte positivo pero muy bajo en eficiencia de uso de fertilizante de +0.03 %.

5.3.3. Respuesta de ^{15}N aplicado a los 60 días después del trasplante

El análisis estadístico realizado a la variable Nitrógeno total evaluadas a los 90 ddt (Pr >F 0.1990), muestra que no existe diferencias significativas en los tratamientos debido a que presentaron resultados similares. Según los aportes de los tratamientos inoculados se observa diferencias numéricas con respecto al Control (Cuadro 8). Donde la *Trichoderma* sola tiene una mayor concentración de + 0.13 %, siendo la que brinda un mejor aporte del Nitrógeno total. De igual manera el tratamiento *Trichoderma* más *Micorriza* favorece en una mayor absorción de + 0.23 %, al separar el efecto de la *Trichoderma* resulta que la *Micorriza* muestra un aporte menor + 0.1 % (Cuadro 7).

El tratamiento donde se inocularon los tres microorganismos en comparación con el Control muestra una acumulación de Nitrógeno muy baja +0.01 %. Al eliminar el efecto de *Trichoderma* indica que la *Micorriza* y *Rhizobium* presentó un efecto negativo - 0.12 %, a si mismo al separar el efecto de *Trichoderma* y *Micorriza* del *Rhizobium*, este última muestra el - 0.22 % de absorción.

Se aprecia en el Cuadro 7, que la medición a los 120 ddt (Pr < F 0.0070) se encontró diferencia estadística en los tratamientos evaluados, donde *Trichoderma* más *Micorriza* presentó mayor concentración de nitrógeno total con 2.91 %.

En el cuadro 7 se observa que para la variable nitrógeno derivado del fertilizante existen diferencias significativas en la medición a los 90 ddt (Pr > F 0.0001), donde el tratamiento de los tres organismos biológicos obtuvo el mayor incremento con 14.88 %, seguido la *Trichoderma* sola con 6.24 %, en tercer lugar, encontramos *Trichoderma* más *Micorriza*

con 5.69 %, en la última categoría se ubica el tratamiento Control con 1.89 %. Sin embargo, en la medición 120 dda ($Pr > F 0.0874$), no se aprecian diferencias significativas en los tratamientos.

Los resultados en el Cuadro 8, indican que los porcentajes de absorción del Nddf a los 90 ddt *Trichoderma* sola en comparación con el Control muestra un aporte de +4.35 %. De igual manera el tratamiento *Trichoderma* más *Micorriza* contribuyen de manera positiva + 3.8 %. Sin embargo, la *Micorriza* presenta una acción negativa -0.55 %, donde no favorece a la planta en obtener una especificidad del elemento mineral. Seguidamente se aprecia que el tratamiento de los tres microorganismos en comparación con el Control presenta un efecto positivo de +12.99 %. Al excluir el efecto *Trichoderma* resulta que la *Micorriza* y *Rhizobium* aportan el +8.64 %. Por lo tanto, *Rhizobium* sin los dos organismos muestra un aporte de +9.19 %, lo que indica que los tres organismos biológicos son eficientes en aportar el Nddf a la planta (Cuadro 8).

(Federico *et al.*, 2013), argumentan que “las asociaciones de *Rhizobium* y *Micorrizas arbusculares* (MA) actúan sinérgicamente en los niveles de infección, nutrición mineral y crecimiento de las plantas. A si mismo mencionan que:

El principal efecto de las MA debe realzar la actividad con *Rhizobium* es a través de una estimulación generalizada de la nutrición del hospedante, aunque pueden ocurrir algunos efectos más localizados a nivel de raíz. (p. 131)

El Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), (1990) afirma que “la eficiencia en la utilización de fertilizantes consiste en una medida cuantitativa de la absorción real de los nutrientes del fertilizante por planta en relación con la cantidad de nutrientes que se añade al suelo” (p. 149).

El uso eficiente del fertilizante indica que existe diferencias significativas en la medición a los 90 ddt ($Pr < F 0.0001$) ubicándose en la primera categoría el tratamiento *Trichoderma* más *Micorriza* y *Rhizobium* con 1.04 %, seguido *Trichoderma* más *Micorriza* con 0.49 %, en tercer lugar, se encuentra *Trichoderma* sola con 0.35 % y por último el tratamiento Control con 0.28 %. Por el contrario, en la extracción 120 ddt ($Pr < F 0.2487$) no existieron diferencias estadísticas (Cuadro 7).

Cuadro 7. Resultados de la aplicación de ^{15}N a los 60 ddt del patrón Citrange carrizo en la respuesta de Nitrógeno total (Nt), Nitrógeno derivado del fertilizante (Nddf) y Uso eficiente del Nitrógeno (UEN) en las mediciones realizadas a los 90 y 120 ddt

Mediciones	Microorganismos					
	Control	<i>Trichoderma</i>	<i>Tricho+Mico</i>	<i>Tricho+Mico+Rhi</i>	Pr = F	
90 ddt	Nt (%)	2.78	2.91	3.01	2.79	0.1990
	$^{15}\text{Nddf}$ (%)	1.89 d	6.24 b	5.69 c	14.88 a	0.0001
	UEN (%)	0.28 d	0.35 c	0.49 b	1.04 a	0.0001
120 ddt	Nt (%)	2.36 b	2.19 c	2.91 a	2.66 ab	0.0070
	$^{15}\text{Nddf}$ (%)	18.17	5.92	6.94	9.61	0.0874
	UEN (%)	2.18	1.55	1.05	1.62	0.2487

ddt: días después del trasplante.

Cuadro 8. Efecto individual de los microorganismos de la rizósfera en la aplicación de ^{15}N a los 60 ddt del patrón Citrange carrizo en la respuesta de Nitrógeno total (Nt), Nitrógeno derivado del fertilizante (Nddf) y Uso eficiente del Nitrógeno (UEN) medidos a los 90 ddt

Aplicación ^{15}N	Microorganismos	Medición a los 90 ddt		
		Nt	$^{15}\text{Nddf}$	UEN
60 ddt	Control	2.78	1.89	0.28
	<i>Trichoderma</i>	2.91	6.24	0.35
	<i>Micorriza (Trichoderma)</i>	0.01	-0.55	0.14
	<i>Rhizobium (Trichoderma + Micorriza)</i>	-0.22	9.19	0.55

Nota: Entre paréntesis, se excluye el aporte del o los microorganismos. ddt: días después del trasplante.

Se evidencia en el Cuadro 8, los porcentajes del uso de eficiencia del nitrógeno donde el tratamiento *Trichoderma* sola en comparación con el Control presenta una eficiencia de +0.07 %. De igual manera el tratamiento *Trichoderma* más *Micorriza* es más eficiente con un +0.21 %, por tanto, la *Micorriza* responde el +0.14 %.

Así mismo se estima que en esta aplicación del ^{15}N donde se incorporó a los 0 días los tres microorganismos en comparación con el Control se presenta un aumento en la eficiencia +0.76 %, lo que indica que estos benefician a la planta en obtener un mayor incremento. Al eliminar el efecto *Trichoderma* resulta que la *Micorriza* y *Rhizobium* aportan el +0.69 %. Por lo tanto, la *Rhizobium* sin los dos organismos muestra un valor de +0.55 % (Cuadro 8).

5.3.4. Respuesta de ^{15}N aplicado a los 90 días después del trasplante

El análisis estadístico realizado para la variable Nitrógeno Total, indica que la medición a los 120 ddt ($\text{Pr} < \text{F} 0.0034$), muestra diferencias significativas, siendo el tratamiento que presentó mayor acumulación *Trichoderma* sola con 2.92 %, y el que demostró baja absorción fue *Trichoderma* más *Micorriza* con 2.24 % (Cuadro 9).

Se observa en el Cuadro 9, los porcentajes de absorción del Nitrógeno total donde el tratamiento *Trichoderma* sola alcanzó en este momento de aplicación de ^{15}N la mayor absorción en comparación con el Control donde presenta un aporte de + 0.18 %, lo que demuestra que a los 120 días después de la inoculación, el hongo está en un máximo desarrollo, beneficiando al patrón Citrange carrizo.

Por el contrario, el tratamiento *Trichoderma* más *micorriza* demuestran una absorción negativa -0.5 %, donde la *Micorriza* responde el - 0.68 %, lo que indica que este microorganismo no beneficia al patrón Carrizo en brindar un mayor aporte de nitrógeno.

De igual manera se observa que el tratamiento *Trichoderma* más *micorriza* y *Rhizobium* en comparación con el Control presenta una acción negativa de -0.3 %. Al eliminar el efecto *Trichoderma* resulta que a sí mismo la *Micorriza* y *Rhizobium* contribuyen de forma negativa -0.48 %. Por lo tanto, la *Rhizobium* sin los dos organismos muestra un incremento mayor de +0.2 %, lo que demuestra que la bacteria mejora la capacidad de absorción (Cuadro 10).

Para el nitrógeno derivado del fertilizante el análisis estadístico realizado en la medición 120 ddt ($\text{Pr} > \text{F} 0.0741$), no se aprecian diferencias significativas entre tratamientos debido a que presentaron resultados similares (Cuadro 9).

Según los aportes de los tratamientos inoculados se observa diferencias numéricas con respecto al Control (Cuadro 8), donde la *Trichoderma* sola tiene un decremento -2.07 %. *Trichoderma* más *Micorriza* ayuda en una mayor concentración de +0.23 %, donde la *Micorriza* sin el efecto de *Trichoderma* muestra un aporte +0.1 %.

El tratamiento donde se inocularon los tres microorganismos en comparación con el Control muestra una acción negativa -5.07 %. A si mismo al eliminar el efecto de *Trichoderma* indica que la *Micorriza* y *Rhizobium* presentó -3 %, de igual manera al

separar el efecto de *Trichoderma* y *Micorriza* del *Rhizobium*, este última muestra el -5.81 %.

En el UEN se estiman diferencias estadísticas a los 120 ddt (Pr < F 0.0010) en los tratamientos, siendo la *Trichoderma* más *Micorriza* quien presentó mayor eficiencia 2.77 % y Control 2.49 %, luego se ubica en la segunda categoría los tratamientos *Trichoderma* sola 1.39 % y *Trichoderma* más *Micorriza* y *Rhizobium* 1.39 % (Cuadro 9).

Se evidencia en el Cuadro 10, los porcentajes del uso de eficiencia del nitrógeno donde el tratamiento *Trichoderma* sola en comparación con el Control presenta un efecto negativo de -1.1 %. Sin embargo, el tratamiento *Trichoderma* más *Micorriza* es más eficiente en este momento de aplicación debido a que presenta un valor de +0.28 %, donde, la *Micorriza* aporta el +1.38 %, lo que demuestra que el asocio de estos organismos responde una mejor concentración al patrón Citrange carrizo.

Se indica en el Cuadro 10, que el tratamiento *Trichoderma* más *Micorriza* y *Rhizobium* en comparación con el Control presenta un efecto negativo de -1.69 %, de igual manera al eliminar el efecto *Trichoderma* resulta que la *Micorriza* y *Rhizobium* no son eficientes debido a que muestra el -0.59 %. A sí mismo, *Rhizobium* sin los dos organismos muestra deficiencia con un valor de -1.97 %.

Cuadro 9. Resultados de la aplicación de ¹⁵N a los 90 ddt del patrón Citrange carrizo en la respuesta de Nitrógeno total (Nt), Nitrógeno derivado del fertilizante (Nddf) y Uso eficiente del Nitrógeno (UEN) en la medición realizada a los 120 ddt

Medición	Microorganismos				Pr = F	
	Control	<i>Trichoderma</i>	<i>Tricho+Mico</i>	<i>Tricho+Mico+Rhi</i>		
120 ddt	Nt (%)	2.74 ab	2.92 a	2.24 c	2.44 b	0.0034
	¹⁵ Nddf (%)	13.68	11.61	14.42	8.61	0.0741
	UEN (%)	2.49 a	1.39 b	2.77 a	0.80 b	0.0010

ddt: días después del trasplante

Cuadro 10. Efecto individual de los microorganismos de la rizósfera en la aplicación de ^{15}N a los 90 ddt del patrón Citrange carrizo en la respuesta de Nitrógeno total (Nt), Nitrógeno derivado del fertilizante (Nddf) y Uso eficiente del Nitrógeno (UEN) medidos a los 120 ddt

Aplicación ^{15}N	Microorganismos	Medición a los 120 ddt		
		Nt	$^{15}\text{Nddf}$	UEN
90 ddt	Control	2.74	13.68	2.49
	<i>Trichoderma</i>	2.92	11.61	1.39
	<i>Micorriza (Trichoderma)</i>	-0.68	2.81	1.38
	<i>Rhizobium (Trichoderma + Micorriza)</i>	0.2	-5.81	-1.97

Nota: Entre paréntesis, se excluye el aporte del o los microorganismos. ddt: días después del trasplante

El Cuadro 11, muestra las comparaciones del Nitrógeno marcado según los momentos de aplicación 0, 30, 60 y 90 ddt ^{15}N , y evaluándose su comportamiento días después de aplicado. De forma general, se observa que cuando el ^{15}N se aplicó al momento del trasplante 0 días muestran el mayor porcentaje de Nitrógeno derivado del fertilizante, con respecto a las otras aplicaciones realizadas a los 30, 60 y 90 ddt, éste primer momento presento la mayor acumulación por el patrón Citrange carrizo.

Con relación al Nt, se puede identificar que la presencia de *Trichoderma* mejora su absorción cuando la aplicación se realiza a los 30 ddt, lo que implica que favorece una mejor nutrición con respecto a este elemento. Un comportamiento similar tiene en el mismo momento de aplicación (30 ddt) la presencia de *Trichoderma + Micorriza*.

El UEN muestra una tendencia a incrementar el valor para el caso del tratamiento control donde no se incorporó microorganismo de la rizósfera, dándole la oportunidad a la planta de absorber el nitrógeno sin alguna competencia biológica. Por lo tanto, el tratamiento con el inoculante *Trichoderma* la eficiencia mostrada en la aplicación de ^{15}N a los 30 ddt, fue superior a los mostrados por el tratamiento control.

Cuadro 11. Resultados de Nitrógeno total (Nt), Nitrógeno derivado del fertilizante (Nddf) y Uso eficiente del Nitrógeno (UEN) por microorganismos inoculados según momentos de aplicación y evaluados a los días posteriores.

Aplicación ¹⁵ N	Dda	(%)	Microorganismos				Pr = F
			Control	Trichoderma	Tricho+Mico	Tri+Mic+Rhi	
0 ddt	30	Nt	2.62 b	1.46 d	1.97 c	2.75 a	0.0001
		¹⁵ Nddf	39.73 b	16.09 d	46.78 a	29.01 c	0.0001
		UEN	1.64 a	0.29 d	0.53 c	0.92 b	0.0001
30 ddt	60	Nt	2.49 c	3.19 a	3.20 a	2.89 b	0.0006
		¹⁵ Nddf	13.52 d	19.84 b	13.68 c	24.20 a	0.0001
		UEN	2.07 b	2.56 a	1.18 c	1.21 c	0.0001
60 ddt	30	Nt	2.78	2.91	3.01	2.79	0.1990
		¹⁵ Nddf	1.89 d	6.24 b	5.69 c	14.88 a	0.0001
		UEN	0.28 d	0.35 c	0.49 b	1.04 a	0.0001
90 ddt	30	Nt	2.74 ab	2.92 a	2.24 c	2.44 b	0.0034
		¹⁵ Nddf	13.68	11.61	14.42	14.42	0.0741
		UEN	2.49 a	1.39 b	2.77 a	0.80 b	0.0010

ddt: días después del trasplante, Dda: Días después de la aplicación

VI. CONCLUSIONES

La utilización de los tres microorganismos asociados sobre el desarrollo vegetativo del patrón Citrange carrizo presenta un aporte positivo diferenciado en comparación con el tratamiento Control en cada aplicación del ^{15}N , por su parte *Trichoderma* sola mostró mejores resultados en las aplicaciones a los 30, 60 y 90 días de ^{15}N en las variables altura de plantas y diámetro del tallo.

En el análisis de clorofila se encontró diferencia significativa entre los tratamientos en la aplicación a los 90 ddt ^{15}N durante la medición a los 120 ddt.

El patrón Citrange carrizo acumuló una mayor concentración del Nitrógeno derivado del fertilizante en la aplicación de ^{15}N a los 0 ddt, lo que conllevará a una aplicación temprana. Por otro lado, la concentración de Nitrógeno total y el UEN por el patrón Citrange carrizo fue muy bajo, por ende, no son necesarias las cantidades de fertilizante, es suficiente solo aplicar los microorganismos al momento del trasplante.

VII. RECOMENDACIONES

Continuar la investigación con mayor tiempo, en donde se evalúen distintos momentos de inoculación de microorganismos de la rizósfera, desde la germinación hasta el proceso de injertado del patrón (8 meses).

Evaluar otro tipo de microorganismo diazótrofos de vida libre que no necesitan de una leguminosa para fijar Nitrógeno (hospedante) como la *Azotobacter*, *Beijerinckia* y *Pseudomonas*, entre otras.

VIII. LITERATURA CITADA

- Aguilera, L., Olalde, V., Arriaga, M., y Contreras, R. (Febrero de 2007). Micorrizas Arbusculares. *Cienecia Ergo Sum*, 14(3), 300-306. https://www.researchgate.net/publication/26493794_Micorrizas_arbusculares
- Alarcon, A., y Cerrato, R. (julio-septiembre 1999). Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagacion de plantas fruticolas. *Tierra Latinoamericana*, 17(3), 179-191. <https://www.redalyc.org/pdf/573/57317302.pdf>
- Alcantara. (2010). *Estudio de la absorcion y traslocacion del nitrogeno en cítricos en función del aporte estacional del abono nitrogenado, mediante la técnica de dilucion isotópica*. <https://riunet.upv.es/handle/10251/8380>
- Almenares , G., Hernández, M., Torres, W., Varela, M., y Rosales, M. (abril-junio de 2015). Caracterización del desarrollo vegetativo y su relación con la fructificación y producción en naranjos [Citrus sinensis (L.) Osbeck]. *Cultivos Tropicales*, 36(2), 56-61. <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v36n2/ctr08215.pdf>
- Baca, B., Soto, L., y Pardo, M. (julio-agosto 2000). Fijacion biologica de nitrogeno. *Elementos: Ciencia y cultura*, 7(38), 43-49. <https://www.redalyc.org/pdf/294/29403808.pdf>
- Besantes, E. (2015). Empleo de tecnicas isotopicas en investigacion agricola, absorcion y recuperacion de fertilizantes en cultivos. *Revista CIENCIA*, 17((1)), 137-145. <https://journal.espe.edu.ec/ojs/index.php/ciencia/article/download/516/424>
- Birchler, T., Rose, R., Royo, A., y Pardos, M. (1998). *La planta ideal: revision del concepto, parametros definitorios e implementacion practica*. <https://recyt.fecyt.es/index.php/IA/article/view/2806>
- Blanco, F., y Salas, E. (1997). Micorrizas en la agricultura: contexto mundial e investigacionrealizada en costa rica. *Agronomia Costarricense*, 21(1), 55-67. https://www.mag.go.cr/rev_agr/v21n01_055.pdf
- Brahmaprakash, G., Kumar , P., Lavanya, G., Nair, S., Gangaraddi, V., & Gupta, A. (2017). Microbial Functions of the Rhizosphere. https://www.researchgate.net/publication/320062438_Microbial_Functions_of_the_Rhizosphere

- Caballero, N., y Soriano, B. (2014). Efecto de *Rhizobium etli* en el crecimiento de plántulas de caña de azúcar, *Saccharum officinarum*, en condiciones de laboratorio. *REBIOLEST*, 2(1), 1-12.
<https://core.ac.uk/download/pdf/267888717.pdf>
- Chiriboga, H., Gomez, G., y Garces, K. (2015). *Trichoderma spp. para el control biológico de enfermedades*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).
<https://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/2647/BVE17038725e.pdf;jsessionid=608B6AB459045AB42B8717FAE7970EB3?sequence=1>
- Cuadrado, B., Rubio, G., y Winston, S. (18 de Mayo de 2009). Caracterización de cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (con habilidad de nodulación) seleccionados de los cultivos de frijón caupi (*Vigna unguiculata*) como potenciales bioinóculos. *Ciencias Químico-Farmacéutica*, 38(1), 78-104.
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/15431/16208>
- Cubillos, J., Valero, N., Y Mejia, L. (2009). *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener). *Agronomía Colombiana*, 27(1), 81-86.
<https://www.redalyc.org/pdf/1803/180314730011.pdf>
- Duarte, J., y Chavarria, J. (2016). *Micorrizas y rhizobium: opciones agroecológicas para la nutrición del frijol (Phaseolus vulgaris L.)*, Managua-Ticuantepé 2016. [Tesis de grado, Universidad Nacional Agraria].
<https://repositorio.una.edu.ni/3677/1/tnf61b642.pdf>
- Fernandez , M, y Nuñez, A. (2003). *Patrones tolerantes al virus de la trsiteza de los cítricos en San Luis Potosí*. Instituto nacional de investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias.
<http://www.inifapcirne.gob.mx/Biblioteca/Publicaciones/74.pdf>
- Galindo-Flores, G., Castillo-Guevara, C., Campos-López, A., y Lara, C. (2015). Caracterización de las ectomicorrizas formadas por *Laccaria trichodermophora* y *Suillus tomentosus* en *Pinus montezumae*. *Botanical Sciences*, 93 (4), 855-863.
<http://www.scielo.org.mx/pdf/bs/v93n4/v93n4a16.pdf>
- García, S. (2011). *Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno*. Universidad de Salamanca. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3761553>

- Gaspar, M. (2017). *Los isótopos estables del nitrógeno ayudan a los científicos a optimizar el uso del agua y los fertilizantes*. Sesenta años contribuyendo al desarrollo.
https://www.iaea.org/sites/default/files/publications/magazines/bulletin/bull58-2/5821819_es.pdf
- Gonzales, A. (2012). Determinación del destino del nitrógeno aplicado a un cultivo de sesamo mediante la técnica isotópica. [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Asunción]. <https://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/TES-BN-016.pdf>
- Gonzales, L., y Arguello, C. (2019). *Cultivo de Citricos*. Proyecto de paquetes tecnológicos.
https://www.jica.go.jp/paraguay/espanol/office/others/c8h0vm0000ad5gke-att/gt_03.pdf
- Gonzalez, I., Infante, D., Vargas, Y., Ramirez, S., Garcia, T., Pons, B., Martinez, B., y Poteira, B. (agosto de 2019). Efecto de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg sobre indicadores de crecimiento y desarrollo de *Phaseolus vulgaris* L. cultivar BAT-304. *Revista De Proteccion Vegetal*, 34(2), 1-10. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522019000200004
- Guerra, B. (enero-marzo 2008). Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la agricultura sostenible. *Tecnología En Marcha*, 21((1)), 191-201.
https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/1352
- Hartman, H., y Kester, D. (1997). *Propagación de Plantas. Principios Prácticos*. Compañía Editorial Continental, S.A de S.V. Mexico.
https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/45969/mod_resource/content/1/Propagacion%20de%20plantas.pdf
- Hernandez, M. (2000). *Efecto de patrones de Citricos Tolerantes al Virus de los Citricos en el contenido nutrimental en naranja valencia (Citrus sinensis. Osbeck)*. Universidad autónoma de nuevo leon.
<https://core.ac.uk/download/pdf/76593968.pdf>
- Infante, D., Martínez, B., González, Noyma, y Reyes, Y. (abril 2009). Mecanismos de acción de trichoderma frente a hongos fitopatógenos. *Revista de proteccion de*

vegetal, 24((1)), 14-21.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002&lng=es&tlng=es.

Jiménez, R., y Gallo, P. (1993). *Micorrizas vesiculo arbuscular asociados con citricos en el valle de Azapa y region (CHILE)*.
[//www.idesia.cl/Vols/Numeros/IDESIA_12/CAP8MI1.PDF](http://www.idesia.cl/Vols/Numeros/IDESIA_12/CAP8MI1.PDF)

Kuzyakov, Y y Xu, X. (febrero 2013). Competencia entre raíces y microorganismos por el Nitrógeno: mecanismos y relevancia ecológica. *New Phytologist*. 198(3), 656-669. <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/nph.12235>

Lacayo, N. (11 de junio de 2013). Citricos amenazados. *El Nuevo Diario*.
<https://www.elnuevodiario.com.ni/economia/288686-citricos-amenazados/>

Llovera, L. (1999). *Uso de técnicas isotópicas de ¹⁵N aplicadas al estudio de la fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de alfalfa (Medicago sativa L) en la "comarca Lagunera" México*. Obtenido de https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwj0hKTUj5rnAhUJo1kKHdPiDW8QFjAAegQIAxAB&url=http%3A%2F%2Fprints.uanl.mx%2F6724%2F1%2F1080124348.PDF&usq=AOvVaw0QjSd9_82jsT2xyojzNvJc

Martin, G., Reyes, R., y Ramirez, J. (abril-junio 2015). Coinoculación de *Canavalia ensiformis* (L.) D.C. con *Rhizobium* y Hongos micorrízicos arbusculares en dos tipos de suelos de Cuba. *Cultivos Tropicales*, 36(2), 22-29.
http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v36n2/en_ctr04215.pdf

Martinez, B., Infante, D., y Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Proteccion Vegetal*, 28(1), 1-11.
<http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v28n1/rpv01113.pdf>

Montolla, J., Y Ordoñez, N. (2009). *Uso del clorofilometro spad-502 para diagnosticar la deficiencia de nitrógeno en sorgo (sorghum bicolor L. Moench) DE LA LINEA ICSVLM-92512 Bajo Diferentes Dosis De Nitrógeno en la Finca el Plantel. Zambrano, Masaya*. [Tesis de diplomado, Universidad Nacional Agraria].
<https://repositorio.una.edu.ni/2086/>

- Neyra, S., Terrones, L., Carranzal, L., Garcia, B., y Bernilla, B. (05 de Junio de 2013). Efecto de la inoculación de *Rhizobium etli* y *Trichoderma viride* sobre el crecimiento aereo y radicular de *Capsicum annum var longum*. *REBIOLEST*, *I*(1), 11-21.
<https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/ECCBB/article/view/176/181>
- Organismo Internacional De Energía Atómica; Viena. (1990). Empleo De Tecnicas Nucleares En Los Estudios De La Relacion Suelo-Planta.
- Pacheco, D. (2009). *"Efecto de Trichoderma arzianum y Trichoderma viride, en la produccion de plantas de cafe (coffea arabica) variedad caturra a nivel de vivero.*
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/334/1/13T0627%20.pdf>
- Paredes, M. (2013). *Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas.* Trabajo final de ingeniería en producción agropecuaria. Facultad de ciencias agrarias. Univesidad Catolica de Argentina.
<https://core.ac.uk/download/pdf/32621045.pdf>
- Pedraza, R., Samaniego, J., Alvarado, E., Valdes, D., y Ramirez, G. (enero-Junio de 2016). Una amenaza agrícola mundial: el virus de la tristeza de los cítricos y su vector el pulgón café *Toxoptera citricida*. *Artropodos y Salud*, *3*(1), 30-36.
<http://artropodosysalud.com/Publicaciones/No5-Abr2016/7Virustristeza.pdf>
- Pedrazal, R., Teixeira, K., Fernández, S., Garcia , I., Baca, B., Azcón, R., y Bonilla, R. (agosto-octubre 2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Revista Corpoica Ciencia y tecnologia agropecuaria*, *11*((2)), 155-164.
https://www.researchgate.net/publication/306023111_Microorganismos_que_mejoran_el_crecimiento_de_las_plantas_y_la_calidad_de_los_suelos_Revisio_n/link/57e969380aed0a291303b31/download
- Ramachandran, V., Shrivastava , S., y Souza, S. (2007). *Papel de los isótopos en suelo-planta, agua y Investigación de fertilidad.*
https://www.researchgate.net/publication/309322433_Role_of_Isotopes_in_Soil-Plant_Water_and_Fertility_Research

- Salazar, C., Lopez, R., Beltran, F., Beltran, T., Soto, C., y Solorzano, F. (2012). Manejo Fitosanitario del Cultivo de los Cítricos. Medidas para la temporada invernal. <https://www.ica.gov.co/getattachment/18307859-8953-4a7d-8d7f-864e3f4898cf/Manejo-fitosanitario-del-cultivo-de-citricos.aspx>
- Santillana, N., Arellano, C., y Zuniga, D. (enero-diciembre 2005). Capacidad del Rhizobium de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). *Ecologia Aplicada*, 4(1-2), 47-51. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162005000100007
- Torres, A. (2010). *Micorrizas: antigua interacción entre plantas y hongos*. Universidad Veracruzana. https://www.researchgate.net/publication/236119554_Micorrizas_Antigua_interaccion_entre_plantas_y_hongos
- Vanegas, M. (2002). *Guia Tecnica del Cultivo de Limon Persico*. Programa nacional de frutas de El Salvador. <http://repiica.ica.int/docs/B0217e/B0217e.pdf>
- Vélez, P., Meneses, R., y Dávila, D. (diciembre 2008). Estudio de las poblaciones microbianas de la rizófera del cultivo de papa (*solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecologia aplicada*, 7(1), 141-148. <https://studylib.es/doc/6119039/estudio-de-las-poblaciones-microbianas-de-la>
- Villalobos, A., y Vanegas, A. (2008). *Utilizacion del hongo trichoderma: una alternativa para producir sin causar daños al medio ambiente*. Centro de informacion pacifico central. <http://www.infoagro.go.cr/Infoagro/HojasDivulgativas/Utilizacion%20del%20hongo%20Trichoderma%20una%20alternativa%20para%20producir%20da%C3%B1ar%20el%20medio%20ambiente.pdf>

IX. ANEXOS

Anexo 1. Resultados estadísticos de altura del patrón (cm) según los momentos de aplicación del ^{15}N con los tratamientos evaluados.

Aplicación ^{15}N	Tratamientos	30 ddt	60 ddt	90 ddt	120 ddt
0 días ^{15}N	Control	15.49 a	21.85	29.25	42.70
	Trichoderma	14.30 ab	18.08	22.42	27.40
	Trich + Mico	13.49 ab	19.17	25.25	38.60
	Tricho + Mico +Rizh	11.77 b	15.72	20.75	27.70
	P=F	0.0369	0.3079	0.3718	0.2270
30 días ^{15}N	Control	12.70	17.42	25.17	31.40
	Trichoderma	14.96	19.17	24.82	33.10
	Trich + Mico	13.14	15.63	23	31.40
	Tricho + Mico +Rizh	12.57	14.33	17.92	23.90
	P=F	0.3630	0.1494	0.3159	0.6979
60 días ^{15}N	Control	14.37	18.92 ab	32.58 a	37.10
	Trichoderma	14.57	22.08 a	29.63 ab	38.66
	Trich + Mico	13.90	15.68 ab	22.33 ab	28.10
	Tricho + Mico +Rizh	12.03	13.52 b	18.50 b	26.10
	P=F	0.2763	0.0487	0.0219	0.1386
90 días ^{15}N	Control	14.61	18.42	27.58	37.50
	Trichoderma	13.14	17.25	26.42	36.40
	Trich + Mico	14.54	17.12	23.92	32.60
	Tricho + Mico +Rizh	12.33	16.08	21.42	25.20
	P=F	0.5035	0.8343	0.6949	0.3315

Anexo 2. Resultados estadísticos de diámetro del tallo (mm) según los momentos de aplicación del ^{15}N con los tratamientos evaluados.

Aplicación ^{15}N	Tratamientos	30 ddt	60 ddt	90 ddt	120 ddt
0 días ^{15}N	Control	2.53	3.75	4.40	5.04
	Trichoderma	3	3.75	3.92	4.18
	Trich + Mico	2.86	3.50	4.12	4.90
	Tricho + Mico +Rizh	2.79	3.25	3.42	4.56
	P=F	0.3436	0.2061	0.1068	0.5217
30 días ^{15}N	Control	2.71	3.58	4.20 a	5.28
	Trichoderma	2.86	3.67	4.43 a	4.94
	Trich + Mico	2.71	3.45	4.13 a	4.98
	Tricho + Mico +Rizh	2.64	3.12	3.22 b	4.14
	P=F	0.8273	0.2956	0.0405	0.3018
60 días ^{15}N	Control	3.14 a	3.70	4.35	5.24
	Trichoderma	2.93 ab	3.70	4.60	5.62
	Trich + Mico	2.64 ab	3.37	3.75	4.44
	Tricho + Mico +Rizh	2.64 ab	3.08	3.40	4.34
	P=F	0.0494	0.1591	0.0680	0.1433
90 días ^{15}N	Control	2.79	3.32	4.03	4.62
	Trichoderma	2.93	3.66	4.10	4.92
	Trich + Mico	2.79	3.33	3.68	4.50
	Tricho + Mico +Rizh	2.64	2.90	3.03	4.38
	P=F	0.8038	0.1021	0.2162	0.7790

Anexo 3. Resultados estadísticos de número de hojas por planta según con los momentos de aplicación del ^{15}N con los tratamientos evaluados.

Aplicación ^{15}N	Tratamientos	30 ddt	60 ddt	90 ddt	120 ddt
0 días ^{15}N	Control	16.43 a	20.50	24.80	31
	Trichoderma	12.71 b	16.33	18.17	22.60
	Trich + Mico	13.29 b	18.83	20.50	25.60
	Tricho + Mico +Rizh	12.14 b	15.50	17.83	22.25
	P=F	0.0090	0.2005	0.2057	0.3185
30 días ^{15}N	Control	16.14	18.33	23.67	26.60
	Trichoderma	15.57	15.60	19.80	22.25
	Trich + Mico	13.86	16.20	20.67	24.80
	Tricho + Mico +Rizh	12.43	13.83	17.17	16.75
	P=F	0.1356	0.2650	0.2282	0.2641
60 días ^{15}N	Control	15.29 ab	17.50	24.83	24.20
	Trichoderma	16.14 a	19.83	23	24.20
	Trich + Mico	13 b	15.40	20.40	22
	Tricho + Mico +Rizh	13 b	13.17	19.67	20.80
	P=F	0.0366	0.0612	0.3794	0.8680
90 días ^{15}N	Control	15	16.50	21.83	27.20
	Trichoderma	14.71	17.33	20	25.20
	Trich + Mico	12.86	16.67	21.83	25.20
	Tricho + Mico +Rizh	11.86	16.20	21.40	25
	P=F	0.0823	0.9370	0.9115	0.9151

Anexo 4. Resultados estadísticos del contenido de Clorofila según con los momentos de aplicación del ^{15}N con los tratamientos evaluados.

Aplicación ^{15}N	Tratamientos	30 ddt	60 ddt	120 ddt
0 días ^{15}N	Control	59.34 c	67.03	67.60
	Trichoderma	64.50 b	73.32	63.76
	Trich + Mico	74.99 a	67.57	63.34
	Tricho + Mico +Rizh	71.49 ab	73.58	71.48
	P=F	0.0053	0.1455	0.2354
30 días ^{15}N	Control	68.66	71.93	66.50
	Trichoderma	73.10	67.70	64.52
	Trich + Mico	62.41	60.93	67.96
	Tricho + Mico +Rizh	69.56	70.88	66.92
	P=F	0.4440	0.3474	0.9316
60 días ^{15}N	Control	69.93	67.78	70.86
	Trichoderma	70.34	71.55	71.30
	Trich + Mico	67.96	79.78	68.84
	Tricho + Mico +Rizh	65.96	61.27	75.32
	P=F	0.7498	0.0984	0.4720
90 días ^{15}N	Control	75.04	74.77	73 a
	Trichoderma	75.53	73.63	73.20 a
	Trich + Mico	73.51	71.97	67.14 b
	Tricho + Mico +Rizh	66.69	66.33	74.75 a
	P=F	0.0645	0.4075	0.0512

Anexo 5. Momentos de aplicación de ^{15}N solo o asociado con microorganismos de la rizósfera en el patrón Citrange carrizo.

