



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

APLICACIÓN DE BIOESTIMULANTES EN PORTAINJERTOS DE CÍTRICOS EN DOS FASES DE PRODUCCIÓN EN VIVERO CERTIFICADO

OYUKY LIBRADO DE LA CRUZ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO

2023



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

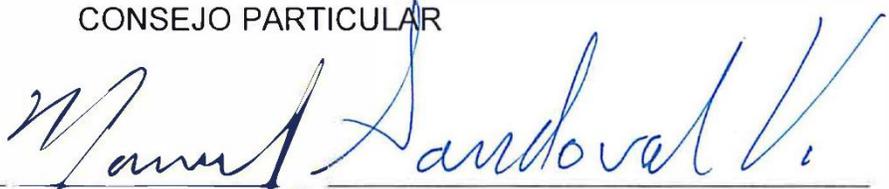
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: **Aplicación de bioestimulantes en portainjertos de cítricos en dos fases de producción en vivero certificado**, realizada por la estudiante: **Oyuky Librado de la Cruz**, con la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

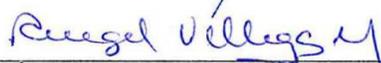
MAESTRA EN CIENCIAS
EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO


Dr. Manuel Sandoval Villa

ASESOR


Dr. Ángel Villegas Monter

ASESOR


Dr. Prometeo Sánchez García

Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, junio de 2023

APLICACIÓN DE BIOESTIMULANTES EN PORTAINJERTOS DE CÍTRICOS EN DOS FASES DE PRODUCCIÓN EN VIVERO CERTIFICADO

Oyuky Librado de la Cruz, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2023

RESUMEN

Los cítricos se ubican entre las cinco frutas económicamente más importantes del mundo, por esta razón para establecer una plantación, la selección del suelo y producción de las plantas en vivero son aspectos importantes a considerar. La producción de plantas de cítricos en condiciones de vivero en México se lleva a cabo de acuerdo a la NOM-079-FITO-2002; en ella se indican los cuidados para la producción de la planta en vivero certificado y movilización de material propagativo “libre” de enfermedades cuarentenarias. Sin embargo, se omite la calidad agronómica de la misma, porque no existen protocolos para la producción de plantas certificadas. El propósito de esta investigación fue evaluar el efecto de tres bioestimulantes comerciales; Raizal 400®, Ruter AA® y Humic + P®, en portainjertos de cítricos; limón Volkameriano (*Citrus volkameriana*) y Citrange C-35 (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) en dos fases de producción; tubete y bolsa en vivero certificado en Cazonas, Veracruz. En el primer experimento se evaluaron dos portainjertos; limón Volkameriano y Citrange C-35. Estos fueron trasplantados de charola a tubetes cónicos negros de 100 mL y se valoró el efecto de los tres bioestimulantes y un Testigo en cada portainjerto. El diseño experimental fue completamente al azar. En el segundo experimento se evaluaron los tres bioestimulantes y un Testigo en limón Volkameriano que fueron trasplantadas de tubetes de 140 mL a bolsas negras de polietileno de 4 L. El diseño experimental fue completamente al azar. En el primer experimento Humic+P fue el mejor tratamiento en la mayoría de las variables evaluadas para ambos portainjertos, por lo tanto, se obtuvieron plantas aptas para ser trasplantadas a los 90 días después del trasplante. En el segundo experimento, con Ruter AA y Raizal 400 a los 90 ddt estimularon mayor número de hojas, área foliar, densidad estomática y cantidad de raíces laterales. Los datos obtenidos del análisis de tejido foliar pueden tomarse de referencia para la producción de limón Volkameriano desarrolladas en bolsa en vivero en condiciones de invernadero. Con Ruter AA, se tienen plantas aptas para ser injertadas en tres meses.

Palabras clave: Raizal 400®, Ruter AA® y Humic + P®, limón Volkameriano y Citrange C-35

APPLICATION OF BIOSTIMULANTS IN CITRUS ROOTSTOCKS IN TWO PRODUCTION PHASES IN A CERTIFIED NURSERY

Oyuky Librado de la Cruz, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2023

ABSTRACT

Citrus species are among the five most economically essential fruits in the world, so to establish a plantation, soil selection and production of plants in nurseries are essential aspects to consider. The production of citrus plants under nursery conditions in Mexico is carried out following NOM-079-FITO-2002. This rule indicates the care for the plant's production in a certified nursery and the mobilization of propagative material "free" of quarantine diseases. However, its agronomic quality is omitted because there are no protocols for producing certified plants. This research evaluated the effect of three commercial biostimulants, Raizal 400®, Ruter AA®, and Humic + P® on rootstocks of Volkamerian lemon (*Citrus volkameriana*) and Citrange C-35 (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) in two production phases: tubes and bag in a certified nursery in Cazonas, Veracruz. The first experiment evaluated two rootstocks: Volkamerian lemon and Citrange C-35. These were transplanted from a tray into 100 mL black conical tubes, and the effect of the three biostimulants and control on each rootstock was evaluated. The experimental design was completely randomized. In the second experiment, the three biostimulants and a Volkamerian lemon control were evaluated and transplanted from 140 mL tubes into 4 L black polyethylene bags. The experimental design was completely randomized. In the first experiment, Humic + P was the best treatment in most of the variables evaluated for both rootstocks; therefore, plants suitable for transplanting were obtained 90 days after transplanting. The second experiment, with Ruter AA and Raizal 400 at 90 DAT, stimulated more leaves, leaf area, stomatal density, and quantity of lateral roots. The data obtained from the leaf tissue analysis can be taken as a reference to produce Volkamerian lemon developed in a bag in a nursery under greenhouse conditions. With Ruter AA, you have plants suitable for grafting in three months.

Keywords: Raizal 400®, Ruter AA® and Humic + P®, Volkamerian lemon and Citrange C-35

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnologías (CONACYT) por otorgarme la beca para estudiar la maestría.

Al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, especialmente al Postgrado de Edafología por brindarme la oportunidad de estudiar y concluir la maestría, así como, al laboratorio de Nutrición Vegetal por darme acceso a sus instalaciones.

Al Dr. Manuel Sandoval Villa quien aceptó ser mi consejero, gracias por la comprensión y accesibilidad durante la investigación, por su responsabilidad, tiempo y dedicación durante la revisión de tesis y atenciones en la parte académica y personal.

Dr. Ángel Villegas Monter por permitirme trabajar en el vivero Cazonas, gracias por su dedicación y pasión a su profesión como profesor-investigador, viverista y productor, ya que pude adquirir nuevos conocimientos durante el proceso. Agradezco su disponibilidad y dedicación durante la investigación en campo y revisión del presente documento, así como su amistad.

Dr. Prometeo Sánchez García por sus conocimientos, colaboración y apoyo brindado durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados.

Dra. María Guadalupe Peralta Sánchez por su colaboración durante mi estancia en el laboratorio de Nutrición Vegetal y la revisión del presente trabajo.

Agradezco a todos mis amigos y compañeros que colaboraron en este proyecto de investigación, tanto física, intelectual y emocionalmente.

DEDICATORIA

A Dios, por obsequiarme el don de la vida.

A mis padres, modelos de resiliencia, amor y perseverancia, gracias por siempre acompañarme a pesar de la distancia.

A mis hermanos, a quienes admiro y de los que he aprendido tanto, parte de lo que soy es por ustedes.

“Nada es tan grande que no valga la pena intentar, ni tan pequeño que no valga la pena vivir”

-Godínez G.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA.....	vi
LISTA DE CUADROS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	4
2.1. Objetivo general.....	4
2.2. Objetivos específicos	4
2.3. Hipótesis general	4
2.4. Hipótesis específicas	4
III. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
3.1. Importancia de viveros certificados.....	5
3.2. Producción de plantas en vivero certificado.....	6
3.3. Portainjertos.....	7
3.4. Contenedores	8
3.5. Sustratos.....	9
3.6. Nutrición.....	10
3.7. Bioestimulantes	11
3.7.1. Inoculantes microbianos.....	12
3.7.2. Sustancias Húmicas (SH).....	12
3.7.3. Hidrolizados de proteínas y aminoácidos	13
3.7.4. Elementos benéficos	13
3.8. Estomas.....	14
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1. Localización	16
4.2. Experimento 1: Producción de portainjertos de cítricos en tubete	16
4.2.1. Material vegetal	16
4.2.2. Diseño experimental y tratamientos	16

4.2.3.	Establecimiento del experimento.....	17
4.2.4.	Variables de crecimiento	18
4.2.4.1.	Crecimiento de la planta	18
4.2.4.2.	Diámetro del tallo.....	19
4.2.5.	Número de estomas	19
4.2.6.	Variables morfométricas	19
4.2.6.1.	Materia fresca, seca y contenido de agua en hojas, tallo y raíz	19
4.2.7.	Área foliar	20
4.2.8.	Determinación de nutrimentos en hojas	20
4.2.9.	Análisis estadístico	20
4.3.	Experimento 2: Producción en bolsa de limón Volkameriano	21
4.3.1.	Material vegetal	21
4.3.2.	Diseño experimental y tratamientos	21
4.3.3.	Establecimiento del experimento.....	21
4.3.4.	Variables de crecimiento	22
4.3.4.1.	Altura de la planta.....	22
4.3.4.2.	Diámetro del tallo.....	22
4.3.4.3.	Número de estomas	22
4.3.5.	Variables morfométricas	23
4.3.5.1.	Materia fresca, seca y contenido de agua en hojas, tallo y raíz	23
4.3.6.	Área foliar	23
4.3.7.	Determinación de nutrimentos en hojas	23
4.3.8.	Análisis estadístico	23
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
5.1.	Experimento 1. Desarrollo de portainjertos de cítricos en tubete.....	24
5.1.1.	Variables de crecimiento	24
5.1.1.1.	Crecimiento mensual de altura de la planta y diámetro del tallo.....	24
5.1.1.2.	Altura de la planta y diámetro del tallo a los 90 ddt	26
5.1.1.3.	Densidad estomática	30
5.1.2.	Variables morfométricas	32
5.1.2.1.	Peso de materia fresca y seca en parte aérea de la planta.....	32
5.1.2.2.	Peso de materia fresca y seca de la raíz.....	34

5.1.3.	Área foliar y número de hojas.....	37
5.1.4.	Determinación de nutrientes en tejido vegetal.....	39
5.1.4.1.	Macronutrientes.....	39
5.2.	Experimento 2: Producción en bolsa de limón Volkameriano	42
5.2.1.	Variables de crecimiento	42
5.2.1.1.	Crecimiento mensual en altura y diámetro de la planta.....	42
5.2.1.2.	Altura y diámetro de la planta.....	44
5.2.1.3.	Densidad estomática y número de hojas.....	46
5.2.2.	Variables morfométricas.....	48
5.2.2.1.	Peso de materia fresca y seca en parte aérea y raíz en limón Volkameriano 90 ddt.....	48
5.2.3.	Análisis químico nutrimental en hoja	50
VI.	CONCLUSIONES GENERALES	53
6.1.	Experimento 1.....	53
6.2.	Experimento 2.....	53
VII.	LITERATURA CITADA.....	54
	APÉNDICE	64

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Composición de los bioestimulantes.....	18
Cuadro 2. Peso de materia fresca y seca en parte aérea de limón Volkameriano y Citrange C-35 en tres bioestimulantes y Testigo a los 90 días después del trasplante en vivero en condiciones de invernadero.....	33
Cuadro 3. Peso de materia fresca, seca y porcentaje de agua en raíz de limón Volkameriano y Citrange C-35 en tres bioestimulantes y Testigo a los 90 días después del trasplante en vivero condiciones de invernadero.....	35
Cuadro 4. Concentración de macronutrientes en hojas de portainjertos de cítricos en etapa de tubete en condiciones de vivero por tratamiento a los 90 días después del trasplante.	40
Cuadro 5. Peso de materia fresca y seca de la raíz y cantidad de raíces laterales de segundo orden de limón Volkameriano en tres bioestimulantes y Testigo en vivero a los 90 días después del trasplante en condiciones de invernadero.....	50
Cuadro 6. Concentración de macronutrientes en hojas de limón Volkameriano en diferentes bioestimulantes y Testigo en etapa de bolsa en condiciones de invernadero a los 90 días después del trasplante.	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dinámica de crecimiento en altura de dos portainjertos de cítricos con bioestimulante Humic+P en vivero en condiciones de invernadero.....	25
Figura 2. Dinámica de crecimiento en diámetro de dos portainjertos de cítricos con bioestimulante Humic+P en vivero en condiciones de invernadero.....	26
Figura 3. Altura de Citrange C-35 en tres bioestimulantes y Testigo, en condiciones de vivero a los 90 días después del trasplante.....	27
Figura 4. Altura de limón Volkameriano en tres bioestimulantes y Testigo, en condiciones de vivero a los 90 días después del trasplante.....	27
Figura 5. Diámetro de Citrange C-35 en tres bioestimulantes y Testigo, en condiciones de vivero a los 90 días después del trasplante.....	28
Figura 6. A) Raíz principal y B) Raíces laterales de primer al cuarto orden del portainjerto C-35 con el bioestimulante Humic+P a los 90 ddt.	29
Figura 7. Raíces del portainjerto C-35 con el bioestimulante Humic+ a los 90 ddt.....	29
Figura 8. Densidad estomática mm ⁻² en limón Volkameriano en tres bioestimulantes y Testigo, en condiciones de vivero a los 90 días después del trasplante	30
Figura 9. Densidad estomática mm ⁻² en Citrange C-35 en tres bioestimulantes y Testigo, en condiciones de vivero a los 90 días después del trasplante.	31
Figura 10. Área foliar en limón Volkameriano en tres bioestimulantes y Testigo, en condiciones de vivero a los 90 días después del trasplante.....	37
Figura 11. Área foliar en Citrange 35 en tres bioestimulantes y Testigo, en condiciones de vivero a los 90 días después del trasplante.....	38
Figura 12. Dinámica de crecimiento de la altura en limón Volkameriano en tres bioestimulantes y Testigo desarrolladas en bolsa en espacio protegido..	42
Figura 13. Dinámica de crecimiento del diámetro en limón Volkameriano en tres bioestimulantes y Testigo desarrollados en bolsa en espacio protegido	43
Figura 14. Altura de planta en limón Volkameriano en tres bioestimulantes, 90 días después del trasplante en condiciones de invernadero.....	45
Figura 15. Densidad estomática en hojas de limón Volkameriano en tres bioestimulantes y Testigo a los 90 días después del trasplante en condiciones de invernadero.....	47

Figura 16.Número de hojas en limón Volkameriano en tres bioestimulantes y Testigo
a los 90 días después del trasplante en condiciones de invernadero..... 48

I. INTRODUCCIÓN

La citricultura es una actividad importante en diversas áreas del mundo. México destaca como primer productor y exportador de limas y limones, además de ser el cuarto productor mundial de pomelo y quinto de naranja. En 2021 se produjeron 8.6 millones de toneladas de cítricos, de las cuales 4.6 millones fueron de naranja y 2.85 de limón. Existen más de 64 mil 500 productores citrícolas que cultivan 532 mil ha y generan 207.7 millones de jornales al año en 24 estados del país, entre los que destacan Michoacán, Veracruz, Oaxaca, Colima, Tamaulipas, Jalisco, Tabasco, Guerrero, Yucatán y San Luis Potosí. Además, esta actividad genera empleos y desarrollo para las zonas productoras del país (SIAP, 2022).

El cambio más importante para la citricultura en México se dio cuando se detectaron las primeras plantaciones positivas a Huanglongbing (HLB) en junio de 2009. La presencia de enfermedades causadas por virus y bacterias en cítricos cambia el panorama de la citricultura en México; por lo que es necesario el trabajo coordinado y comprometido de la cadena productiva y los diferentes organismos de la agricultura, para impulsar la producción de cítricos y enfrentar los retos que implican las plagas, enfermedades y el cambio climático, con acciones que incluyan el manejo agronómico de huertos, derribo de árboles enfermos y resiembra con plantas provenientes de viveros certificados, emplear altas densidades de plantación, así como otras prácticas de manejo (riego, fertilización, control oportuno de plagas, etc.), para obtener mayores rendimientos desde los primeros años y considerar que la vida comercial de las plantaciones será menor (Villegas y Mora, 2011).

La producción de plántulas de cítricos en ambiente protegido es una alternativa al sistema tradicional de producción en viveros en campo. Los programas de certificación de material propagativo, proponen la producción en invernadero con el objetivo de mejorar las condiciones fitosanitarias, para obtener plantas con pruebas negativas al virus de la tristeza de los cítricos (VTC) y otros patógenos asociados a cítricos (De Campos-Bernardi *et al.*, 2000; Robles *et al.*, 2008).

La evolución de los portainjertos de cítricos a nivel mundial está ligada a la aparición de enfermedades. Se emplean por su capacidad de modificar la calidad de fruta, incrementar

el rendimiento, la concentración nutrimental en hojas, influenciar directamente la adaptabilidad al suelo y clima (González-Hernández *et al.*, 2020). También afectan directamente la capacidad de las plantas para absorber agua y nutrientes del suelo, por lo tanto, los portainjertos brindan al horticultor una herramienta útil para manipular el vigor y rendimiento de los árboles (Dubey y Sharma, 2016).

La producción de plántulas de cítricos en contenedor y en ambiente protegido se utiliza en Florida desde 1977, pero aún existe variación en la dosis y frecuencia de aplicación de fertilizantes. El crecimiento de las plantas en recipientes puede ser influenciado por el volumen limitado en el mismo y fertilidad del sustrato. Por lo que es necesario suministrar nutrientes en dosis adecuadas y equilibradas para estimular el máximo crecimiento y evitar pérdidas por lixiviación (De Campos-Bernardi *et al.*, 2000; Decarlos-Neto, 2002).

Los bioestimulantes se están integrando cada vez más en los sistemas de producción con el objetivo de modificar los procesos fisiológicos de las plantas para optimizar la productividad. Pueden utilizarse como aditivo para los fertilizantes y apoyar la absorción de nutrientes, promover el crecimiento de las plantas y aumentar la tolerancia al estrés abiótico (Yakhin *et al.*, 2017). El Consorcio de Industrias Europeas de Bioestimulantes (EBIC; por sus siglas en inglés) estableció el concepto de bioestimulante que se ha transpuesto al nuevo Reglamento de Productos Fertilizantes de la UE No. 2019/1009, que entró en vigor en julio de 2022. Este reglamento define a los bioestimulantes vegetales como “Un producto fertilizante cuya función es estimular los procesos de nutrición de las plantas independientemente del contenido de nutrientes del producto, con el único objetivo de mejorar una o más de las siguientes características de la planta o la rizósfera vegetal: tolerancia al estrés abiótico, características de calidad o aumento de la disponibilidad de nutrientes confinados en el suelo o la rizósfera” (EU, 2019). Con base en esta definición, los productos bioestimulantes se especifican sobre las funciones agrícolas e incluyen diversas sustancias naturales bioactivas; ácidos húmicos y fúlvicos, hidrolizados de proteínas animales y vegetales, extractos de macroalgas marinas y silicio, así como microorganismos benéficos (Hongos micorrízicos arbusculares y bacterias fijadoras de nitrógeno de cepas y pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Azotobacter* y *Azospirillum*). Por lo anterior, los productos comerciales utilizados en esta investigación se les denominaron bioestimulantes.

Por lo tanto, la presente investigación tiene como objetivo evaluar el efecto de tres bioestimulantes comerciales; Raizal 400®, Ruter AA® y Húmic + P®, en portainjertos de cítricos; limón Volkameriano (*Citrus volkameriana*) y Citrange C-35 (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*) en dos fases de producción; tubete y bolsa en un vivero certificado en Cazones, Veracruz.

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1. Objetivo general

Incrementar el desarrollo de los portainjertos de cítricos con la aplicación de bioestimulantes comerciales en las fases de producción de tubete y bolsa en vivero certificado.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar si alguno de los bioestimulantes; Ruter AA®, Humic + P® o Raizal 400®, tienen mayor influencia en el desarrollo de la raíz y parte aérea en plantas de limón Volkameriano y Citrange C-35 en etapa de tubete.
- 2) Evaluar si Ruter AA®, Humic + P® o Raizal 400® promueven mayor desarrollo en limón Volkameriano acortando el tiempo de producción para ser injertadas.

2.3. Hipótesis general

La aplicación de bioestimulantes promueve el desarrollo de raíz y vástago y afectan positivamente el crecimiento de los portainjertos de cítricos cultivados en tubete y bolsa.

2.4. Hipótesis específicas

- 1) Al menos uno de los bioestimulantes tendrá mayor efecto en el desarrollo de plantas en tubete.
- 2) Humic + P® disminuye el tiempo de producción en limón Volkameriano para ser injertado.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Importancia de viveros certificados

Para el establecimiento de una plantación de cítricos, la selección del suelo y producción de plantas en el vivero son aspectos cruciales. La sanidad del material de propagación, así como los cuidados durante el desarrollo de las plantas, son aspectos fundamentales durante toda la vida útil de la plantación. Plantas de baja calidad pueden originar huertos improductivos (Luis *et al.*, 2010; Orozco *et al.*, 2010).

La citricultura como actividad comercial se estableció en México a finales del siglo XIX en el municipio de Montemorelos, Nuevo León (Rocha, 2002). La citricultura nacional actual se estableció entre 1920 y 1950, con materiales traídos de California, Texas, Florida y España. Debido a que en esa época no existían programas de certificación, es probable que durante las primeras importaciones de material propagativo se hayan introducido y diseminado enfermedades sistémicas como los viroides; cachexia y exocortis, así como los virus; psorosis y tristeza de los cítricos, entre otros e incluso problemas genéticos (Wood pocket) (Robles *et al.*, 2008).

La certificación de material propagativo ayuda a limitar la introducción de enfermedades y prevenir su diseminación y establecimiento en una región o país. En 1982 se detectó por primera vez el VTC en Tamaulipas, posteriormente en 1986 en Veracruz, en ambas situaciones las plantas enfermas se erradicaron, pero en 1992 se volvieron a detectar plantas de viveros con pruebas positivas, mismas que fueron eliminadas. A raíz de los problemas fitosanitarios señalados, en agosto de 2001 se publicó la NOM-031-FITO-2000, dicha norma establece la campaña VTC de los cítricos, en ella se indica que no se debe utilizar naranjo Agrio (*C. aurantium*) como portainjerto, con excepción de limón mexicano (Villegas y Mora, 2011). Con el propósito de proveer plantas de calidad al Programa Nacional de Reconversión Productiva de la Cadena Citrícola se publicó en el Diario Oficial de la Federación la Norma Oficial Mexicana NOM-079-FITO-2002 requisitos fitosanitarios para producción y movilización de material propagativo con pruebas negativas a VTC y otros patógenos asociados a cítricos, en ella se establecen los requisitos para la certificación de bancos de germoplasma, lotes productores de yemas, huertas productoras de semillas y viveros para la producción de plantas certificadas (Robles *et al.*, 2008).

El programa “Reconversión citrícola” tuvo como objetivo transformar la citricultura mexicana en tecnificada, competitiva y eficiente; cumpliendo parámetros de sanidad y calidad; se adoptaron estrategias que permitieran minimizar el efecto del daño del VTC, por lo que se implementó la sustitución de variedades comerciales sobre portainjertos tolerantes, dentro de los que destacan mandarino cleopatra, Sun Chu Sha, Sunki; citrange Troyer y Carrizo, limón Volkameriano; naranjo Trifoliado y lima Rangpur. Con el propósito de ofrecer al productor plantas certificadas con pruebas negativas a virus y viroides, mismo que tendrá impacto en la calidad de frutos y en altos rendimientos (Pablo, 2018).

Desde la implementación del programa de certificación de cítricos hasta la fecha, aún existen viveros no certificados que propagan material vegetativo infectado, y no se han realizado acciones legales para eliminar dichos viveros, de ser así, el problema en la citricultura en México no terminara (Pablo, 2018). Eiras *et al.* (2013) plantean la necesidad de unir esfuerzos para incrementar e incentivar los programas de indexación, mantener plantas con pruebas negativas y desarrollar programas sanitarios con la finalidad de reducir la propagación de patógenos y otros agentes transmisibles por injertos.

3.2. Producción de plantas en vivero certificado

La producción en semillero y plantas de cítricos en los viveros a intemperie, donde es imposible el control de vectores, es riesgosa. Por esta razón es fundamental que se obtenga el material de propagación sano en ambiente protegido, que impida la entrada de insectos y ácaros vectores. Los viveros utilizados en los sistemas de producción de plantas de cítricos se basan en la realización de todas las operaciones en sistemas protegidos. Dichos sistemas buscan aislar las plantas, de las principales plagas de cítricos, particularmente de los vectores trasmisores de enfermedades de origen viral y micoplasmáticas (Arango *et al.*, 2010).

Debido a la amenaza de las enfermedades antes mencionadas, las áreas dedicadas a la producción de plantas de cítricos certificadas deberán de establecerse dentro de invernaderos, construidos con estructura metálica u otro tipo de material, cubierta con plástico calibre 600 a 700 (0.1524 a 0.1778 mm) para el techado, y malla anti-áfidos en las paredes. Además, toda la periferia de los aisladores deberá contar con faldón de plástico

de un metro de alto del calibre citado con anterioridad, una antesala con doble puerta con dimensiones mínimas de 1 m², cortina de aire y tapete fitosanitario (Sandoval, 2011).

Para producir plantas certificadas se requiere de al menos dos unidades de producción que son las siguientes: a) área productora de los portainjertos y b) área destinada al vivero productor de plantas certificadas de cítricos. Sin embargo, existe otra unidad de producción necesaria, más no indispensable, que es el lote productor de yemas certificadas. En caso de no contar con dicha unidad de producción, se debe adquirir este material propagativo en un lote productor de yema certificado aprobado por la Dirección General de Sanidad Vegetal (Sandoval, 2011).

3.3. Portainjertos

La evolución de los portainjertos de cítricos a nivel mundial está ligada a la aparición de enfermedades. Hasta el 2005 en México, el portainjerto más usado era el naranjo agrio, pero por su susceptibilidad al VTC, se promovió el uso de portainjertos tolerantes a dicha enfermedad (González-Hernández *et al.*, 2020). Debido a los problemas fitosanitarios y ambientales, se optó por hacer una nueva selección de portainjertos destacando; limón Volkameriano (*Citrus volkameriana* P.), macrofila (*Citrus macrophylla* W.), mandarina Amplicarpa (*Citrus amblycarpa* L.), Citrange C-35 (*C. sinensis* x *P. trifoliata*), citrange Carrizo (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) y citrumelo Swingle (*C. paradisi* x *Poncirus trifoliata*), como los más utilizados en México comercialmente.

Castle (2010) enfatiza que los portainjertos y los cultivares son la base de muchas industrias de árboles frutales del mundo. La búsqueda de nuevos portainjertos proviene de la pérdida de plantas por problemas fitosanitarios que se han presentado en las diferentes zonas cítricas, debido a un mal manejo cultural, por ende, reducción de la vida útil de los árboles. Debido a ello, es imprescindible la selección de nuevos portainjertos tolerantes a factores bióticos y abióticos, limitantes en la citricultura. Es importante que los nuevos portainjertos, induzcan árboles de porte pequeño, se ha reportado que plantas enanas generalmente presentan mayor eficiencia productiva, por lo que, permite mayor densidad de plantación y mayor producción por hectárea.

El portainjerto es esencial en la producción de plantas y la elección es importante, debido a que induce cambios en crecimiento, longevidad, tamaño, precocidad en la producción, peso de frutos, color, contenido de azúcar y acidez del fruto, transpiración foliar, composición química foliar, capacidad de absorción, síntesis y aprovechamiento de nutrientes, tolerancia o susceptibilidad a la salinidad, tolerancia al frío y enfermedades (Pérez, 2002; Do Nascimento *et al.*, 2018; Bisi *et al.*, 2020). La ventaja de obtener portainjertos apomícticos, es mantener la homogeneidad genética, ya que puede resultar ventajosa, esta condición como un proceso de multiplicación clonal. De esta forma, se pueden producir plantas uniformes a partir de semillas (González-Hernández *et al.*, 2020).

3.4. Contenedores

De acuerdo con Landis (1990), el contenedor es un envase que puede estar constituido por bloques enteros de celdas o de forma individual, mismos que contienen al sustrato, que abastece a las raíces con agua, aire, nutrientes minerales y además provee soporte físico. Existen varios diseños elaborados de diferente material y se han realizado pruebas con diferentes factores (sustratos, fertilizantes, fechas de plantación, etc.) con el objetivo de seleccionar el contenedor para la producción de plantas en vivero.

La producción de vivero cultivada en contenedores a gran escala comenzó a principios de la década de 1950 y ayudó a diversificar la industria de los viveros. En 1960 la mayoría de los contenedores de arcilla, metal, reciclado y madera, utilizados inicialmente, fueron remplazados por contenedores de plástico y se volvió más abundante debido a la facilidad de trasplante y producción o ventas durante todo el año (Nambuthiri *et al.*, 2015).

La elección del envase o contenedor es de suma importancia ya que permite el desarrollo óptimo de las raíces y equilibrado. Para los viveristas el contenedor adecuado es aquel que permite producir plantas, el menor tiempo posible. El tamaño depende de la duración de la planta en vivero, pues, determina la cantidad de agua, aire y nutrientes que estén disponibles para el crecimiento de las plantas, entre más grande sea el tamaño del envase más espacio se requerirá y mayor serán los costos de producción (Ortega *et al.*, 2006).

Las plantas cultivadas en contenedores son fáciles de manejar, transportar y son menos propensas a lastimarse. La mayor ventaja de la producción en envases puede reflejarse

en el éxito del establecimiento después del trasplante. El estrés hídrico después del trasplante es probablemente el factor más limitante para el crecimiento de las plantas y el principal factor del fracaso del mismo. El sistema de raíces en este esquema de producción, las plantas se manipulan y trasplantan con raíces intactos, lo que aumenta el potencial de éxito, a diferencia de las cultivadas en suelo, durante la excavación y el manejo de material a raíz desnuda muchas raíces finas quedan en el suelo. Cuando las raíces se dañan las plantas presentan estrés y en muchos casos mueren después del trasplante (Mathers *et al.*, 2007).

3.5. Sustratos

El término sustrato se refiere a todo material sólido diferente del suelo, que puede ser natural o sintético, mineral u orgánico y al ser colocado en contenedor, ya sea puro o mezclado, permite el anclaje de raíces; el sustrato puede intervenir o no en el proceso de nutrición de la planta. Por esto último, los sustratos se clasifican en químicamente inertes (perlita, lana de roca, roca volcánica, etc.) y químicamente activos (turba, corteza de pino, etc.). En el caso de los materiales químicamente inertes, actúan únicamente como soporte de la planta, mientras que en los restantes intervienen en procesos de adsorción y fijación de nutrimentos (Pastor, 1999).

Las características de los sustratos pueden ser físicas (densidad real, distribución granulométrica, porosidad y aireación, retención de agua permeabilidad, distribución de tamaños de poros y estabilidad estructural), químicas (capacidad de intercambio catiónico, pH, contenido de nutrimentos, relación C/N) y biológicas (contenido de materia orgánica y estado y velocidad de descomposición) (Pastor, 1999). Es importante mencionar que no existe un sustrato que proporcione todos los requerimientos para todas las situaciones, debido a que las condiciones físicas no son constantes (Macías *et al.*, 2010).

El uso de sustratos más específicos para cada cultivo proporciona mejor desarrollo de las plantas en menor tiempo, sin embargo, la mejor combinación de sustratos debe tener en cuenta la sostenibilidad, utilizando preferentemente los recursos disponibles en la zona donde se esté produciendo. El tipo de sustrato es el primer aspecto que se debe considerar para garantizar plantas de calidad. Es evidente que el sustrato afecta la arquitectura de las raíces y estado nutricional de las plantas. Producir portainjertos de cítricos en sustrato

y en ambiente protegido favorecen el desarrollo de calidad genética y sanitaria (Do Nascimento *et al.*, 2018).

3.6. Nutrición

Partiendo del concepto de nutriente vegetal mineral, Brown *et al.* (2022) lo definen como un elemento esencial o benéfico para el desarrollo de las plantas o para los atributos de calidad del producto cosechado de una especie de planta determinada que crece en su entorno natural o cultivado. Un nutriente vegetal puede considerarse esencial si el ciclo de vida de una diversidad de especies de plantas no puede completarse en ausencia del elemento. Un nutriente vegetal puede considerarse benéfico si no cumple con los criterios de esencialidad, pero puede demostrarse que beneficia el desarrollo de la planta o los atributos de calidad de una planta o producto cosechado. Entonces para que una planta complete la etapa vegetativa o reproductiva de su ciclo de vida requiere 17 elementos que se clasifican comúnmente como esenciales; carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O), nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), azufre (S), calcio (Ca), magnesio (Mg), cloro (Cl), boro (B), zinc (Zn), manganeso (Mn), hierro (Fe), cobre (Cu), molibdeno (Mo) y níquel (Ni) (Mengel y Kirby, 2000).

La dinámica de los nutrientes en los sustratos es diferente en comparación con los del suelo en los sistemas de cultivos en los que se utilizan contenedores, esto por la sinergia y antagonismo entre nutrientes debido a la temperatura y humedad en el sistema. Factores como tipo de recipiente, sustrato, especie, variedad, edad, tejido vegetal (hojas, tallos y raíces), características climáticas, prácticas culturales en vivero, tipo de fertilizante aplicado e interacciones entre los nutrientes pueden interferir con el desarrollo vegetativo y contenido nutricional de las plantas de cítricos (Scivittaro *et al.*, 2004; Serrano *et al.*, 2004; Fochesato *et al.*, 2006; Back *et al.*, 2017).

Entre los principales fertilizantes utilizados en la producción comercial de plantas de cítricos se destacan los solubles para fertirrigación y los de liberación controlada (Girardi *et al.*, 2005). La fertirrigación se adopta con mayor frecuencia en viveros, por su versatilidad, permitiendo ajustes en cada etapa fenológica del cultivo, sin embargo, llegan a ocurrir pérdidas de nutrientes por lixiviación por mal manejo de riego o por cantidades mal dimensionadas de fertilizantes (Boaventura *et al.*, 2004). Los fertilizantes de liberación

controlada, por otro lado, hacen que los nutrientes estén disponibles gradualmente, logrando así mayor eficiencia de uso por el cultivo. La liberación de nutrimentos es variable según el producto y depende de los niveles de humedad del sustrato, temperatura y/o actividad microbiana. Las desventajas del uso de este tipo de fertilizante son: costo, que es dos a cinco veces más elevado que los fertilizantes convencionales, el balance inadecuado y la liberación variable de nutrimentos y distribución heterogénea de las partículas de fertilizantes en el sustrato (Landis y Dumroese, 2009; Salgado y Núñez, 2010). Las ventajas son el suministro de nutrientes por tiempo prolongado, la eficacia en la liberación, pérdidas mínimas por lixiviación, los daños por toxicidad se reducen y las plantas llevan ciertas reservas de fertilizantes al momento que son establecidas en campo (Landis y Morgan, 2009).

3.7. Bioestimulantes

El concepto clásico de fertilizante (material que aporta nutrientes a las plantas) ha sido sustituido por el de “productos fertilizantes”, que incluyen materiales, sustancias, microorganismos y mezclas destinados a aportar nutrientes a las plantas o mejorar su eficacia nutricional. El nuevo reglamento introduce siete categorías de funciones de productos, una de las cuales son los bioestimulantes vegetales. El Consorcio de Industrias Europeas de Bioestimulantes (EBIC; por sus siglas en inglés) estableció el concepto de bioestimulante que se ha transpuesto al nuevo Reglamento de Productos Fertilizantes de la UE No. 2019/1009, que entró en vigor en julio de 2022. Este reglamento define a los bioestimulantes vegetales como “Un producto fertilizante cuya función es estimular los procesos de nutrición de las plantas independientemente del contenido de nutrientes del producto, con el único objetivo de mejorar una o más de las siguientes características de la planta o la rizósfera vegetal: tolerancia al estrés abiótico, características de calidad o aumento de la disponibilidad de nutrientes confinados en el suelo o la rizósfera” (EU, 2019).

Diversas sustancias o preparados complejos se han clasificado como bioestimulantes vegetales, incluidos extractos de algas y plantas; sustancias húmicas; materiales orgánicos complejos (de una amplia gama de fuentes); biopolímeros (quitosano y alginato) y oligómeros; hidrolizados de proteínas y mezclas de péptidos y aminoácidos libres;

aminoácidos únicos (ácido β -aminobutírico); sales inorgánicas (fosfitos); o elementos químicos (silicio) (Calvo *et al.*, 2014; Garza *et al.*, 2022; Sanjuán *et al.*, 2023).

3.7.1. Inoculantes microbianos

Los inoculantes microbianos generalmente se clasifican como agentes de biocontrol (biopesticidas) o biofertilizantes. Los inoculantes microbianos que actúan como biofertilizantes. Los biofertilizantes son productos biológicos que contienen microorganismos benéficos que, cuando se aplican a las semillas, las superficies de las plantas o suelo, promueven el crecimiento a través de varios mecanismos, como aumentar el suministro de nutrientes, aumentar la biomasa o área de las raíces y aumentar la capacidad de absorción de nutrientes de la planta (Vessey, 2003). Los biofertilizantes se pueden utilizar como complemento de los fertilizantes minerales (Canbolat *et al.*, 2006). Los inoculantes microbianos incluyen principalmente bacterias de vida libre y hongos micorrízicos arbusculares (Vessey, 2003; Berg, 2009; Dodd y Ruiz, 2012).

3.7.2. Sustancias Húmicas (SH)

Las sustancias húmicas son compuestos orgánicos formados a partir de residuos vegetales o animales presentes en los suelos, los cuales son degradados en un proceso conocido como humificación resultante de la actividad de microorganismos como hongos y bacterias (Muscolo *et al.*, 2013). Dependiendo sus características pueden clasificarse como a) ácidos húmicos; que son solubles en medios alcalinos, b) ácidos fúlvicos; solubles en medios alcalinos y ácidos, y c) huminas; que no son extraíbles del suelo. Los ácidos fúlvicos son responsables de la quelación y movilización de iones metálicos, incluidos Fe y Al. Dado su pequeño tamaño molecular pueden atravesar microporos de sistemas de membranas, mientras que los ácidos húmicos no pueden. La capacidad combinada de los ácidos fúlvicos para quelatar nutrientes como Fe y moverse a través de las membranas ha sugerido que los ácidos fúlvicos pueden desempeñar funciones similares como quelantes naturales en la movilización y transporte de Fe y otros micronutrientes (Calvo *et al.*, 2014).

Las SH parte de los mecanismos de acción es la capacidad de inducir cambios en la estructura en las raíces, favoreciendo su crecimiento y mejorando la asimilación de nutrientes. Por otro lado, pueden actuar como compuesto antioxidante, favoreciendo

algunas reacciones de óxido-reducción en suelos, sustratos o células vegetales. Ayudan a mejorar la estructura del suelo, aumentar la capacidad de intercambio de cationes, promueven la solubilidad del fósforo y mejoran la asimilación de nitratos (Aeschbacher *et al.*, 2012).

3.7.3. Hidrolizados de proteínas y aminoácidos

Los productos a base de proteínas se pueden dividir en dos categorías; hidrolizados de proteínas que consisten en una mezcla de péptidos y aminoácidos de origen animal o vegetal y aminoácidos individuales como glutamato, glutamina, prolina y glicina betaína. Los hidrolizados de proteínas (HP) son productos que pueden derivarse de origen animal (harina de sangre, subproductos de cuero, subproductos de pescado y plumas de aves) o de origen vegetal (heno de alfalfa, semillas de leguminosas y otros vegetales) (Calvo *et al.*, 2014; Colla *et al.*, 2015).

Los HP aumentan la actividad de enzimas como nitrato reductasa y glutamina sintetasa; estos están relacionados con la asimilación de N además de promover el metabolismo del carbono, aumentando la producción de auxinas y giberelinas, enzimas antioxidantes, pigmentos fotosintéticos y metabolitos secundarios (Colla *et al.*, 2015). Además, se ha demostrado que las aplicaciones de HP estimulan la biosíntesis de flavonoides y la vía de los fenilpropanoides (Colla *et al.*, 2017).

Los hidrolizados de proteínas y aminoácidos específicos, incluidos la prolina, betaína, sus derivados y precursores, pueden inducir respuestas de defensa de las plantas y aumentar la tolerancia a diversos estreses abióticos, que incluyen salinidad, sequía, temperatura y condiciones oxidativas (Calvo *et al.*, 2014).

3.7.4. Elementos benéficos

Los elementos benéficos no se consideran esenciales para las plantas, pero su presencia o aplicación afecta positivamente los parámetros de crecimiento y desarrollo (Pilone *et al.*, 2009). Los elementos más estudiados de este grupo son: silicio (Si), selenio (Se), yodo (I), vanadio (V), cobalto (Co) y titanio (Ti) (Vatansever *et al.*, 2017). Estos elementos pueden considerarse bioestimulantes porque pueden promover el crecimiento de las plantas y proporcionar tolerancia al estrés a través de mecanismos como fortalecimiento de las

paredes celulares, osmorregulación, síntesis de fitohormonas, mayor asimilación de elementos esenciales y reducción de la transpiración, entre otros (Du Jardin, 2015).

3.8. Estomas

Los estomas son poros diminutos que regulan la absorción de dióxido de carbono (CO₂) para la fotosíntesis desde la atmósfera al cloroplasto y evitan la pérdida excesiva de agua por transpiración. La pérdida de agua a través de los estomas también permite que las plantas regulen la temperatura de las hojas. En condiciones de sequía, los estomas protegen a las plantas contra la desecación al minimizar la pérdida de agua (Chen *et al.*, 2017). Xu *et al.* (2008) y Zhao *et al.* (2015) en hojas de *Leymus chinensis* y *Zea mays* estresadas por sequía moderada aumenta la densidad estomática. Sin embargo, en *Leymus chinensis*, *Pupulus balsamífera*, *Oryza sativa* y *Triticum aestivum*, las hojas que se desarrollaron en condiciones severas de estrés por sequía tenían densidad de estomas reducida en comparación con condiciones de riego y mostraron tolerancia a la sequía (Xu *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012; Ouyang *et al.*, 2017).

Existe una relación entre densidad y tamaño de estomas. Los estomas pequeños tienen características dinámicas más rápidas, lo que tiene implicaciones para mejorar la eficiencia del uso del agua a largo plazo y menor riesgo de interrupción del sistema hidráulico de la hoja, lo que permite que los estomas se abran y cierren más rápido, por lo tanto, respondan rápidamente al cambio ambiental (Drake *et al.*, 2013). En *Leymus chinensis* la densidad estomática se correlacionó positivamente con la tasa fotosintética neta, tasa de transpiración y la eficacia del uso del agua (Xu *et al.*, 2008).

Sofiyanti *et al.* (2022) evaluaron las características de estomas en cinco portainjertos de cítricos y concluyeron que todas las hojas muestran estomas tipo hipostomáticas y las densidades y tamaños variaron en cada uno, densidades altas se observaron en *C. aurantifolia* y *C. limon* con 685 y 541 estomas mm⁻² respectivamente, seguido de *C. amblicarpa*, *C. hystrix* y *C. microcarpa* con 453, 419 y 494 estomas mm⁻². En dimensiones largo y ancho *C. microcarpa* presentó 20.5 y 18.5 μm, seguido de *C. hystrix* 19.75 y 17 μm, *C. aurantifolia* 19.5 y 16.75 μm, *C. amblicarpa* 19.5 y 17 μm y *C. limon* 19 y 15.25 μm.

Es importante conocer la densidad y tamaño de los estomas del mismo cultivar entre diferentes portainjertos, ya que afecta la fotosíntesis y transpiración de los cultivares que serán injertados, repercutiendo en el crecimiento, producción y calidad de la fruta (Costa *et al.*, 2021).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se divide en dos experimentos. El primero se evaluaron tres bioestimulantes en dos portainjertos de cítricos en tubete; limón Volkameriano (*Citrus volkameriana*) y Citrange C-35 (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*). En el segundo se evaluó limón Volkameriano en bolsas de plástico de 4 L con los mismos bioestimulantes del primer experimento. Ambos trabajos se establecieron en espacio protegido en el vivero Cazonas.

4.1. Localización

El experimento se realizó en el vivero Cazonas, Cazonas de Herrera, Ver., localizado en la zona norte del estado de Veracruz, ubicado entre los paralelos, longitud 97°24'36.72" W, Latitud 20°36'56." N, a 10 m de altitud. Colinda al norte con el municipio de Tuxpan; al este con el Golfo de México; al sur con el municipio de Papantla; al oeste con el municipio de Tihuatlán. Tiene clima tropical, cálido subhúmedo con lluvias en verano, con un rango de temperatura de 24-26 °C y un rango de precipitación de 1400-1600 mm (INEGI, 2010).

4.2. Experimento 1: Producción de portainjertos de cítricos en tubete

4.2.1. Material vegetal

Se usaron dos portainjertos de cítricos provenientes de semillas, se usaron 64 plantas de limón Volkameriano (Volka), de 5 a 8 cm de altura con diámetro de 1.3 a 1.5 mm, y raíz de 4 a 5 cm, y 64 plantas de Citrange C-35 con altura de 5 a 10 cm, diámetro de 1 a 1.6 mm y longitud de raíz de 4 a 5 cm.

4.2.2. Diseño experimental y tratamientos

Se evaluó el efecto de tres bioestimulantes comerciales; Raizal 400® (presentación sólida), Ruter AA® (presentación líquida) y Humic+P® (presentación líquida) en dos portainjertos de cítricos (Volka y C-35), de igual, forma hubo un testigo absoluto (sin bioestimulante) en cada portainjerto.

El diseño experimental fue completamente al azar. Cada portainjerto se analizó de forma individual, con el objetivo de conocer el comportamiento de los bioestimulantes en cada

uno de ellos. Generando cuatro tratamientos en cada portainjerto. La unidad experimental fue una planta colocada en un tubete de plástico color negro de forma cónica con base circular con capacidad de 100 mL, con mezcla de sustratos; turba (Peat Moss Black Bale) (80 L), perlita (40 L) y vermiculita (40 L), se agregaron 200 g de Multicote AGRI® (18-6-12+2 MgO+ micronutrientes) y se adicionó aproximadamente 30 L de agua, de tal forma, que quedó totalmente humedecido, dicho sustrato tenía densidad aparente de 0.37 gm L⁻¹ y pH de 3.5.

4.2.3. Establecimiento del experimento

El experimento se estableció el 31 de mayo de 2022 y finalizó el 23 de agosto del mismo año. Las plantas para ser trasplantadas a tubete se extrajeron de la charola tomándolas del cuello para evitar romper raíces, se desecharon aquellas con raíces deformes y enroscadas, el resto se podaron de 4 a 5 cm, posteriormente se desinfestaron con fungicida (captan® 2 g L⁻¹). Previo al trasplante, con ayuda de un palillo cilíndrico de 15 cm de largo y 0.5 cm de diámetro, se hicieron orificios de 6 cm, aproximadamente en el sustrato, esto para evitar que las raíces se deformen al momento de introducirlas. Con el mismo palillo se apretó el sustrato para darle mejor sostén a la planta. Finalmente se regó a capacidad de retención del sustrato.

La aplicación de los bioestimulantes fue cada quince días, haciendo en total dos aplicaciones al sustrato, iniciando desde el día de trasplante (31 de mayo de 2022). Para los bioestimulantes Ruter AA® y Húmic+P® se usaron 2 mL L⁻¹ y para Raizal 400® 2 g L⁻¹. La aplicación fue de forma manual colocando 10 mL de la solución por tubete, en el **Cuadro 1** se muestra la concentración de cada producto. El Raizal 400, es el producto que se utiliza en el vivero. La finalidad es verificar si existen otros productos comerciales que sean más eficientes en esta etapa.

Para complementar la nutrición de la planta, cada tres semanas después del trasplante se aplicó Húmic+N vía foliar (2 mL L⁻¹), todo esto en lapso de tres meses, tiempo donde las plantas estuvieron aptas para ser trasplantadas a bolsa. En el **Cuadro 1** se observa la composición del fertilizante foliar. El riego se aplicó de acuerdo a la demanda de la planta (10 mL por tubete), considerando las condiciones climáticas y humedad del sustrato.

Cuadro 1. Composición de los bioestimulantes.

Composición	*Raizal 400® (%)	*Ruter AA® (%)	*Humic+P® (%)	*Humic+N® (%)
Nitrógeno total (N)	9	5.5	7	13
Nitrógeno (NH ₄ ⁺)	7	---	3.5	6.5
Nitrógeno (NO ₃ ⁻)	2	---	3.5	6.5
Fósforo (P ₂ O ₅)	45	5	13	7
Potasio (K ₂ O)	11	3.5	7	7
Magnesio (Mg)	1	---	0.62	0.62
Calcio (Ca)	---	---	1.0	1.0
Azufre (S)	0.8	---	1.20	1.20
Molibdeno (Mo)	---	0.10	0.001	0.001
Zinc (Zn)	---	0.076	0.10	0.10
Manganeso (Mn)	---	0.05	0.50	0.50
Hierro (Fe)	---	0.036	1.12	1.12
Cobre (Cu)	---	---	0.15	0.15
Boro (B)	---	---	0.05	0.05
Cobalto (Co)	---	---	0.005	0.005
Ácidos húmicos	---	---	20	20
Ácidos fúlvicos	---	---	20	20
Ácidos carboxílicos	---	---	18	18
Aminoácidos libres	---	7	---	---
Complejo auxínico	400 ppm	---	---	---

*Datos de acuerdo al fabricante.

4.2.4. Variables de crecimiento

Cada cuatro semanas después del trasplante hasta concluir el experimento en 16 plantas se midieron las siguientes variables:

4.2.4.1. Crecimiento de la planta

Se midió con una regla de aluminio plateado de 50 cm (Maped modelo: 26016, China). La medición se realizó antes del trasplante, se marcó el nudo más cercano al ápice, para tomarlo de referencia, la medida se realizó de la marca hasta el ápice de la planta, para medir únicamente el crecimiento, descartando la altura inicial de cada planta, ya que por las dimensiones los tubetes no se pudo medir desde el cuello de las plantas.

4.2.4.2. Diámetro del tallo

El diámetro se determinó con vernier digital (Truper, CALDI-6MP, México) a los 5 cm arriba del cuello de la planta.

4.2.5. Número de estomas

Se seleccionaron al azar cuatro portainjertos por tratamiento y se eligió una hoja entre la quinta y séptima del ápice hacia abajo, sin daños físicos. La impresión se realizó con pegamento instantáneo Kola Loca[®], se distribuyó uniformemente el pegamento en la parte media abaxial tanto a la derecha e izquierda de la nervadura central, posteriormente con la ayuda del dedo pulgar se presionó la hoja sobre un portaobjeto durante 30 segundos y después la hoja se retiró cuidadosamente. Las imágenes se tomaron con microscopio Tessorar (Carl Zeiss, Jena, Germany) con cámara digital (Canon EOS 100D, Japón) en combinación con lente (Canon EF-S 60 mm f/2.8 Macro USM, Taiwan) en el Programa de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Los campos observados se fotografiaron completamente al azar, obteniendo 128 imágenes por todos los tratamientos. Finalmente, por medio del programa Image J (Schneider *et al.*, 2012) se contaron los estomas por campo a 20X. El área de campo fue de 0.307 mm² y la densidad se reporta en 1 mm². La unidad de densidad estomática se expresó en número de estomas por mm².

4.2.6. Variables morfométricas

Después de tres meses, se realizó el análisis destructivo, el cual consistió en seleccionar doce plantas representativas por tratamiento, se trasladaron al laboratorio de Nutrición Vegetal en el programa de Edafología, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados y se tomaron los siguientes datos:

4.2.6.1. Materia fresca, seca y contenido de agua en hojas, tallo y raíz

Con regla metálica (Maped, modelo: 26016, China) se midió la altura de la planta desde el cuello hasta el meristemo apical, de igual forma, a los 10 cm de la base del cuello se midió el diámetro con vernier digital (Truper, CALDI-6MP, México). La biomasa de la parte aérea y raíz, fueron colocadas en bolsas de papel por planta en estufa de aire forzado (Riossa,

HCF-125D, México) por 72 h a 70 °C, para ser deshidratadas. En balanza digital (Adventurer Pro AV213C, Ohaus, EE. UU.), se determinó peso de materia fresca y seca de hojas, tallo y raíz por planta.

4.2.7. Área foliar

El área foliar se determinó con un integrador de área foliar (LI-COR, LI-3100C, Lincoln, NE, EE. UU.) y se cuantificaron las hojas.

4.2.8. Determinación de nutrimentos en hojas

Para el análisis nutrimental, la materia seca previamente se molió en una licuadora (Oster, EE. UU.). Se llevó a cabo digestión húmeda, donde se pesó 0.5 g de material vegetal previamente molido por tratamiento y se adicionó 5 mL de la mezcla de ácido nítrico-perclórico, dejándose predigestar durante la noche y posteriormente digestar en plancha de arena, en campana extractora Hamilton[®], modelo Safeaire a temperatura de 160 °C hasta que la solución presentara color claro. Completada la digestión, se aforó a 25 mL con agua desionizada, se filtró y finalmente se procedió a analizar los macronutrientes (P, K, Ca y Mg) por espectrometría de emisión atómica de inducción por plasma acoplado (Agilent, ICP-Optical Emission Spectrometer, 725-ES, EEUU). También se determinó nitrógeno total, con el método micro-Kjeldahl, se ocupó 10 mL de la muestra, como reactivos NaOH al 50% y H₃BO₃ al 4% con una mezcla de indicadores (verde de bromocresol y rojo de metilo). Una vez destiladas las muestras se titularon con H₂SO₄ al 0.05 N (Alcántar y Sandoval, 1999).

4.2.9. Análisis estadístico

Los datos se analizaron con las pruebas de Shapiro-Wilk ($p \leq 0.05$), los cuales resultaron normales y con homogeneidad de varianzas, por lo tanto, se procedió a realizar el análisis de varianza y prueba de comparación de medias con Tukey ($p \leq 0.05$), en el programa SAS (statistical analysis system) versión 9.0 para Windows.

4.3. Experimento 2: Producción de limón Volkameriano en bolsa

4.3.1. Material vegetal

Se utilizaron plantas de limón Volkameriano (*Citrus volkameriana*) de 34 a 43 cm de altura y 3 a 4 mm de diámetro, provenientes de tubetes (140 mL).

4.3.2. Diseño experimental y tratamientos

El diseño experimental fue completamente al azar, generando 4 tratamientos. La unidad experimental fue una planta colocada en bolsa de polietileno color negro de 4 L de capacidad, con mezcla de sustrato tierra de vega (225 L) y tepezil (113 L) (Proporción 2:1 v:v), añadiendo 200 g de azufre y 300 g de fertilizante Multicote 8® (15-7-15+2MgO+micronutrientes). El sustrato presentó las siguientes características físicas y químicas: densidad aparente 1.26 g cm³, pH 7.69 y materia orgánica 3.23% (Pacheco, 2022).

Se evaluó el efecto de tres bioestimulantes comerciales; Raizal 400® (presentación sólida), Ruter AA® (presentación líquida) y Humic+P® (presentación líquida) y Testigo absoluto. El Testigo absoluto se regó con agua y se aplicó el fertilizante Multicote 8® mezclado en el sustrato.

4.3.3. Establecimiento del experimento

El experimento se estableció el 7 de junio de 2022 y finalizó el 30 de agosto del mismo año. Las plántulas para ser trasplantadas a bolsas se extrajeron del tubete tomándolas del cuello para facilitar su extracción evitando destruir el cepellón, las raíces se podaron de 10 a 12 cm y el corte se desinfectó con sales cuaternarias de amonio (1 g L⁻¹), también se aflojaron cuidadosamente las raíces, para favorecer su crecimiento en la bolsa. Antes del trasplante el sustrato se humedeció completamente para hacer las perforaciones, se colocó una planta en cada bolsa. Con la mano se apretó el sustrato para dar mayor sostén a la planta, finalmente cada planta se regó con agua (250 mL aproximadamente).

En México pocos viveros utilizan tubetes para el desarrollo de portainjertos, pero es de suma importancia el uso de ellos para obtener plantas de calidad, con buen desarrollo de

raíz, de igual forma, para mantener la calidad de la planta para injertar es importante encontrar el tamaño óptimo.

Los bioestimulantes se aplicaron al sustrato cada cuatro semanas, en tres ocasiones, iniciando el 7 de junio de 2022. Se aplicaron 2 g y 2 mL del producto según su estado físico (polvo o líquido), aplicados con 250 mL de agua. El Testigo tuvo fertilizante que se agregó a la mezcla del sustrato Multicote 8® (3.5 g por planta). A todas las plantas, excepto las del testigo se les aplicó de forma foliar 2 mL L⁻¹ de Humic+N cada tres semanas después del trasplante durante tres meses, tiempo en que las plantas estuvieron aptas para ser injertadas. La frecuencia de riego se hizo de acuerdo a la demanda de la planta (250 mL por bolsa). Cabe destacar que el Raizal 400, es el producto que se ocupa de forma convencional en el vivero en esta etapa, el objetivo es ver si otros productos comerciales son más eficientes.

4.3.4. Variables de crecimiento

Cada cuatro semanas después del trasplante hasta concluir el experimento en 10 plantas se midieron las siguientes variables:

4.3.4.1. Altura de la planta

Se midió con una regla de aluminio de 50 cm (Maped 26016, China), desde el cuello de la planta hasta el ápice.

4.3.4.2. Diámetro del tallo

El diámetro se determinó con vernier digital (Truper, CALDI-6MP, México) a los 10 cm arriba del cuello de la planta.

4.3.4.3. Número de estomas

Se tomó una hoja entre la sexta y décima del ápice hacia abajo, sin daños físicos. La impresión se realizó con pegamento instantáneo Kola Loca®, el procedimiento se describió en 4.2.5. Los campos observados se fotografiaron completamente al azar, obteniendo 16 imágenes por tratamiento. Finalmente, por medio del programa Image J (Schneider *et al.*, 2012) se contaron los estomas por campo a 20X. El área de campo fue de 0.307 mm² y la

densidad se reporta en 1 mm^2 . La unidad de densidad estomática se expresó en número de estomas por mm^2 .

4.3.5. Variables morfométricas

Después de tres meses, se realizó el análisis destructivo, el cual consistió en seleccionar cuatro plantas representativas por tratamiento que fueron trasladadas al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo y se tomaron los siguientes datos:

4.3.5.1. Materia fresca, seca y contenido de agua en hojas, tallo y raíz

Con regla metálica (Maped, modelo: 26016, China) se midió la altura de la planta desde el cuello hasta el meristemo apical, de igual forma, a los 10 cm de la base del cuello se midió el diámetro con vernier digital (Truper, CALDI-6MP, México). En una balanza digital (Adventurer Pro AV213C, Ohaus, EE. UU.), se determinó peso de materia fresca y seca de hojas, tallo y raíz por planta. La biomasa de la parte aérea y raíz, fueron colocados en bolsas de papel en una estufa de aire forzado (Riossa, HCF-125D, México) por 72 h a 70°C .

4.3.6. Área foliar

El área foliar se calculó en el integrador de área foliar (LI-COR, LI-3100C, Lincoln, NE, EE. UU.), al mismo tiempo se determinó el número de hojas.

4.3.7. Determinación de nutrimentos en hojas

Para el análisis químico de tejido vegetal para macronutrientes (P, K, Ca y Mg) el procedimiento se describió en 4.2.8.

4.3.8. Análisis estadístico

Los datos obtenidos previamente se analizaron con las pruebas de Shapiro-Wilk ($p \leq 0.05$), los cuales resultaron normales y con homogeneidad de varianzas, por lo tanto, se procedió a realizar el análisis de varianza y prueba de comparación de medias con Tukey ($p \leq 0.05$), en el programa SAS (statistical analysis system) versión 9.0 para Windows.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La producción de plantas de cítricos en condiciones de vivero en México se lleva a cabo de acuerdo a la NOM-079-FITO-2002; en ella se indica los cuidados para la producción de la planta en vivero certificado y movilización de material propagativo “libre” de enfermedades cuarentenarias. Sin embargo, se omite la calidad agronómica de la misma, porque no existen protocolos para la producción de plantas certificadas. En el vivero Cazones, la germinación se lleva a cabo en charola de 11.5 x 45.5 x 32 cm en mezcla de turba, agrolita y vermiculita, de un uso y cuando las plantas tienen dos pares de hojas se trasplantan a tubete de 100 mL, una vez que las raíces llenan el tubete se trasplantan a bolsa de polietileno de 4 L. Esta actividad no es común en los viveros certificados.

5.1. Experimento 1. Desarrollo de portainjertos de cítricos en tubete

5.1.1. Variables de crecimiento

5.1.1.1. Crecimiento mensual de altura de la planta y diámetro del tallo

La altura de limón Volkameriano (Volka) y Citrange C-35 se ajustaron a una ecuación lineal con $R^2 > 99\%$ en todos los bioestimulantes (Cuadro 1-A). En la **Figura 1** se muestra la dinámica de crecimiento en la altura de los dos portainjertos con Humic+P, tanto C-35 y Volka se ajustaron a una ecuación lineal con $R^2=0.99$. C-35 presentó mayor crecimiento que Volka durante los tres meses. A los 30 días la diferencia de crecimiento entre portainjertos fue 2.14 cm, a los 60 días de 7.17 cm y a los 90 días de 9.83 cm. Volka y C-35 a los 90 días tuvieron alturas aproximadas de 38.4 y 24.8 cm respectivamente. Schäfer *et al*, (2006) reportaron en Citrange C37 sembradas en tubetes de 120 mL, el crecimiento fue lineal, caso similar a esta investigación, a los 117, 160 225 días después de la siembra las plantas alcanzaron alturas de 10, 20 y 31 cm respectivamente. Debido al lugar geográfico, manejo, sustrato y fertilización las plantas alcanzaron alturas similares en diferentes tiempos.

Con relación a la dinámica de crecimiento del diámetro del tallo, Volka se ajustó a una ecuación lineal con $R^2 > 98\%$ y C-35 con $R^2 > 97\%$ en los dos bioestimulantes incluyendo al Testigo (**Cuadro 1-A**). En la **Figura 2** se muestra la dinámica de crecimiento del diámetro del tallo de ambos portainjertos con Humic+P. Para C-35 se ajustó a una

ecuación polinómica con $R^2 = 1$. Limón Volkameriano se ajustó a la ecuación lineal con $R^2 = 0.99$. En la primera evaluación, Volka desarrolló tallos con mayor diámetro que C-35 por 0.5 mm, para la segunda medición C-35 superó a Volka por 0.3 mm y en la última medición la diferencia entre ambos portainjertos fue 0.6 mm. A partir del segundo mes C-35 desarrolló tallos más vigorosos que Volka, a los 90 ddt dichos portainjertos tuvieron diámetros aproximados de 3.1 y 2.4 mm respectivamente, avalores inferiores a lo reportado por Schäfer *et al.* (2006) en Citrange C37 con 3.90 mm de diámetro obtenidas a los 225 días después de la siembra. Por tanto, con el manejo y uso de bioestimulantes utilizados en esta investigación se lograrías tallos vigorosos en menor tiempo.

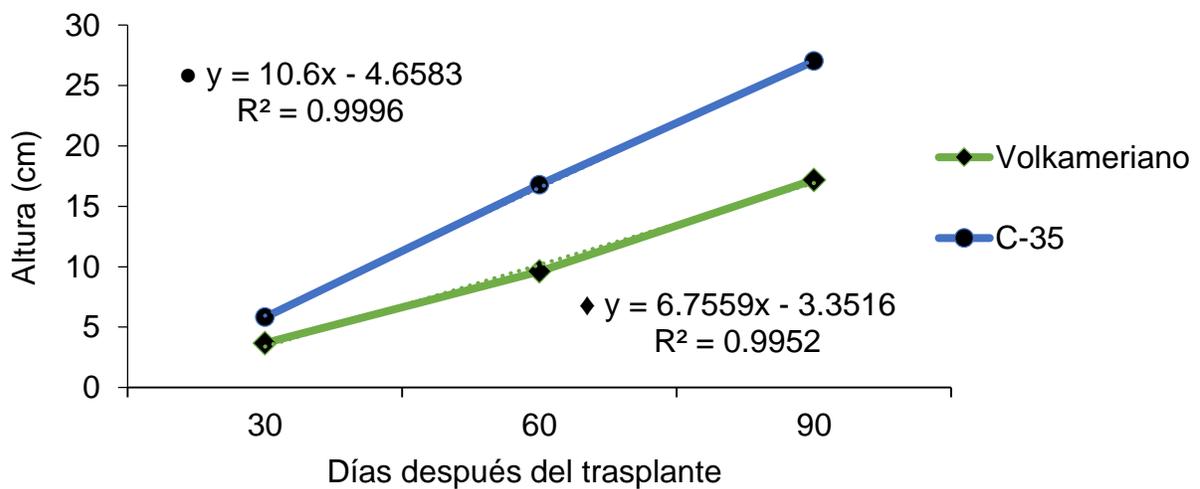


Figura 1. Dinámica de crecimiento en altura de dos portainjertos de cítricos con bioestimulante Humic+P en vivero en condiciones de invernadero, ($n= 16$).

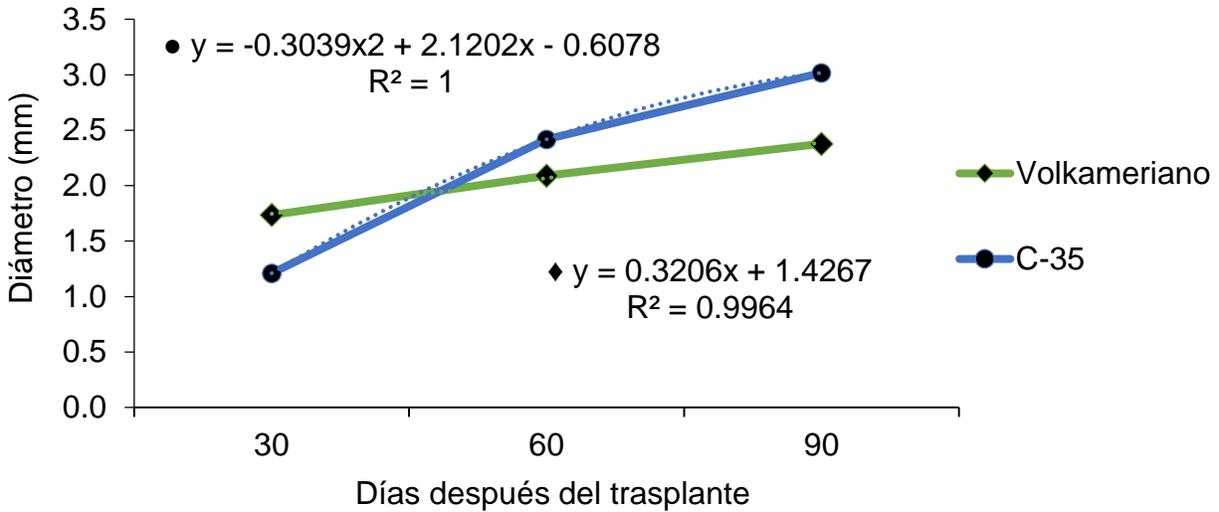


Figura 2. Dinámica de crecimiento en diámetro de dos portainjertos de cítricos con bioestimulante Humic+P en vivero en condiciones de invernadero, ($n= 16$).

5.1.1.2. Altura de la planta y diámetro del tallo a los 90 ddt

A los 90 ddt la altura se midió desde el cuello de la planta hasta el ápice y hubo efecto significativo ($p < 0.05$) por “bioestimulantes” en los dos portainjertos. Para C-35 Humic+P fue mayor que Raizal 400, Ruter AA y Testigo (**Figura 3**), mientras en Volka Humic+P fue mayor a Raizal 400, Ruter AA y Testigo, pero raizal Raizal 400 fue similar a Ruter AA y el Testigo fue igual a Raizal 400 (**Figura 4**). El Testigo fue el peor tratamiento en los dos portainjertos. El C-35 alcanzó mayor altura que limón Volkameriano, aun cuando se les aplicó los mismos bioestimulantes. En ambos portainjertos, Humic+P estimuló mayor desarrollo. Esto puede ser por la composición de dicho bioestimulante, más del 50% del producto está constituido de materia orgánica (Ácidos húmicos, fúlvicos y carboxílicos), por lo tanto, se presume que estas sustancias favorecen el crecimiento de la planta. Fatma *et al.* (2015) observaron que al aplicar sustancias húmicas vía foliar en *Prunus armeniaca* L. aumentó el contenido mineral en hojas (N, P, K y Mg). Popescu y Popescu (2018) reportaron que al aplicar ácidos húmicos en *Vitis vinífera* L. incrementó el rendimiento de frutos, esto se asoció que dicho bioestimulante aumentó la tasa de intercambio de CO₂ neto en hojas, concentración de clorofila y área foliar.

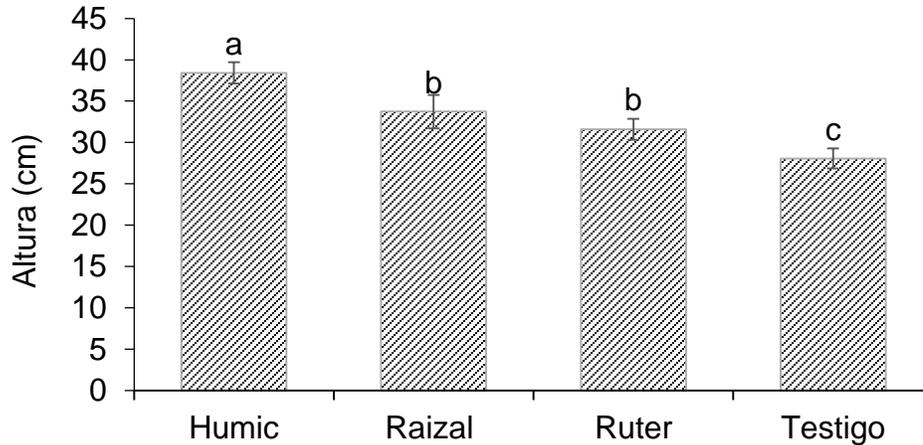


Figura 3. Altura de Citrange C-35 en tres bioestimulantes y Testigo, en condiciones de vivero a los 90 días después del trasplante (ddt). De acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) los valores con la misma letra son estadísticamente similares. Líneas en cada barra indican la desviación estándar. $DMSH_{0.05}$ (diferencia mínima significativa honesta) = 2.678, ($n= 12$).

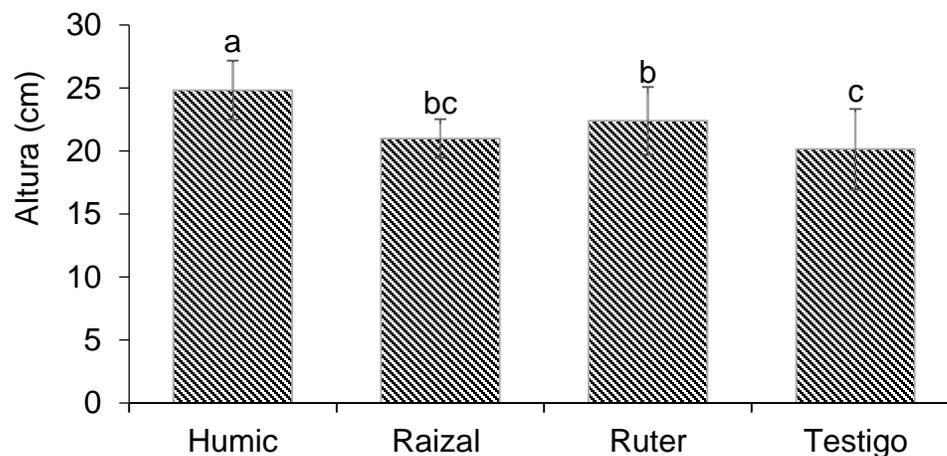


Figura 4. Altura de limón Volkameriano en tres bioestimulantes y Testigo, en condiciones de vivero a los 90 días después del trasplante (ddt). De acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) los valores con la misma letra son estadísticamente similares. Líneas en cada barra indican la desviación estándar. $DMSH_{0.05}$ (diferencia mínima significativa honesta) = 1.771, ($n= 12$).

El diámetro es una de las características de calidad más relevante que puede predecir la supervivencia de la planta al ser trasplantada y define la robustez del tallo (Orozco *et al.*, 2010; Sáenz *et al.*, 2014). El diámetro a los 90 ddt se midió a los 10 cm del cuello de la planta. En Volka no hubo efecto ($p < 0.05$) entre tratamientos, mientras que en C-35, Humic+P estimuló tallos más vigorosos que Raizal 400, Ruter AA y el Testigo (**Figura 5**).

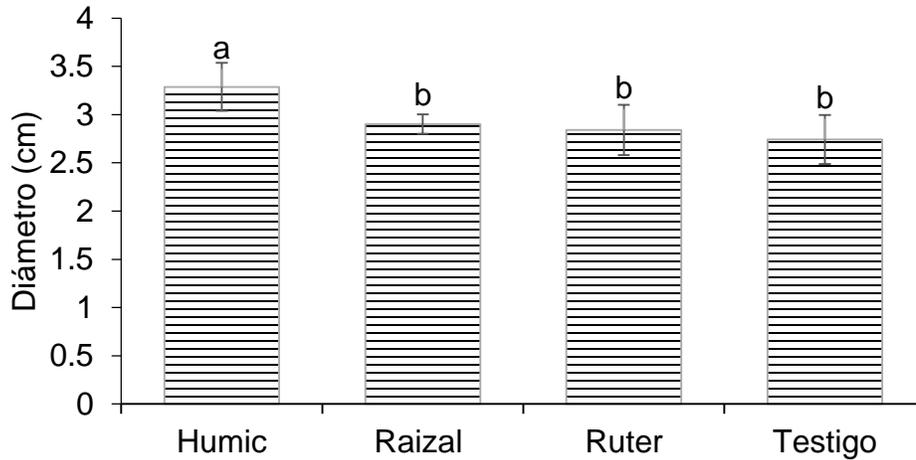


Figura 5. Diámetro de Citrange C-35 en tres bioestimulantes y Testigo, en condiciones de vivero a los 90 días después del trasplante (ddt). De acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) los valores con la misma letra son estadísticamente similares. Líneas en cada barra indican la desviación estándar. $DMSH_{0.05}$ (diferencia mínima significativa honesta) = 0.262, ($n= 12$).

Vimos *et al.* (2020) mencionan que las plantas ante la proporción ácidos fúlvicos/ácidos húmicos, reaccionan positivamente al aumentar la proporción de sustancias de bajo peso molecular (ácidos fúlvicos), porque son biológicamente más activos que los ácidos húmicos, lo que facilita la absorción por la raíz, y mejoran significativamente la producción de biomasa en plantas, caso similar a lo presentado en esta investigación tanto en diámetro como altura en portainjertos de cítricos.

Liberato *et al.* (2021) observaron en citrumelo 'Swingle' desarrolladas en tubetes de 50 mL a los 105 ddt alcanzaron 22.36 cm de altura y 2.28 mm de diámetro, valores inferiores a los reportados en esta investigación. Mientras que Giuliani *et al.* (2014) reportaron en plantas evaluadas a los 91 ddt que la variedad C-35 presentó mayor altura (12.18 cm) que limón Volkameriano (8.936 cm), experimentos evaluados en tres contenedores (tubos de 50 cm³, tubos de 120 cm³ y charolas de poliestireno de 72 celdas con volumen de 120 cm³). Maldonado (2010) observó que, plantas de limón Volkameriano producidas en tubetes de 180 mL a los cuatro meses después del trasplante alcanzaron altura de 11.0 cm y 3.2 mm de diámetro. Teixeira *et al.* (2009) investigaron el desarrollo vegetativo de portainjertos de cítricos producidos en diferentes contenedores, los portainjertos 'Trifoliata' y 'FEPAGRO C37' mostraron altura final similar y significativamente superior a la altura de mandarina 'Sunki'. Citrange 'FEPAGRO C37' tuvo mayor diámetro a nivel del cuello. Las

diferencias entre portainjertos son debidas a las características genéticas del portainjerto, período y lugar geográfico, manejo agronómico y nutrición tal como se observó en este trabajo.

Por lo tanto, con los datos obtenidos en esta investigación considerando el mejor tratamiento, se podrían tomar de referencia como características visuales en plantas producidas en tubete para ser trasplantadas a bolsa, considerando altura de la planta, diámetro del tallo y llenado del tubete por las raíces. Estas características varían en cada portainjerto. En las condiciones y lugar donde se estableció el experimento a los 90 días las raíces de C-35 llenaron el tubete alcanzando el diámetro mínimo de 3.0 mm y altura aproximada de 38 cm. Para Volka en la misma fecha las raíces llenaron los tubetes con altura de planta 25 cm y 2.5 mm de diámetro. En las **Figuras 6 y 7** se observa la arquitectura de raíces del mejor tratamiento en C-35 con Humic+P a los 90 ddt.



Figura 6. A) Raíz principal y B) Raíces laterales de primer al cuarto orden del portainjerto C-35 con el bioestimulante Humic+P a los 90 ddt.



Figura 7. Raíces del portainjerto C-35 con el bioestimulante Humic+ a los 90 ddt (R= repeticiones).

5.1.1.3. Densidad estomática

En las hojas de Volka el Testigo desarrolló mayor densidad estomática que Ruter AA, pero fue igual a Humic+P y Raizal 400, al mismo tiempo estos dos bioestimulantes no diferenciaron entre sí con Ruter AA de acuerdo a la prueba Tukey ($\alpha = 0.05$) (Figura 8).

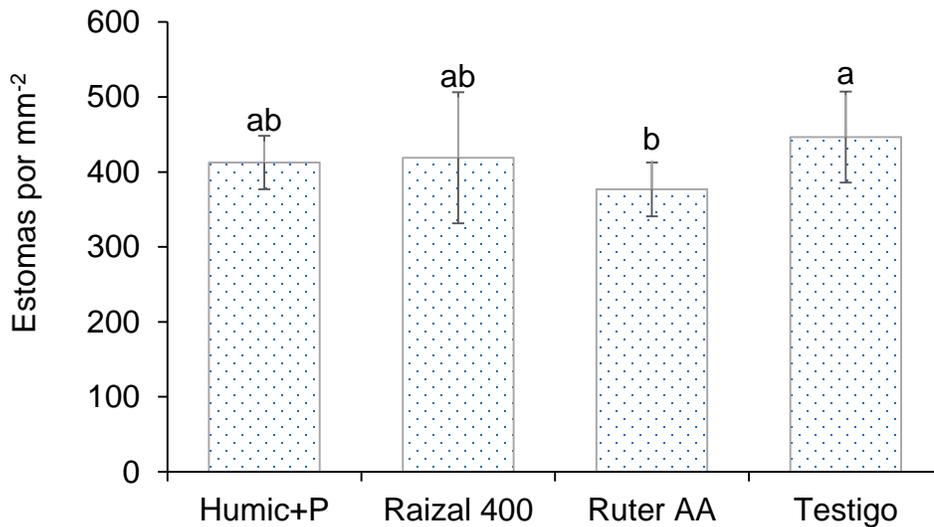


Figura 8. Densidad estomática mm⁻² en limón Volkameriano en tres bioestimulantes y Testigo, en condiciones de vivero a los 90 días después del trasplante (ddt). De acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) los valores con la misma letra son estadísticamente similares. Líneas en cada barra indican la desviación estándar. $DMSH_{0.05}$ (diferencia mínima significativa honesta) = 58.88, ($n= 16$).

En hojas de C-35 el Testigo y Raizal 400 generaron misma densidad estomática y fueron superiores a Humic+P y Ruter AA, estos dos bioestimulantes no diferenciaron entre sí de acuerdo a la prueba de medias ($\alpha = 0.05$) (**Figura 9**).

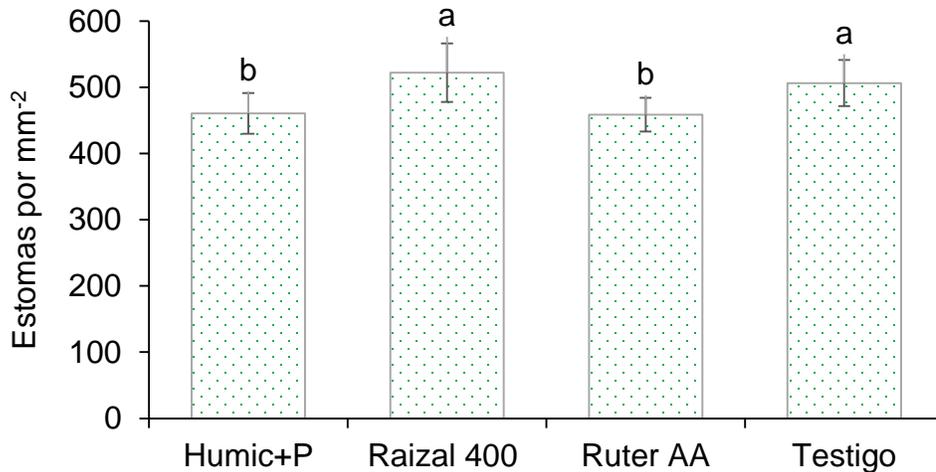


Figura 9. Densidad estomática mm⁻² en Citrange C-35 en tres bioestimulantes y Testigo, en condiciones de vivero a los 90 días después del trasplante (ddt). De acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) los valores con la misma letra son estadísticamente similares. Líneas en cada barra indican la desviación estándar. $DMSH_{0,05}$ (diferencia mínima significativa honesta) = 32.67, ($n= 16$).

La densidad estomática encontrada en esta investigación, es similar a la reportada por Pacheco (2022) en naranjo Agrio, limón Volkameriano y C-35 en plantas desarrolladas en bolsa. Limón Volkameriano y C-35 no mostraron diferencia en densidad estomática (485.5 y 478.7 estomas mm⁻²) pero superaron a naranjo agrio (322.5 estomas mm⁻²).

Sofiyanti *et al.* (2022) examinaron las características de los estomas de cinco especies de cítricos en Indonesia. Las hojas fueron recolectadas en campo. Encontraron variaciones en las densidades e índice de estomas y longitud, la mayor longitud y ancho de estomas encontraron en *C. microcarpa* (20.5 y 18.5 μm), siguiendo *C. hystrix* (19.75 y 17 μm), *C. aurantifolia* (19.5 y 16.75 μm), *C. amblicarpa* (19.5 y 17 μm); mientras que, la menor en *C. limon* (19 y 15.25 μm). *C. hystrix* y *C. aurantifolia* tienen menor densidad estomática (419,89 mm⁻²) y la más alta (685,89 mm⁻²), respectivamente. Por tanto, la densidad estomática y tamaño estomático están inversamente relacionados. Mayor cantidad de estomas pequeños también pueden tener mayor control de la conductancia estomática, ya que se considera que los estomas pequeños pueden ajustar el área de los poros estomáticos y regular la conductancia rápidamente, optimizando así la eficiencia del uso del agua en menor tiempo. Cada planta puede regular rápidamente (en cuestión de minutos) la apertura de estomas, pero cambiar la densidad lleva días y semanas (Giday *et al.*, 2013; Raven, 2014).

A pesar que en Volka y C-35 con el bioestimulante Humic+P la densidad fue menor que el Testigo, se obtuvieron plantas de mayor altura, diámetro, área foliar, peso de materia fresca y seca de la raíz y peso de materia seca del vástago. Esto puede deberse a un estado hídrico mejorado, temperaturas metabólicas más altas y menor costo metabólico asociados con el desarrollo de células protectoras. La tasa de crecimiento no mejoró en las plantas con mayores densidades estomáticas, esto indica que la resistencia a la difusión de CO₂ no fue limitante en estas condiciones y que el estado hídrico de las hojas dominó el crecimiento (Doheny *et al.*, 2012).

5.1.2. Variables morfométricas

5.1.2.1. Peso de materia fresca y seca en parte aérea de la planta

A los 90 ddt se pesó la materia fresca, seca y se determinó la cantidad de agua en tallo y hoja en limón Volkameriano y C-35.

Para limón Volkameriano en tallo no hubo efecto significativo ($p < 0.05$) por bioestimulante. Mientras que para materia fresca de hoja en, Humic+P generó mayor peso. La materia seca fue superior con Humic+P y Ruter AA e iguales entre sí, pero Ruter AA fue igual a Raizal 400 y Testigo. En porcentaje de agua en tallo, Humic+P, Ruter y Testigo fueron iguales entre sí y superiores a Raizal 400. El porcentaje de agua en hojas no fue afectado por bioestimulante ($p < 0.05$) (**Cuadro 2**).

La materia fresca y seca de tallo en el portainjerto C-35, Humic+P estimuló mayor peso que en el resto de los tratamientos que fueron iguales entre sí (Cuadro 2). La materia fresca en hojas, Humic+P y Raizal 400 fueron mayores que Ruter y Testigo. En tanto la materia seca, Humic+P fue mayor al resto de los tratamientos, a su vez Raizal 400 y Ruter AA fueron iguales y superiores al Testigo. En este portainjerto en porcentaje de agua en tallo y hoja no hubo efecto significativo ($p < 0.05$) (**Cuadro 2**).

Cuadro 2. Peso de materia fresca y seca en parte aérea de limón Volkameriano y Citrange C-35 en tres bioestimulantes y Testigo a los 90 días después del trasplante en vivero en condiciones de invernadero.

Tratamientos	Tallo			Hojas		
	Materia fresca	Materia seca	Agua (%)	Materia fresca	Materia seca	Agua (%)
	Gramos			Gramos		
Limón Volkameriano						
Humic+P	1.071 ^a	0.391 ^a	65.5 ^a	2.582 ^a	0.689 ^a	72.7 ^a
Raizal 400	0.912 ^a	0.352 ^a	61.6 ^b	1.898 ^b	0.575 ^b	69.3 ^a
Ruter AA	1.018 ^a	0.388 ^a	62.2 ^{ab}	2.049 ^b	0.621 ^{ab}	68.6 ^a
Testigo	0.896 ^a	0.343 ^a	61.7 ^{ab}	1.831 ^b	0.576 ^b	68.2 ^a
DMSH _{0.05}	0.244	0.101	1.07	0.385	0.092	3.96
CV	22.702	24.742	1.87	16.693	13.526	6.32
Citrange C-35						
Humic+P	2.017 ^a	0.779 ^a	61.5 ^a	2.653 ^a	0.774 ^a	70.9 ^a
Raizal 400	1.490 ^b	0.583 ^b	59.2 ^a	2.324 ^{ab}	0.656 ^b	71.7 ^a
Ruter AA	1.446 ^b	0.547 ^b	62.4 ^a	2.133 ^b	0.601 ^{bc}	71.7 ^a
Testigo	1.314 ^b	0.497 ^b	61.6 ^a	1.997 ^b	0.566 ^c	71.2 ^a
DMSH _{0.05}	0.317	0.117	4.83	0.359	0.089	2.25
CV	18.316	17.571	8.50	14.273	12.470	3.54

Valores con la misma letra por columna son estadísticamente iguales, de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). DMSH_{0.05}: diferencia mínima significativa honesta, CV: coeficiente de variación, ($n= 12$).

En cuanto a los portainjertos los datos encontrados en esta investigación no coinciden con otros autores, la mayoría concuerda que limón Volkameriano es el portainjerto con mayor peso de materia fresca y seca en parte aérea de la planta. Así, Peixoto *et al.*, (2006) reportaron mayor contenido de materia seca en limón Volkameriano y naranjo 'Azeda', que otros híbridos. Maldonado (2010) en limón Volkameriano desarrolladas en tubetes de 140 mL reportó en peso de materia fresca en hoja (1.4 g) y tallo (0.7 g) y en peso de materia seca en hoja (0.3 g) y tallo (0.2 g) a los 120 ddt. Vidal (2014), en plantas de 4 meses desarrolladas en bolsas de polietileno con capacidad de 3 kg, reportó el peso de materia seca parte aérea en limón Volkameriano 87.6 g, mientras que en C-35 se obtuvo 52.7 g. Giuliani *et al.*, (2014) mencionan que no hubo efecto significativo entre estas dos variedades. Teixeira *et al.*, (2009) reportaron en híbrido Citrange 'FEPAGRO C37' donde se obtuvo mayor acumulación de materia seca.

El agua es un elemento crítico para absorber y traslocar los nutrimentos (Arrieta *et al.*, 2014). Cuando hay estrés por sequía leve o moderada, la transpiración de las hojas

disminuye por el cierre de estomas, hay menos entrada de CO₂ en las células del mesófilo, resultado que haya menos CO₂ intracelular, así el oxígeno se convierte en el receptor de electrones en las células del mesófilo, la ROS (sustancias reactivas de oxígeno) se producen rápidamente y se induce la peroxidación lipídica de la membrana celular. En consecuencia, se producen radicales libres de superóxido, se degradan los pigmentos fotosintéticos, se destruye el sistema de transferencia de electrones fotosintéticos, se impide la transferencia de electrones y finalmente los órganos fotosintéticos se dañan, lo que reduce la tasa fotosintética y se inhibe el crecimiento de las plantas (Chen *et al.*, 2022). En contenido de agua para el análisis estadístico los valores se transformaron de porcentaje a arcoseno ($y = \arcsen \sqrt{y/100}$), sin embargo, los datos se reportan en su escala original. Por lo tanto, el porcentaje de agua en tallos de Volka, Humic+P, Ruter AA y Testigo fue donde se obtuvo mayor contenido de agua, mientras que en hojas no hubo diferencias estadísticas (**Cuadro 2**). En C-35 no hubo efecto significativo entre tratamientos en tallo y hoja, a pesar de ello, Humic+P propició plantas de mayor altura y diámetro en ambos portainjertos que el resto de los bioestimulantes, esto pudo ser por los ácidos húmicos que aumentan la disponibilidad de nutrientes en el sustrato y los transportan a las plantas, también incrementan las hormonas que promueven el crecimiento de las plantas, como las auxinas y citoquininas, que ayudan el metabolismo de los nutrientes y la fotosíntesis (Ampong *et al.*, 2022).

Liu *et al.* (2023) reportaron que el peso de materia fresca y seca en plántulas de tomate fueron estadísticamente mayores al utilizar bioestimulante Retosal, caso similar ocurrió en el portainjerto C-35 cuando se le aplicó Humic+P, ambos productos contienen ácidos carboxílicos. Por lo tanto, las sustancias húmicas estimulan positivamente la producción de materia fresca y seca.

5.1.2.2. Peso de materia fresca y seca de la raíz

En limón Volkameriano no hubo diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$) en PTMFR y PMFRP, pero si en PTMSR y PMSRP, los tres bioestimulantes fueron iguales y generaran mayor peso que el Testigo. En contenido de agua para el análisis estadístico los valores se transformaron de porcentaje a arcoseno ($y = \arcsen \sqrt{y/100}$), sin embargo, los datos se reportan en su escala original. En esta variable el Testigo, Ruter AA y

Humic+P estimularon raíces con el mismo porcentaje y fueron mayores que Raizal 400 (**Cuadro 3**). En las variables PFRLPO, PSRLPO y TRLPO no se presentaron diferencias significativas en los tratamientos (**Cuadro 2-Apéndice**).

El portainjerto C-35, Humic+P, Raizal 400 y el Testigo estimularon el mismo peso y superaron a Ruter AA en PFTR, PSTR, PFRP Y PSRP. En porcentaje de agua hubo diferencias significativas, Raizal 400, Ruter AA y Testigo fueron iguales entre sí y mayores a Humic+P. En las variables PFRLPO, PSRLPO y TRLPO no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos (**Cuadro 2-Apéndice**).

Cuadro 3. Peso de materia fresca, seca y porcentaje de agua en raíz de limón Volkameriano y Citrange C-35 en tres bioestimulantes y Testigo a los 90 días después del trasplante en vivero condiciones de invernadero.

Tratamientos	PTMFR	PTMSR	PMFRP	PMSRP	Agua (%)
	Gramos				
Limón Volkameriano					
Humic+P	1.846 ^a	0.354 ^{ab}	0.404 ^a	0.155 ^{ab}	80.8 ^{ab}
Raizal 400	1.953 ^a	0.424 ^a	0.461 ^a	0.173 ^a	78.0 ^b
Ruter AA	1.828 ^a	0.357 ^{ab}	0.419 ^a	0.153 ^{ab}	80.4 ^{ab}
Testigo	1.632 ^a	0.295 ^b	0.345 ^a	0.098 ^b	81.8 ^a
DMSH _{0.05}	0.627	0.111	0.126	0.058	1.47
CV	20.761	18.720	18.522	23.894	2.11
Citrange C-35					
Humic+P	2.257 ^a	0.482 ^a	0.694 ^a	0.236 ^a	78.7 ^b
Raizal 400	1.860 ^{ab}	0.348 ^{ab}	0.491 ^{ab}	0.158 ^{ab}	81.2 ^a
Ruter AA	1.439 ^b	0.288 ^b	0.405 ^b	0.135 ^b	80.4 ^{ab}
Testigo	1.979 ^{ab}	0.411 ^{ab}	0.560 ^{ab}	0.186 ^{ab}	79.1 ^{ab}
DMSH _{0.05}	0.811	0.165	0.251	0.081	1.21
CV	25.867	25.892	28.102	27.342	1.77

Valores con la misma letra por columna son estadísticamente iguales, de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). DMSH_{0.05}: diferencia mínima significativa honesta, CV: coeficiente de variación. **PTMFR**: peso total de materia fresca en raíz, **PTMSR**: peso total de materia seca en raíz, **PMFRP**: peso de materia fresca de raíz principal, **PMSRP**: peso de materia seca de raíz principal, ($n= 6$).

Decarlos-Neto *et al.* (2002) encontraron que limón Volkameriano tuvo mayor materia seca en raíces en comparación a lima 'Rangpur', mandarinas 'Cleópatra' y 'Sunki', e híbrido 'Tangelo-Orlando'. De igual forma Andrade y Martins (2003) mencionaron que limón Volkameriano tuvo mayor cantidad de raíces y fueron largas en comparación a *Poncirus trifoliata*. Maldonado (2010) reportó a Citrumelo 'Swingle' superior en peso materia fresca

y seca de raíz, siguiendo limón Volkameriano, Mandarino 'Cleopatra' y Mandarino 'Amblicarpa' respectivamente, mientras que Giuliani *et al.* (2014) observaron en peso de materia seca en raíz y parte aérea 0.82 y 1.56 g respectivamente, Vidal (2014) reportó peso seco total en raíz para limón Volkameriano 8.43 g y 5.5 g en C-35, valores superiores a lo observado en esta investigación.

El uso de sustancias húmicas (SH) mejoran el crecimiento y fisiología de las plantas. Estos efectos positivos podrían atribuirse, principalmente, a la actividad similar a la de las hormonas presentes en la estructura del humus. La combinación de técnicas genéticas y de biología molecular (Trevisan *et al.*, 2010 y Dobbset *et al.*, 2010) y espectrometría de masas por cromatografía de gases (Jindo *et al.*, 2012) han confirmado la presencia de concentraciones de ácido indolacético (AIA) fisiológicamente activo en sustancias húmicas. Este mecanismo fue confirmado además por Trevisan *et al.* (2009) utilizando un genotipo mutante (*aux1*) de *Arabidopsis thaliana* e inhibidores específicos del transporte o acción de auxinas. Los hallazgos obtenidos mostraron que las SH indujeron la formación de raíces laterales a través de la actividad similar a la auxina, como lo confirmó la activación del transporte de auxina y transcripción mejorada del gen AIA19 de respuesta temprana a la *auxina*. Todavía no se comprende cómo el AIA está vinculado a o en asociación con las SH. Los grupos carboxílicos de las SH parecen ser receptores clave para el AIA y regulan su disponibilidad (Musculo *et al.*, 2007; Jindo *et al.*, 2012; Canellas *et al.*, 2014).

Los bioestimulantes pueden actuar directamente en la fisiología y metabolismo de las plantas o mejorando las condiciones del suelo o sustrato. Los bioestimulantes se diferencian de los fertilizantes porque actúan sobre el metabolismo de las plantas. Estos productos son capaces de modificar la conformación de la raíz y aumentar su desarrollo. (Bulgari *et al.*, 2015). Su aplicación puede ser al suelo o a las hojas, dependiendo de su composición y de los resultados deseados (Kunicki *et al.*, 2010).

El uso de sustancias húmicas (SH) mejoran el crecimiento y fisiología de las plantas. Estos efectos positivos podrían atribuirse, principalmente a la actividad similar a la de las hormonas presentes en la estructura del humus.

5.1.3. Área foliar y número de hojas

Determinar el área foliar y cantidad de hojas es importante, porque son las responsables de capturar la energía solar y es donde se lleva a cabo la fotosíntesis convirtiendo la energía lumínica en compuestos orgánicos (Rodríguez *et al.*, 2016).

En Volka, Humic+P estimuló mayor área foliar que Raizal 400, Ruter AA y Testigo, mientras que entre éstos tres generaron misma área foliar (Figura 10). Los tres bioestimulantes generaron la misma cantidad de hojas y fueron mayores que el Testigo (**Cuadro 3-A**).

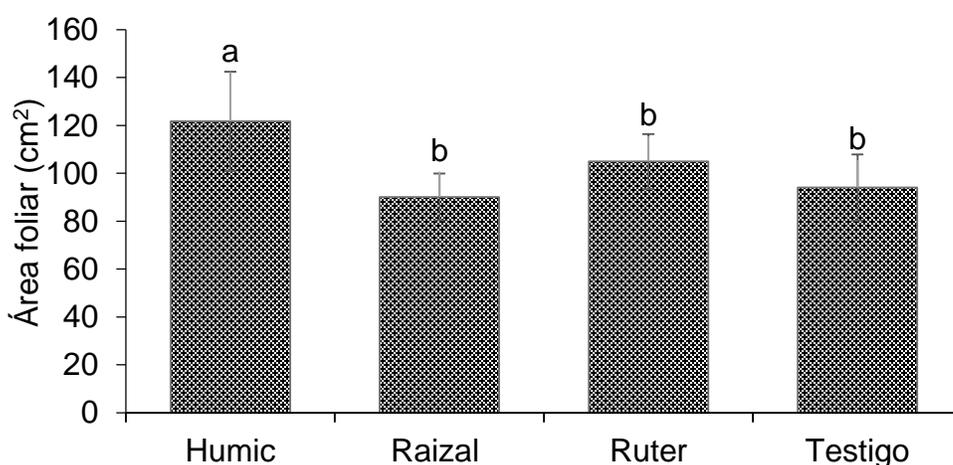


Figura 10. Área foliar en limón Volkameriano en tres bioestimulantes y Testigo, en condiciones de vivero a los 90 días después del trasplante (ddt). De acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) los valores con la misma letra son estadísticamente similares. Líneas en cada barra indican la desviación estándar. $DMSH_{0.05}$ (diferencia mínima significativa honesta) = 15.77, ($n= 12$).

En C-35, Humic+P desarrolló mayor área foliar que el resto de los bioestimulantes, al mismo tiempo Raizal 400 y Ruter AA tuvieron misma área foliar, pero fueron mayores que el Testigo (**Figura 11**). Humic+P y Raizal 400 propiciaron mayor número de hojas, a su vez, Raizal 400 y Ruter 400 fueron iguales, y el Testigo generó la menor cantidad de hojas (**Cuadro 3-Apéndice**).

Un bioestimulante puede actuar de forma diferente entre especies e incluso de un cultivar a otro, depende de factores ambientales, dosis y tiempo de aplicación (Kunicki *et al.*, 2010). Esta variabilidad de los efectos a menudo impide la generalización y utilización de los resultados en otras especies, por tanto, se debe investigar cada bioestimulante en la

especie de interés. En esta investigación se observó el mismo comportamiento en los tres bioestimulantes en cuanto al área foliar en ambos portainjertos.

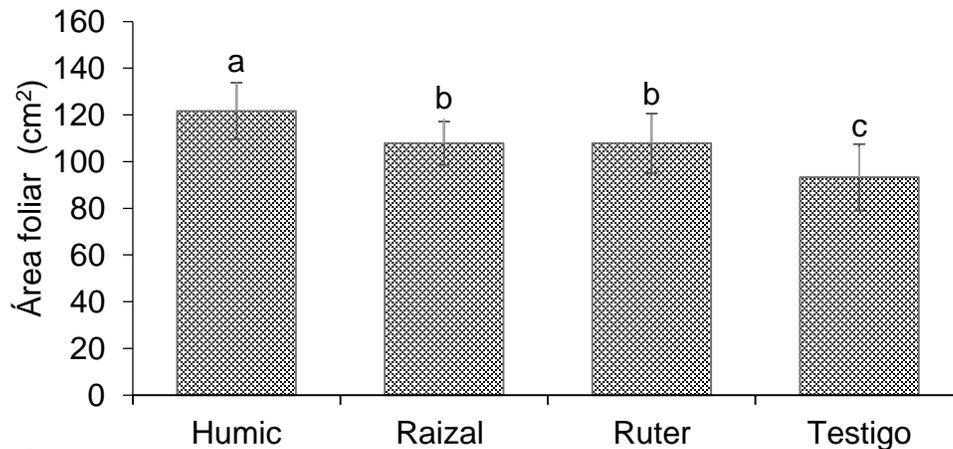


Figura 11. Área foliar en Citrange C-35 en tres bioestimulantes y Testigo, en condiciones de vivero a los 90 días después del trasplante (ddt). De acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) los valores con la misma letra son estadísticamente similares. Líneas en cada barra indican la desviación estándar. $DMSH_{0.05}$ (diferencia mínima significativa honesta) = 10.72, ($n=12$).

Giuliani *et al.* (2014) evaluaron la emergencia y desarrollo de seis portainjertos de cítricos cultivados en diferentes recipientes; tubetes de 50 cm³, 120 cm³ y charolas de polietileno de 72 celdas con volumen de 120 cm³, observaron que a los 91 ddt el tamaño del contenedor presentó efecto significativo, el de 50 cm³ fue donde se obtuvo mayor área foliar, en cuanto a los portainjertos, limón Volkameriano estadísticamente generó misma área foliar (188.34 cm²) que Fepagro C 37 (136.83 cm²), seguido de Sunki (127.37 cm²) y Swingle (128.28 cm²). Esto concuerda con lo reportado por Peixoto *et al.* (2006) y Fernandes *et al.* (2011) en experimentos en tubete evaluados a los 120 ddt y 150 ddt respectivamente, reportaron que limón Volkameriano superó a otros portainjertos. Fochesato *et al.* (2006) evaluaron la interacción entre sustratos y portainjertos, resultó que la composición del sustrato repercutió en el área foliar y limón Volkameriano fue mayor, aunque tuvo menor número de hojas que otros. Esto es similar a lo reportado por Teixeira *et al.* (2009), el área foliar está influenciada por el número y tamaño de hojas. Las diferencias de área foliar entre portainjertos se deben a las características intrínsecas de cada especie y su variación botánica, esto es por la forma y tamaño de las hojas. En esta investigación a pesar de que C-35 presenta hojas trifoliadas y de menor tamaño que las de limón Volkameriano, C-35 con los bioestimulantes Raizal 400 y Ruter AA generaron mayor área foliar.

5.1.4. Determinación de nutrientes en tejido vegetal

5.1.4.1. Macronutrientes

En el **Cuadro 4** se presentan las concentraciones de macronutrientes obtenidos de hojas de Volka y C-35 en diferentes bioestimulantes y Testigo, se incluyen los valores “óptimos” de acuerdo con Bataglia *et al.* (2008) en cuatro portainjertos de cítricos desarrollados en tubete aptos para ser trasplantados a bolsa.

En limón Volkameriano de acuerdo a los rangos “óptimos” propuestos por Bataglia *et al.* (2008) el nitrógeno (N) en todos los tratamientos presentaron valores excesivos. Entre bioestimulantes no hubo diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$). En fósforo (P), potasio (K) y magnesio (Mg) todos los tratamientos presentaron valores menores a los del rango. En cuanto a las pruebas estadísticas en P el Testigo fue superior al resto de los bioestimulantes, en tanto Humic+P y Ruter AA fueron iguales pero superiores a Raizal 400. En K entre tratamientos no hubo diferencias estadísticas mientras que, en Mg, Humic+P, Ruter AA y Testigo fueron iguales entre ellos y mayores a Raizal 400. De acuerdo con Bataglia *et al.* (2008) en calcio (Ca) solo Ruter AA estuvo dentro del rango “óptimos” y entre tratamientos no hubo diferencias estadísticas.

En C-35, el N todos los tratamientos presentaron valores excesivos igual que en limón Volkameriano y entre los tratamientos no hubo diferencias significativas de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0.05$). En P, Raizal 400 y Testigo tuvieron valores óptimos conforme a Bataglia *et al.* (2008), en cuanto Humic+P y Ruter AA presentaron valores bajos según el rango y estadísticamente el Testigo y Raizal 400 fueron iguales y superiores al resto, a su vez, Raizal 400, Humic+P y Ruter AA fueron iguales entre ellos. Caso similar que en limón Volkameriano en K y Mg los valores fueron menores a lo “óptimo”. En K no hubo diferencia significativa entre tratamientos, en cuanto a Mg, Ruter AA fue mayor estadísticamente a Humic+P, Raizal 400 y Testigo, a su vez entre estos tres tratamientos fueron iguales. En Ca Raizal 400, Ruter AA y Testigo tuvieron valores “óptimos”, solo Humic+P fue menor. Estadísticamente Raizal 400, Ruter AA y Testigo fueron iguales entre sí y mayores a Humic+P.

Cuadro 4. Concentración de macronutrientos en hojas de portainjertos de cítricos en etapa de tubete en condiciones de vivero por tratamiento a los 90 días después del trasplante.

Tratamiento	g kg ⁻¹				
	N	P	K	Ca	Mg
Limón Volkameriano					
Humic+P	36.67 ^a	0.86 ^d	7.82 ^a	9.56 ^a	1.84 ^a
Raizal 400	40.33 ^a	0.93 ^c	12.62 ^a	8.80 ^a	1.46 ^b
Ruter AA	47.33 ^a	1.17 ^b	8.09 ^a	11.90 ^a	1.96 ^a
Testigo	40.00 ^a	1.24 ^a	10.07 ^a	9.61 ^a	1.84 ^a
DMSH _{0.05}	22.01	0.04	5.55	7.77	0.14
CV	18.95	1.36	20.38	27.60	2.77
Citrange 35					
Humic+P	40.67 ^a	1.16 ^b	11.56 ^a	11.00 ^b	1.77 ^b
Raizal 400	44.33 ^a	1.26 ^{ab}	7.96 ^a	12.20 ^{ab}	1.80 ^b
Ruter AA	44.66 ^a	1.19 ^b	9.53 ^a	13.40 ^a	2.05 ^a
Testigo	34.33 ^a	1.30 ^a	10.36 ^a	12.47 ^{ab}	1.73 ^b
DMSH _{0.05}	16.81	0.11	7.858	1.72	0.158
CV	14.50	3.12	28.21	4.95	3.04
Óptimo*	18.4-24.5	1.3-1.7	15.6-18.3	14.4-16.5	2.7-3.3
Óptimo**	20.5-25.6	1.6-2.2	16.7-19.9	10.9-12.9	2.4-3.0
Óptimo***	19.8-24.9	1.3-1.7	15.5-21.5	13.7-15.5	2.7-3.4
Óptimo****	15.5-18.8	1.4-1.7	13.3-17.0	10.5-13.4	2.6-3.2

Valores óptimos de acuerdo con Bataglia *et al.*, (2008) en cuatro portainjertos; *mandarina 'Cleopatra', **limón 'Rangpur', *** mandarina 'Sunki' y ****citrumelo 'Swingle'. Valores con la misma letra por columna son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). DMSH_{0.05}: diferencia mínima significativa honesta, CV: coeficiente de variación, ($n=3$).

Los rangos propuestos por Bataglia *et al.* (2008) estos fueron obtenidos en plantas desarrolladas en tubete en vivero colectadas en São Paulo. Incluso entre portainjertos de cítricos desarrollados los rangos varían. Por tanto, es importante establecer rangos óptimos para cada especie, etapa de producción y zonas en las que éstos se producen, por lo que las concentraciones de nutrientes expuestos en esta investigación podrían ser referencia para el desarrollo de portainjertos en cítricos en vivero en el municipio de Cazones, Ver, las plantas no presentaron deficiencias visuales.

En Vivero Cazones, Maldonado (2010) realizó análisis foliar de cuatro portainjertos de cítricos entre ellos limón Volkameriano y citrumelo Swingle desarrollado en distintos sustratos con diferentes soluciones nutritivas desarrolladas en tubete. En N (33.6 g kg⁻¹) solo Humic+P fue similar, el resto de los tratamientos propiciaron mayor N, mientras que

P (3.1 g kg^{-1}), K (22.6 g kg^{-1}), Ca (12.6 g kg^{-1}) y Mg (2.2 g kg^{-1}) los valores generados por los bioestimulantes y el testigo fueron inferiores. Citrumelo Swingle es un portainjerto trifoliado igual que C-35, esta característica es dada por *Poncirus trifoliata* Raf. En Citrumelo Swingle presento valores de N de 30.3 g kg^{-1} y fue similar a lo obtenido en el Testigo, mientras que el resto de los bioestimulantes propiciaron mayor contenido de este nutrimento en las plantas, en P (2.5) y K (17.1 g kg^{-1}) todos los tratamientos fueron inferiores en ambos nutrimentos. En Ca (12.4 g kg^{-1}), Humic+P fue menor, mientras que el de los tratamientos fueron similares y en Mg (2.3 g kg^{-1}) solo Ruter AA fue similar, mientras que el resto de los bioestimulantes y el Testigo fueron inferiores. Aunque los portainjertos se desarrollen bajo las mismas condiciones la demanda de nutrimentos difiere especialmente cuando se trata de macronutrimentos.

Se ha informado que los bioestimulantes afectan el crecimiento de las plantas al aumentar su metabolismo, mejora la fotosíntesis y aumenta la absorción de nutrimentos y la eficiencia del uso de nutrientes; macro y micronutrientes, aumentado así la productividad de las plantas (Battacharya *et al.*, 2015; Yakhin *et al.*, 2017). La eficiencia en la absorción de nutrientes se ha asociado principalmente con modificaciones en las características morfológicas de la raíz, como longitud y densidad de la raíz, longitud y número de raíces absorbentes, por lo tanto, en área foliar (Du Jardin, 2015). Es importante resaltar que los bioestimulantes no pueden sustituir a los fertilizantes. Con los datos obtenidos en esta investigación, el uso de bioestimulantes junto con el manejo que se les dio a las plantas, favorecieron el crecimiento de ellas, puesto que, a los tres meses alcanzaron las medidas óptimas para ser trasplantas a bolsa.

5.2. Experimento 2: Producción en bolsa de limón Volkameriano

Se presentan y discuten las variables donde hubo diferencias estadísticas significativas, en tanto que el resto de la información se encontrará en el apéndice.

5.2.1. Variables de crecimiento

5.2.1.1. Crecimiento mensual en altura y diámetro de la planta

Los datos de altura medidas mensualmente en plantas de limón Volkameriano (Volka) se ajustaron a una ecuación lineal con $R^2 > 98\%$ en todos los tratamientos. Humic+P y Ruter AA estimularon mayor crecimiento en los primeros dos meses; para el tercer mes disminuyó 9 y 16% respectivamente. El Testigo y Raizal 400 generaron mayor crecimiento el tercer mes. A los 90 días el testigo presentó menor crecimiento que el resto de los tratamientos (**Figura 12**).

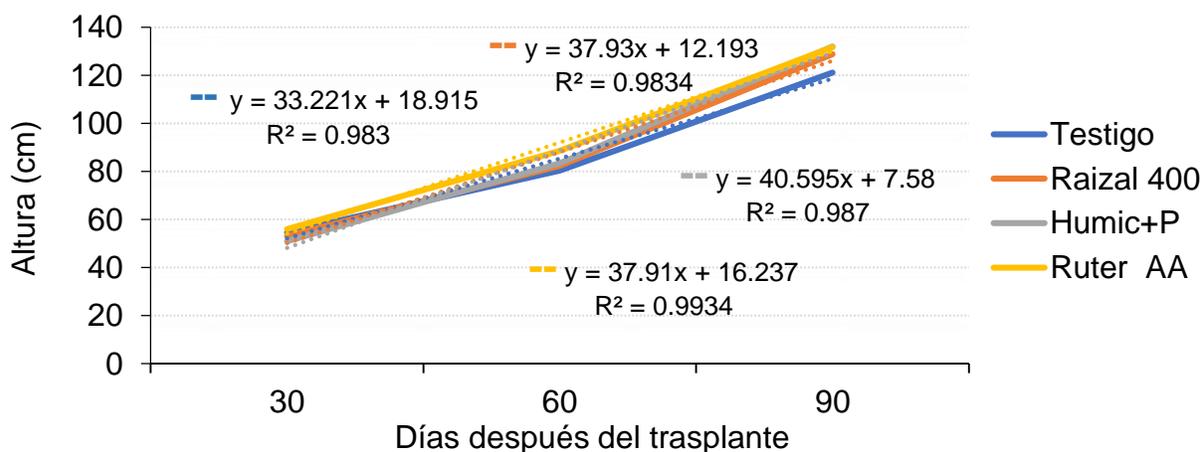


Figura 12. Dinámica de crecimiento de la altura en limón Volkameriano en tres bioestimulantes y Testigo desarrolladas en bolsa en espacio protegido. ($n= 10$).

El desarrollo del diámetro fue similar en los cuatro tratamientos y se ajustaron a una ecuación lineal con $R^2 > 94\%$. Testigo y Raizal 400 propiciaron engrosamiento de tallo del 21% al segundo mes, a los 90 días aumentó a 34 y 41% respectivamente en relación al mes anterior, de igual forma en Humic+P y Ruter AA, a los 60 días, el crecimiento fue similar en 25 y 24% respectivamente. Al tercer mes aumentaron 41 y 35% respecto al mes anterior. A los 90 días Ruter AA estimuló mayor diámetro que el resto de los tratamientos (**Figura 13**).

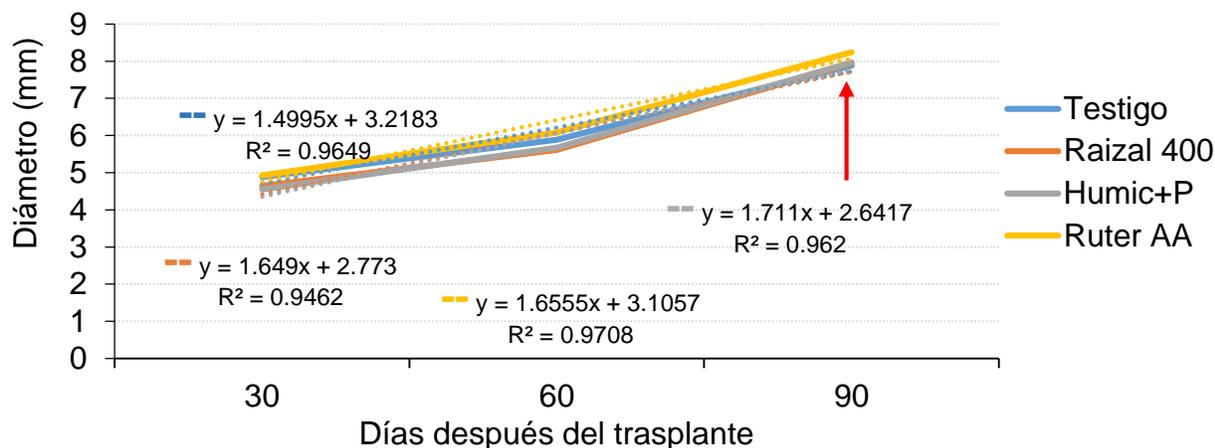


Figura 13. Dinámica de crecimiento del diámetro en limón Volkameriano en tres bioestimulantes y Testigo desarrollados en bolsa en espacio protegido, ($n= 10$).

Albrecht *et al.* (2020) y Liberato *et al.* (2021) sugieren el diámetro para injertar sea de 5 a 6 mm y 8 mm respectivamente, mientras que en vivero Cazonces se injerta cuando las plantas tienen 6 mm de diámetro a 20 cm del cuello de la planta. La flecha en la **Figura 13** señala que a los 90 días en todos los tratamientos los portainjertos alcanzaron el punto de injerto. Pacheco (2022) investigó la porosidad del sustrato en el desarrollo de tres portainjertos cítricos establecidas en bolsas de polietileno de 4 L de capacidad en el Vivero Cazonces, Cazonces Ver., concluyó que sustratos con 46 y 54% de porosidad total favorecen el desarrollo de Volka, C-35 y naranjo Agrio. Estos en cuatro meses alcanzaron el diámetro apto para ser injertados. Volka fue el portainjerto que desarrolló diámetro del tallo en menor tiempo, seguido de C-35, esto coincide con lo reportado por Andrade (2008) y Arrieta (2010) quienes desarrollaron su investigación en el mismo lugar. Limón Volkameriano es un portainjerto vigoroso en vivero, por eso es de los más utilizados por los viveristas, además se considera tolerante al viroide exocortis, virus psorosis y VTC. Se adapta a suelos arenosos, a pH altos y es tolerante a la salinidad (Girardi y Mourao, 2006; Girardi *et al.*, 2007; Bowman y Joubert, 2020).

En comparación con lo reportado por Pacheco (2022) el tiempo para injertar en Volka disminuyó un mes, se debe a que fertilizó cada dos meses durante seis meses de evaluación, mientras que en esta investigación los bioestimulantes se aplicaron mensualmente y se complementó con aplicaciones foliares cada tres semanas.

Liberato *et al.* (2021) evaluaron el desarrollo de citrumelo 'Swingle' en bolsas de polietileno de 4 L de capacidad con diferentes formulaciones de sustratos evaluados 168 ddt, para esta fecha los sustratos que alcanzaron el punto de injerto (8 mm) fueron: a) 60% turba, 30% vermiculita fina, 10% cascarilla de arroz; b) 60% turba, 30% vermiculita superfina, 10% cascarilla de arroz; c) 50% turba, 30% vermiculita fina, 20% cascarilla de arroz; d) 50% turba, 30% vermiculita superfina, 20% cascarilla de arroz, mientras que en esta investigación se logró a los 90 días después del trasplante.

5.2.1.2. Altura y diámetro de la planta

A los 90 días la altura fue afectada por los tratamientos ($p < 0.05$). El Testigo, Ruter AA y Raizal 400 propiciaron la misma altura, mientras que con Humic+P las plantas fueron de menor tamaño (**Figura 14**). Esto puede deberse porque Humic+P tuvo menor número de hojas, por lo tanto, menor área foliar, aunque tuvo la misma cantidad de estomas que Testigo y Ruter AA. En comparación con limón Volkameriano del Experimento 1 desarrollados en tubete con Humic+P alcanzaron mayor altura con la dosis utilizada. Por lo tanto, en cada etapa de crecimiento de los portainjertos la aplicación de bioestimulantes debe ser específica puesto que un bioestimulante actúa de forma diferente de una especie a otra y depende de factores ambientales, dosis y tiempo de aplicación (Kunicki *et al.*, 2010).

Arce y Rivera (2018) en citrange 'Carrizo' sembradas en macetas cuadradas de 10.2 x 30.5 cm, incorporando composta al sustrato obtuvieron plantas de 66.78 cm de altura (11 meses después del trasplante), aplicaron fertilizante al inicio y a los tres meses después del trasplante (mdt). Liberato *et al.* (2021) a los 168 ddt en citrumelo 'Swingle' obtuvieron plantas de 102.68 cm, en tanto Pacheco (2022), en limón Volkameriano a los 7 mdt observó plantas de 118.05 cm en altura. Estas diferencias entre portainjertos, pueden ser atribuidas a las características genéticas propias de cada uno, período y lugar geográfico, manejo agronómico y nutrición de las plantas.

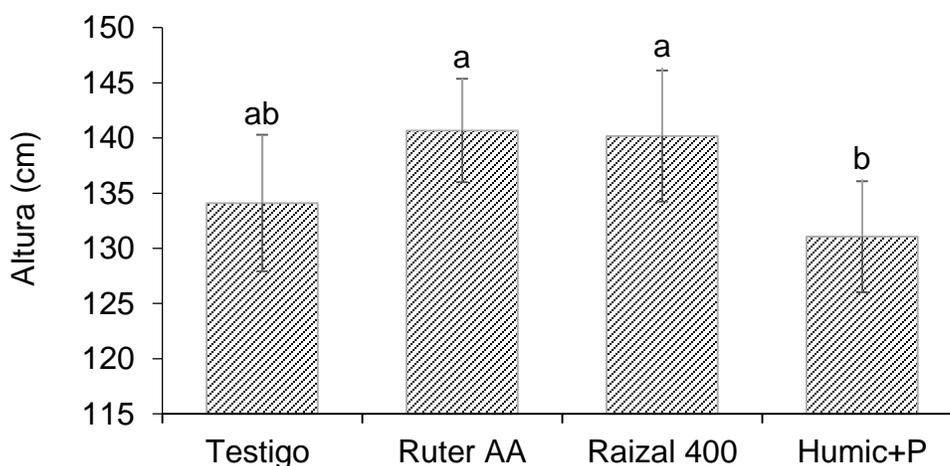


Figura 14. Altura de planta en limón Volkameriano en tres bioestimulantes, 90 días después del trasplante en condiciones de invernadero. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales, de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Líneas en cada barra indican la desviación estándar. $DMSH_{0.05}$ (diferencia mínima significativa honesta) = 9.0, ($n= 4$).

El diámetro del tallo es una variable crítica ya que determina el momento para injertar. En dicha variable no hubo efecto de tratamiento ($p < 0.05$), el cual varió de 8.04 a 8.6 mm a los 90 ddt (**Cuadro 4-A**), dichos valores fueron superiores a lo reportado por Girardi *et al.* (2010) quienes observaron de 5.0 a 5.7 mm para citrómelo 'Swingle' y lima 'Rangpur', respectivamente, a los 90 días después del trasplante, mientras que Rodrigues *et al.* (2016) para esa misma fecha reportaron en citrómelo 'Swingle' 4.79 mm. De Almeida *et al.* (2012) observaron en lima 'Rangpur' a los 180 ddt diámetro de 8.65 mm. En tanto que Arrieta *et al.* (2014) a los 300 ddt en limón Volkameriano fue 7.54 mm de diámetro, esto posiblemente al manejo del sustrato y fertilización utilizada en cada experimento.

Andrade (2008), evaluó C-35 y limón Volkameriano en diferentes sustratos (tierra de vega de río, compost, vermicompost y turba), reportó diferencias significativas en altura y diámetro en C-35 al utilizar compost y vermicompost a los 180 ddt. Vidal (2014) investigó el efecto de *Pseudomonas putida* sobre tres portainjertos entre ellos C-35 y limón Volkameriano; reporta que tanto en diámetro y altura, en plantas C-35, superó a limón Volkameriano en todos los tratamientos en plantas a los 180 ddt.

5.2.1.3. Densidad estomática y número de hojas

La densidad estomática ayuda a explicar el vigor de los portainjertos, ya que a través de ellos se regula el intercambio gaseoso y con ello la fotosíntesis. La fotosíntesis es el proceso básico de producción de energía de las plantas, en este proceso se convierte la energía lumínica en energía química, el cual se almacena en forma de carbohidratos y luego se libera como combustible para llevar a cabo las actividades de las plantas. La conductancia estomática es la medida del grado de apertura y cierre de los estomas y puede relacionarse al estado hídrico de la planta (Qureshi *et al.*, 2022). Se observó diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos, el Testigo, Ruter AA y Hemic+P estimularon mayor densidad y fueron superiores a Raizal 400 (**Figura 15**). A pesar de dicha diferencia el estado hídrico en hojas y tallo no hubo diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos, igual que en la variable área foliar (**Cuadro 4-Apéndice**).

Pacheco (2022) reportó en limón Volkameriano desarrollado en bolsas de plástico de 4 L producidas en invernadero 485.5 estomas mm^{-2} . Esta densidad fue similar a lo estimulado por los tratamientos, pese a ello, dicha autora encontró que los portainjertos alcanzaron el diámetro para ser injertados ($>$ de 6 mm a 20 cm de alto) a los cuatro meses. Esto puede ser al manejo agronómico, fertilización y tamaño del portainjerto al momento del trasplante (Altura: 27.14 cm y diámetro: 2.03 mm).

La densidad estomática observada por Cañizares *et al.* (2003) en limón Volkameriano fue 47.0 estomas mm^{-2} inferior a mandarina 'Cleopatra' (86.4 estomas mm^{-2}). Arrieta *et al.* (2010) caracterizaron agronómicamente el comportamiento vegetativo y densidad estomática en naranjo 'Valencia' injertado en tres portainjertos, mandarino 'Cleopatra' (115.92 estomas mm^{-2}) generó mayor densidad, seguido por mandarino 'Amblicarpa' (112.44 estomas mm^{-2}) y limón Volkameriano (106.28 estomas mm^{-2}). Berdeja *et al.* (2010) observaron la densidad estomática en lima 'Persa' injertado en varios portainjertos entre ellos naranjo agrio que propicio mayor densidad (331.02 estomas mm^{-2}) que Mandarino 'Cleopatra' (329.70 estomas mm^{-2}), 'Flying Dragon' (325.89 estomas mm^{-2}), Mandarino 'Amblicarpa' (321.84 estomas mm^{-2}) y limón Volkameriano (318.41 estomas mm^{-2}). Costa *et al.* (2020) en naranja 'Valencia' (*Citrus sinensis*) tres meses después de ser injertado en 'US-812', 'US-897' y 'X-639' híbridos de mandarina (*C. reticulata*) y naranja trifoliada

(*Poncirus trifoliata*), determinaron que 'US-812' indujo menor densidad con 928 estomas mm^{-2} , siguiendo 'X-639' con 1004 estomas mm^{-2} y 'US-897' con 1005 estomas mm^{-2} . Todos los autores anteriores concluyen que el portainjerto afecta la densidad estomática sobre el vigor y productividad de la planta. Por lo tanto, la densidad estomática de un mismo portainjerto cambia a diversos factores; manejo agronómico, sustrato, nutrición, área geográfica, factores ambientales, salinidad, estrés hídrico y radiación (Petrova, 2012; Wang *et al.*, 2018; Pacheco, 2022). La densidad estomática de Volka de ambos experimentos cambio, Ruter AA, Humic+P y Testigo estimularon mayor densidad en bolsa que en tubete en 22.0, 8.8 y 0.4% respectivamente y Raizal 400 disminuyó 8.5%, esto posiblemente a la fertilización, dosis del bioestimulante y sustrato, mismos que propiciaron condiciones diferentes en el desarrollo de las plantas.

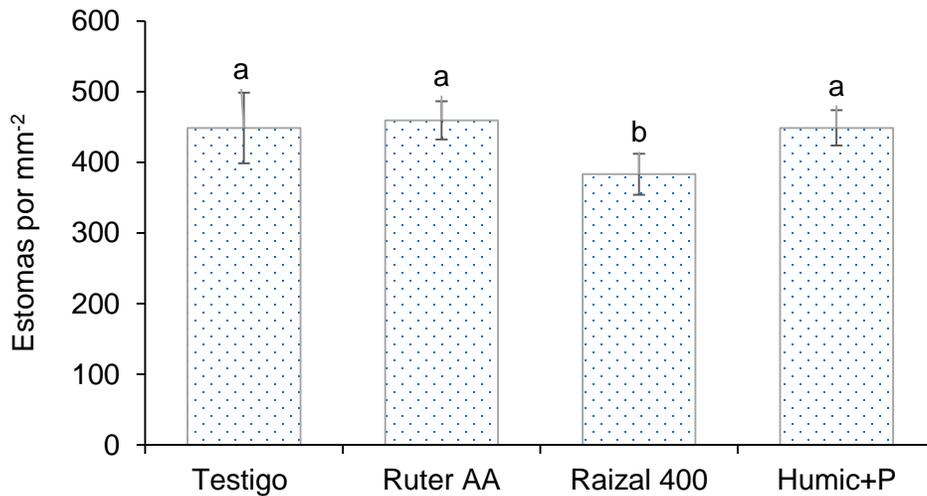


Figura 15. Densidad estomática en hojas de limón Volkameriano en tres bioestimulantes y Testigo a los 90 días después del trasplante en condiciones de invernadero. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales, de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Líneas en cada barra indican la desviación estándar. $\text{DMSH}_{0.05}$ (diferencia mínima significativa honesta) = 32.74, ($n = 16$).

Los tratamientos fueron significativos ($p \leq 0.05$), el Testigo, Ruter AA y Raizal 400 propiciaron la misma cantidad de hojas y fueron mayores a lo estimulado por Humic+P (**Figura 16**), esto puede explicar la cantidad de área foliar que se obtuvo por tratamiento y se reflejó en la altura del portainjerto en dichos tratamientos.

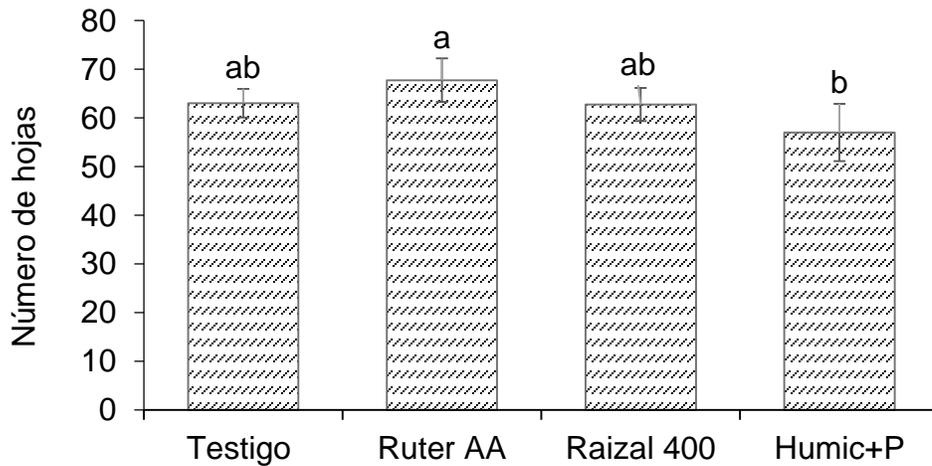


Figura 16. Número de hojas en limón Volkameriano en tres bioestimulantes y Testigo a los 90 días después del trasplante en condiciones de invernadero. Valores con la misma letra son estadísticamente iguales, de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Líneas en cada barra indican la desviación estándar. $DMSH_{0.05}$ (diferencia mínima significativa honesta) = 8.23, ($n = 4$).

Arrieta *et al.* (2014) en limón Volkameriano a los 10 meses después del trasplante (mdt) reportaron mayor número de hojas (93.55) a lo observado en esta investigación y área foliar de 188.96 cm²/10 plantas. De Almeida *et al.* (2012) en lima 'Rangpur' y mandarina 'Sunki' a los 180 ddt reportaron 68.04 y 64.19 hojas respectivamente. Liberato *et al.* (2021) a los 140 ddt reportaron en citrumelo 'Swingle' el área foliar de 400 a 600 cm² con un promedio de 45 hojas por planta. Estos resultados en área foliar se consideran normales, debido a las características intrínsecas de la propia especie, unos portainjertos tienen hojas pequeñas en comparación con otros.

5.2.2. Variables morfométricas

5.2.2.1. Peso de materia fresca y seca en parte aérea y raíz en limón Volkameriano 90 ddt

Los tratamientos en las variables peso total de materia fresca y seca de tallo y raíz y porcentaje de agua no fueron diferentes estadísticamente En contenido de agua para el

análisis estadístico los valores se transformaron de porcentaje a arcoseno ($y = \arcsen \sqrt{y/100}$), sin embargo, los datos se reportan en su escala original (**Cuadro 4-Apéndice**). En cuanto a las variables de la raíz; PTFR, PTSR, PTFRP, PTSRP (**Cuadro 5**), PFRLPO, PSRLPO, PFRRLPO, PSRRLPO (**Cuadro 5-Apéndice**) fueron iguales estadísticamente, Pero en la cantidad de raíces laterales de primer orden hubo diferencias estadísticas entre tratamientos. En esta variable el Testigo, Ruter AA y Raizal 400 propiciaron la misma cantidad de raíces y fueron superiores a Humic+P (**Cuadro 6**), esto puede estar relacionada a la cantidad de fósforo reportado en el análisis foliar en cada tratamiento, la concentración de este nutrimento en Ruter AA; 2.04 g kg⁻¹, Raizal 400; 1.95 g kg⁻¹, Testigo; 1.72 g kg⁻¹ y Humic+P; 1.52 g kg⁻¹.

Pacheco (2022) observó en Volka 13 raíces laterales de primer orden igual que lo estimulado por Raizal 400 y Testigo, en peso seco de raíz por planta fue 12.1 g, en raíz principal en materia fresca 6.3 g y en seca 3.4 g. Mientras que Liberato *et al.* (2021) en citrumelo 'Swingle' obtuvieron en peso seco de la raíz 15.38 g por planta. Arce y Rivera (2018) en carrizo en citrange 'Carrizo' reportaron 9.01 al utilizar composta como sustrato, mientras que Arrieta *et al.* (2014) en Volka 8.8 g, datos superiores a lo reportado en esta investigación, esto puede ser por el manejo, sustrato utilizado y fertilización empleada, además que cada experimento se evaluó en diferentes tiempos después del trasplante.

Cuadro 5. Peso de materia fresca y seca de la raíz y cantidad de raíces laterales de segundo orden de limón Volkameriano en tres bioestimulantes y Testigo en vivero a los 90 días después del trasplante en condiciones de invernadero.

Tratamientos	PTFR	PTSR	PTFRP	PTS RP	CRLPO
	Gramos				
Testigo	38.20 ^a	10.84 ^a	6.73 ^a	3.14 ^a	13.00 ^a
Ruter AA	40.75 ^a	10.90 ^a	7.63 ^a	3.47 ^a	11.75 ^a
Raizal 400	35.26 ^a	9.75 ^a	7.92 ^a	3.35 ^a	13.00 ^a
Humic+P	37.40 ^a	9.54 ^a	6.59 ^a	2.83 ^a	7.50 ^b
DMSH_{0.05}	7.13	3.42	2.47	1.25	3.13
CV	8.52	15.10	15.52	17.73	12.52

Valores con la misma letra por columna son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). DMSH_{0.05}: diferencia mínima significativa honesta, CV: coeficiente de variación. **PTFR**: peso total de materia fresca de la raíz, **PTSR**: peso total de materia seca de la raíz, **PTFRP**: peso total de materia fresca de raíz principal, **PTS RP**: peso total de materia seca de raíz principal, **CRLPO**: cantidad de raíces laterales de primer orden, ($n= 4$).

5.2.3. Análisis químico nutrimental en hoja

En el **Cuadro 6** se muestra la concentración de N, P, K, Ca y Mg estimulados en hojas de limón Volkameriano por tratamientos, se adjuntan los valores “óptimos” de acuerdo a Bataglia *et al.* (2008) en cuatro portainjertos de cítricos desarrollados en bolsas aptos para ser injertados.

En limón Volkameriano los tratamientos no fueron significativos en N, Ca y Mg, contrario en P, Raizal 400 y Ruter AA estimularon la misma concentración de dicho elemento, seguido de Humic+P y con el Testigo hubo menor concentración. En K, Raizal 400, Ruter AA y Testigo propiciaron la misma concentración, al mismo tiempo Ruter AA y Testigo propiciaron la misma concentración que Humic+P (**Cuadro 6**).

Respecto al experimento uno, N, P, K y Mg en bolsa aumentaron 1.9, 1.7, 2.9 y 2.4 veces la concentración, mientras que Ca disminuyó 1.5 veces, esto puede ser al sustrato utilizado, dosis del fertilizante y bioestimulante. En el caso de Ca, hubo mayor concentración en plantas en tubete ya que la concentración de nitrógeno fue menor.

Cuadro 6. Concentración de macronutrientos en hojas de limón Volkameriano en diferentes bioestimulantes y Testigo en etapa de bolsa en condiciones de invernadero a los 90 días después del trasplante.

Tratamiento	N	P	K	Ca	Mg
Humic+P	68.33 ^a	1.72 ^b	20.80 ^b	6.66 ^a	4.44 ^a
Raizal 400	84.67 ^a	2.04 ^a	34.47 ^a	6.44 ^a	4.47 ^a
Ruter AA	87.67 ^a	1.95 ^a	31.74 ^{ab}	5.81 ^a	4.15 ^a
Testigo	78.33 ^a	1.52 ^c	24.69 ^{ab}	5.61 ^a	4.13 ^a
DMSH _{0.05}	32.09	0.20	11.54	1.87	0.41
CV	14.23	3.87	14.62	10.77	3.39
*Óptimo	34.0-36.9	2.4-2.9	19.1-22.1	22.5-27.3	3.2-3.9
**Óptimo	34.6-37.3	2.3-2.6	18.2-23.4	21.1-24.5	3.4-4.0
***Óptimo	28.1-32.4	1.9-2.3	12.8-16.5	25.6-31.7	3.3-3.6
****Óptimo	37.8-41.2	2.3-2.8	20.0-22.8	24.2-29.9	3.5-4.2

Valores óptimos de acuerdo con Bataglia *et al.*, (2008) en cuatro portainjertos; *mandarina 'Cleopatra', **limón 'Rangpur', *** mandarina 'Sunki' y ****citrumelo 'Swingle'. Valores con la misma letra por columna son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). DMSH_{0.05}: diferencia mínima significativa honesta, CV: coeficiente de variación, ($n= 3$).

De acuerdo a los rangos “óptimos” propuestos por Bataglia *et al.* (2008) en todos los tratamientos en N presentaron valores excesivos, igual que en K en los bioestimulantes Raizal 400, Ruter AA y el Testigo, así mismo en Mg en Humic+P y Raizal 400. Aunque no se observaron síntomas de fitotoxicidad en las plantas, dosis altas pueden causar desequilibrios nutricionales. En P Humic+P y el Testigo estimularon valores por debajo de los rangos, igual en Ca en todos los tratamientos. Así que las cantidades requeridas de cada nutriente varían por portainjerto, época del año que se realiza la evaluación y la fase de producción, de forma que de plantas producidas en tubete del experimento 1 la concentración de N, P, K y Mg incremento en 94, 72, 189 y 142% respectivamente en relación a las plantas producidas en bolsas, en Ca disminuyó 39%. Esto puede ser al sustrato manejado en cada etapa y dosis utilizada principalmente. La baja concentración de Ca puede deberse a las altas concentraciones de N, K y. Carvalho *et al.* (2000)

informaron que el aumento de la dosis y la frecuencia de aplicación de nitrógeno (KNO_3) en portainjertos de cítricos incrementaban el contenido de N en los tejidos, reflejando mayor crecimiento en las plantas. Sin embargo, hubo reducción en los niveles de P, K, Ca, Mg y S y en el peso seco total de la planta. Esto concuerda con lo observado por Lima *et al.* (2020) quienes evaluaron diferentes dosis de fertilización con N (Urea 40%) en dos portainjertos en limón 'Rangpur' y citrumelo 'Swingle' y concluyeron que las dosis altas (8 g/planta) de fertilizante nitrogenado influyen negativamente en la absorción de K, Ca y Mg. Para Ca y Mg el fertilizante nitrogenado en dosis intermedias (4 g/planta) beneficio la acumulación de hojas, especialmente para limón 'Rangpur' debido al aumento de desarrollo en las raíces.

Pacheco (2022) reportó valores inferiores en limón Volkameriano a lo observado en esta investigación en N (23 g kg^{-1}), K (13.3 g kg^{-1}) y Mg (1.9 g kg^{-1}). En Ca fue superior (15.4 g kg^{-1}) y en P los valores fueron similares (1.6 g kg^{-1}). Las diferencias pueden deberse al sustrato utilizado, la frecuencia y dosis de fertilización.

De Almeida *et al.* (2012) evaluaron la disponibilidad de N, P y K y crecimiento de dos portainjertos de cítricos al aplicar fertilizantes de liberación lenta y fertilizantes convencionales, a los seis meses después del trasplante determinaron 38, 3.7 y 17.5 g para 'Rangpur' y 34, 2.3 y 14 g para 'Sunki', respectivamente. Guirardi *et al.* (2010) evaluó fuentes de fertilizantes solubles y liberación controlada en dos portainjertos. La concentración de los macronutrientes varió en cada uno. En 'Rangpur' la concentración de N 28.8 g kg^{-1} , P 2.0 g kg^{-1} K 25.8 g kg^{-1} , Ca 15.2 g kg^{-1} y Mg 2.3 g kg^{-1} . En citrumelo 'Swingle' el N 31.1 g kg^{-1} , P 2.0 g kg^{-1} , K 22.0 g kg^{-1} , Ca 17.5 g kg^{-1} y Mg 4.6 g kg^{-1} . Las diferentes respuestas de los portainjertos pueden ser atribuidos a las diferentes características genéticas que influyen en la capacidad de utilizar la luz y el CO_2 , afectando la absorción, transporte e interacción de los nutrientes dentro de la planta y consecuentemente el vigor (Scivittaro *et al.*, 2004).

VI. CONCLUSIONES GENERALES

6.1. Experimento 1

- ✓ Con el bioestimulante Humic + P se obtuvieron plantas aptas para ser trasplantadas a los 90 ddt en los portainjertos limón Volkameriano y Citrange C-35.
- ✓ Con los datos obtenidos en el análisis de tejido foliar se establecieron las concentraciones de referencia para N, P, K, Ca y Mg para el desarrollo de portainjertos de cítricos para etapa de tubete en vivero.

6.2. Experimento 2

- ✓ Con Ruter AA y Raizal 400 a los 90 ddt estimularon mayor número de hojas, área foliar y densidad estomática.
- ✓ Ruter AA, Raizal 400 y Testigo propiciaron mayor cantidad de raíces laterales de primer orden.
- ✓ Los resultados del análisis foliar pueden tomarse como referencia para N, P, K, Ca y Mg para la producción de limón Volkameriano desarrolladas en bolsa en vivero en condiciones de invernadero.
- ✓ Con Ruter AA, se tienen plantas aptas para ser injertadas en tres meses.

VII. LITERATURA CITADA

- Aeschbacher M, Graf C, Schwarzenbach R, Sander M. 2012. Antioxidant Properties of Humic Substances. *Environmental Science Technology* 46(9): 4916-4925. DOI: <https://doi.org/10.1021/es300039h>
- Albrecht U, Bodaghi S, Meyering B, Bowman KD. 2020. Influence of Rootstock Propagation Method on Traits of Grafted Sweet Orange Trees. *HortScience* 55(5): 729-737. DOI: 10.21273/HORTSCI14928-20
- Alcántar GG, Sandoval VM. 1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal, (publicación especial 10). Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A. C. Chapingo, México. 156 p.
- Ampong K, Thilakarathna MS, Gorim LY. 2022. Understanding the role of humic acids on crop performance and soil health. *Frontiers in Agronomy* 4:84862110. DOI: <https://doi.org/10.3389/fagro.2022.848621>
- Andrade LMI. 2008. Materiales orgánicos en la producción de portainjertos de cítricos en vivero. Tesis de maestría en ciencias. Postgrado en Edafología. Colegio de Postgraduados. 173 p.
- Andrade RAdD, Martins ABG. 2003. Propagação vegetativa de porta-enxertos para citros. *Revista Brasileira de Fruticultura* 25(1): 134-136. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452003000100038>
- Arango E, Capote M, Morera S, Clemente J. 2010. Viveros protegidos de cítricos. Manejo Técnico. Taller Regional sobre Viveros de Cítricos. La Habana, Cuba. 26 p.
- Arce SC, Rivera D. 2018. New media components and fertilization to accelerate the growth of citrus rootstocks grown in a greenhouse. *Horticulturae* 4(2): 10. DOI: <https://doi.org/10.3390/horticulturae4020010>
- Arrieta-Ramos BG, Villegas-Monter Á, Hernández BA, Rodríguez MM, Ruiz PLDM, García VE. 2010. Estomas y vigor de naranjo 'valencia' injertado en portainjertos tolerantes al virus de la tristeza de los cítricos. *Revista Fitotecnia Mexicana* 33(3): 257-263.
- Arrieta-Ramos BG, Villegas-Monter Á, Rodríguez-Mendoza MDLN, Luna-Esquivel G. 2014. Desarrollo en vivero de portainjertos de cítricos con malformación de raíz. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 20(1): 29-39. DOI: <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2012.06.034>
- Back MM, Rieth S, Giuliani J, De Souza PVD. 2017. Interação entre porta-enxertos de citros e fungos micorrízicos arbusculares. *Iheringia, Série Botânica* 72(2). 277-282. DOI: <https://isb.emnuvens.com.br/iheringia/article/view/409>
- Bataglia OC, Ferrarezi RS, Furlani PR, Medina CL. 2008. Padrão nutricional de mudas de citros. *Boletim Técnico, Araraquara: Vivecitrus/Conplant. (Boletim Técnico)*. 40 p.

- Battacharyya D, Babgohari MZ, Rathor P, Prithviraj B. 2015. Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae* 196: 39-48. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.012>
- Berdeja-Arbeu R, Villegas-Monter A, Ruíz PLM, Sahagún CJ, Colinas LMT. 2010. Interacción lima persa-portainjertos: Efecto en características estomáticas de hoja y vigor de árboles. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 16 (2): 91-97.
- Berg G. 2009. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84: 11-18. DOI: 10.1007/s00253-009-2092-7 .
- Bisi RB, Albrecht U, Bowman KD. 2020. Seed and seedling nursery characteristics for 10 USDA citrus rootstocks. *American Society for Horticultural Science* 55(4): 528-532. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI14598-19>
- Bowman KD, Joubert, J. 2020. Citrus rootstocks. In: *The Genus Citrus*, Talon M, Caruso M, Gmitter FG.(Eds.).Cambridge, UK: Elsevier;Ppp. 105-127. DOI: 10.1016/b978-0-12-812163-4.00006-1
- Brown PH, Zhao FJ, Dobermann A. 2022. What is a plant nutrient? Changing definitions to advance science and innovation in plant nutrition. *Plant and Soil*, 476,(1-2): 11-23. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-021-05171-w>
- Bulgari R, Cocetta G, Trivellini A, Vernieri P, Ferrante A. 2015. Biostimulants and crop responses: a review. *Biological Agriculture & Horticulture* 31(1): 1-17. DOI: <https://doi.org/10.1080/01448765.2014.964649>
- Calvo P, Nelson L, Kloepper JW. 2014. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil* 383: 3-41. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>
- Canbolat MY, Bilen S, Çakmakçı R, Şahin F, Aydın A. 2006. Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. *Biology and Fertility of Soils* 42:350-357. DOI: [10.1007/s00374-005-0034-9](https://doi.org/10.1007/s00374-005-0034-9)
- Canellas LP, Olivares FL. 2014. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 1(1): 3.1-11. DOI: <https://doi.org/10.1186/2196-5641-1-3>
- Cañizares A, Sanabria ME, Rodríguez DA, Perozo Y. 2003. Características de los estomas, índice y densidad estomática de las hojas de lima Tahití (*Citrus latifolia* Tanaka) injertada sobre ocho patrones cítricos. *Revista UDO Agrícola* 3(1): 59-64.
- Carvalho AC, Mattos JD, Souza M. 2000. Efeito do KNO₃ nos teores de macronutrientes na matéria seca total de porta-enxertos cítricos produzidos em bandejas. *Bragantia* 59(1): 89-94. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0006-87052000000100014>

- Castle WS. 2010. A career perspective on citrus rootstocks, their development, and commercialization. *American Society for Horticultural Science* 45 (1): 11-15. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.1.11>
- Chen Q, Qu Z, Ma G, Wang W, Dai J, Zhang M, Liu Z. 2022. Humic acid modulates growth, photosynthesis, hormone and osmolytes system of maize under drought conditions. *Agricultural Water Management* 263: 107447. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2021.107447>
- Chen Z-H, Chen G, Dai F, Wang Y, Hills A, Ruan Y-L, Zhang G, Franks PJ, Nevo E, Blatt MR. 2017. Molecular evolution of grass stomata. *Trends Plant Science* 22(2): 124-139. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.09.005>
- Colla G, Hoagland L, Ruzzi M, Cardarelli M, Bonini P, Canaguier R, Rouphael Y. 2017. Biostimulant action of protein hydrolysates: Unraveling their effects on plant physiology and microbiome. *Frontiers in Plant Science* 8: 2202. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02202>
- Colla G, Rouphael Y, Di Mattia E, El-Nakhel C, Cardarelli M. 2015. Co-inoculation of *Glomus intraradices* and *Trichoderma atroviride* acts as a biostimulant to promote growth, yield and nutrient uptake of vegetable crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95: 1706-1715. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.6875>
- Costa L, Archer L, Ampatzidis Y, Casteluci L, Caurin GA, Albrecht U. 2021. Determining leaf stomatal properties in citrus trees utilizing machine vision and artificial intelligence. *Precision Agriculture* 22: 1107-1119. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11119-020-09771-x>
- De Almeida LVBD, Marinho CS, Muniz RDA, Carvalho AJCD. 2012. Disponibilidade de nutrientes e crescimento de porta-enxertos de citros fertilizados com fertilizantes convencionais e de liberação lenta. *Revista Brasileira de Fruticultura* 34(1): 289-296. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452012000100038>
- De Campos- Bernardi AC, De Camargo- Carmello QA, Alves S. 2000. Desenvolvimento de mudas de citros cultivadas em vaso em resposta à adubação NPK1. *Scientia Agricola* 57 (4): 733-738.
- Decarlos-Neto A, Siqueira DLD, Pereira PRG, Álvarez VVH. 2002. Crescimento de porta-enxertos de citros em tubetes influenciados por doses de N. *Revista Brasileira de Fruticultura* 24(1): 199-203. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452002000100043>
- Do Nascimento CAF, Martel JHI, Júnior CGP. 2018. Comportamento de porta-enxertos cítricos submetidos em composições de diferentes substratos. *Estação Científica (UNIFAP)* 8(2): 47-56.
- Dobbss LB, Canellas LP, Olivares FL, Aguiar NO, Peres LEP, Azevedo M, Spaccini R, Piccolo A, Façanha AR. 2010. Bioactivity of chemically transformed humic matter from vermicompost on plant root growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(6): 3681-3688. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf904385c>

- Dodd IC, Ruiz-Lozano JM. 2012. Microbial enhancement of crop resource use efficiency. *Current Opinion Biotechnology* 23(2): 236-242. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.09.005.
- Drake PL, Froend RH, Franks PJ. 2013. Smaller, faster stomata: scaling of stomatal size, rate of response, and stomatal conductance. *Journal of Experimental Botany*, 64(2): 495-505. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/ers347>
- Du Jardin P. 2015. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*. 196: 3-14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Dubey AK, Sharma RM. 2016. Effect of rootstocks on tree growth, yield, quality and leaf mineral composition of lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.). *Scientia Horticulturae* 200: 131-136. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.01.013>
- Eiras M, Silva SR, Stuchi ES, Carvalho SA, Garcêz RM. (2013). Identification and characterization of viroids in 'Navelina ISA 315' sweet orange. *Tropical Plant Pathology* 38(1): 58-62. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762013000100009>
- EU. 2019. Regulation of the european parliament and of the council laying down rules on the making available on the market of EU fertilising products and amending Regulations (EC) No 1069/2009 and (EC) No 1107/2009 and repealing Regulation (EC) No 2003/2003. DOI: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=OJ:L:2019:170:TOC>
- Fatma KMS, Morsey MM, Thanana SM. 2015. Influence of spraying yeast extract and humic acid on fruit maturity stage and storability of "Canino" apricot fruits. *International Journal of ChemTech Research* 8(6): 530-543.
- Fernandes PD, Brito MEB, Gheyi HR, Soares Filho WDS, Melo ASD, Carneiro PT. 2011. Crescimento de híbridos e variedades porta-enxerto de citros sob salinidade. *Acta Scientiarum. Agronomy* 33(2): 259-267. DOI: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v33i2.5582>
- Fochesato ML, de Souza PVD, Schäfer G, Maciel HS. 2006. Produção de mudas cítricas em diferentes porta-enxertos e substratos comerciais. *Ciência Rural* 36(5): 5. 1397-1403. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000500008>
- Garza ACA, Olivares SE, González MS, Cabrera FM, Juárez MA, González FJA, Benavides MA. 2022. Strawberry Biostimulation: from mechanisms of action to plant growth and fruit quality. *Plants* 11 (24): 3463. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants11243463>
- Girardi EA, Maourão Filho FDAA, Kluge RA. 2007. Effect of seed coat removal and controlled-release fertilizer application on plant emergence and vegetative growth of two citrus rootstocks. *Fruits* 62(1):13-19. DOI: <https://doi.org/10.1051/fruits:2002044>
- Girardi EA, Mourão Filho FdDAA, Alves ASR. 2010. Mudras de laranja 'Valência' sobre dois porta-enxertos e sob diferentes manejos de adubação. *Revista Brasileira de Fruticultura* 32(3): 855-864. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452010005000082>

- Girardi EA, Mourão Filho FdAA, Graf CCD, OlicLIC FB. 2005. Influence of soluble and slow-release fertilizers on vegetative growth of containerized citrus nursery trees. *Journal of Plant Nutrition* 28(9): 1465-1480. DOI: 10.1080/01904160500201337.
- Girardi EA, Mourão Filho FdDAA. 2006. Production of interstocked 'Pera'sweet orange nursery trees on 'Volkamer'lemon and 'Swingle'citrumelo rootstocks. *Scientia Agricola* 63(1): 5-10. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-90162006000100002>
- Giuliani JC, Rieth S, Soares W, Lourosa GD, Souza PVDD. 2014. Substratos e recipientes para a produção de porta-enxertos . de citros irrigados por subcapilaridade. *Ciência Rural* 44(3): 446-452. DOI <https://doi.org/10.1590/S0103-84782014000300010>
- González-Hernández Á, Guillén-Sánchez D, Alia-Tejacal I, López-Martínez V, Juárez-López P, Bárcenas-Santana D. 2020. Comportamiento de variedades de naranja injertadas en diferentes portainjertos en Xalostoc, Morelos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 11(5): 1123-1134. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i5.2316>
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2010. Compendio de información geográfica municipal 2010 Cazonos de Herrera Veracruz de Ignacio de la Llave. Veracruz, México. https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/30/30033.pdf (Recuperado: junio 2022).
- Jindo K, Martim SA, Navarro EC, Pérez-Alfocea F, Hernández T, García C, Aguiar NO, Canellas LP. 2012. Root growth promoting by humic acids from composted and non-composted urban organic wastes. *Plant and Soil* 353: 209-220. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1024-3>
- Kunicki E, Grabowska A, Sekara A, Wojciechowska R. 2010. The effect of cultivar type, time of cultivation, and biostimulant treatment on the yield of El efecto del tipo de cultivo, tiempo de cultivo y tratamiento bioestimulante en el rendimiento de espinaca (*Spinacia oleracea* L.). *Folia Horticulturae* 22: 9-13. DOI: <https://doi.org/10.2478/fhort-2013-0153>
- Landis TD, Dumroese KR. 2009. Using polymer-coated controlled-release fertilizers in the nursery and after outplanting. *In: Dumroese RK, Landis TD, Watson R, Hutchinson L. (eds). Forest Nursery Notes. USDA, Forest Service. Washington DC. Winter. pp. 5-12.*
- Landis TD, Morgan N. 2009. Growing media alternatives for forest and native plant nurseries. *In: Dumroese, Riley RKLE (eds). National Proceedings: Forest and Conservation Nursery Associations. RMRS-P-58. USDA, Forest Service. Rocky Mountain Research. Fort Collins, C.O., U.S.A. pp 26-31.*
- Landis TD. 1990. Containers: Types and Funtions. *In: Landis TD, Tinus RW, McDonald SE, Barnett JP. The Container Tree Nursery Manual, Volume 2. Agric. Handbook 674. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service. pp. 1- 40.*

- Liberato ÉMS, Leonel S, Souza JMA, Napoleão GM. 2021. Substrate mixing formulations for Citrus nursery management. *Nativa* 9(5): 500-507. DOI: [10.31413/nativa.v9i5.12777](https://doi.org/10.31413/nativa.v9i5.12777)
- Lima TPT, Schäfer G, Martinello BM, Belmonte PH, Dutra SPV. 2020. Interactions between nitrogen fertilization with the growth and leaf macronutrients of citrus rootstocks. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha* 26 (1): 273-287. DOI: [10.36812/pag.2020261273-287](https://doi.org/10.36812/pag.2020261273-287)
- Liu J, Zhang F, Zhou J, Chen F, Wang B, Xie X. 2012. Phytochrome B control of total leaf area and stomatal density affects drought tolerance in rice. *Plant Molecular Biology* 78(3): 289-300. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9860-3>
- Liu M, Wang G, Liu G, Ma F, Bao Z. 2023. Biostimulants promote the sedimentation of salts to restore tomato plant growth under salt stress. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 23: 1830-1844.1-15. <https://doi.org/10.1007/s42729-023-01140-7>. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42729-023-01140-7>
- Luis M, Peña M, Collazo C, Ramos P, Llauger R. 2010. Enfermedades bacterianas y fungosas en viveros de cítricos: características y control. FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, InterAmerican Citrus NETwork, Grupo Empresarial Frutícola (GEF), Instituto de Fruticultura Tropical (IIFT). *Viveros de cítricos en el contexto fitosanitario actual*. 1era. ed. Havana, Cuba: IIFT, pp. 101-126.
- Macías RR, González EGA, Covarrubias GI, Natera FZ, López PMG, López MAR, Pérez ES. 2010. Caracterización física y química de sustratos agrícolas a partir de bagazo de agave tequilero. *Interciencia* 35(7): 515-520.
- Maldonado PMA. 2010. Desarrollo de plántulas de portainjertos de cítricos, en tubete con diferentes sustratos y soluciones nutritivas. Tesis de maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. 96 p.
- Mathers HM, Lowe SB, Scagel C, Struve DK., Case LT. 2007. Abiotic factors influencing root growth of woody nursery plants in containers. *HortTechnology* 17(2):151-162. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.17.2.151>
- Mengel K, Kirby EA. 2000. Principios de nutrición vegetal. 4ta. Edición. 1ra. Ed. en español. Instituto Internacional de la Potasa. Basilea, Suiza, 607 p.
- Muscolo A, Sidari M, Attinà E, Francioso O, Tugnoli V, Nardi S. 2007. Biological activity of humic substances is related to their chemical structure. *Journal of American Soil Science Society* 71(1): 75-85. DOI: <https://doi.org/10.2136/sssaj2006.0055>
- Muscolo A, Sidari M, Nardi S. 2013. Humic substance: Relationship between structure and activity. deeper information suggests univocal findings. *Journal of Geochemical Exploration* 129: 57-63. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2012.10.012>

- Nambuthiri S, Geneve RL, Sun Y, Wang X, Fernandez RT, Niu G, Bi G, Fulcher A. 2015. Substrate temperature in plastic and alternative nursery containers. HortTechnology 25(1): 50-56. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.25.1.50>
- Orozco-Gutiérrez GO, Muñoz-Flores HJM, Sánchezs-Rueda AR, Rodríguez-Sígala JÁS, Prieto-Ruiz JÁP, García-Magaña JJG. 2010. Diagnóstico de la calidad de planta en los viveros forestales del estado de Colima. Revista Mexicana de Ciencias Forestales 1(2): 134-145. DOI: <https://doi.org/10.29298/rmcf.v1i2.641>
- Ortega U, Majada J, Mena-Petite A, Sánchezs-Zabala JZ, Rodríguez-IturrizarIN, Txarterina K, Azpitarte J, Duñabeitia M. 2006. Field performance of *Pinus radiata* D. Don produced in nursery with different types of containers. New Forests 31: 97-112. DOI 10.1007/s11056-004-7364-6 .
- Ouyang W, Struik PC, Yin X, Yang J. 2017. Stomatal conductance, mesophyll conductance, and transpiration efficiency in relation to leaf anatomy in rice and wheat genotypes under drought. Journal of Experimental Botany, 68(18): 5191-5205. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erx314>
- Pablo MMC. 2018. Análisis de sanidad y calidad de la planta en viveros cítricos. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. 96 p.
- Pacheco CAG. 2022. Porosidad total del sustrato en el desarrollo de portainjertos de cítricos en vivero. Tesis de maestría en ciencias. Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad. Colegio de Postgraduados. 89 p.
- Pastor SJN. 1999. Utilización de sustratos en viveros. Terra Latinoamericana17(3): 231-235.
- Peixoto CP, Cerqueira EC, Soares FWDS, Castro NMTD, Ledo CADS, Matos FS, Oliveira JGD. 2006. Análise de crescimento de diferentes genótipos de citros cultivados sob déficit hídrico. Revista Brasileira de Fruticultura28: 439-443. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452006000300022>
- Pérez OZ, Urrutia VM, Zamora OP, Rodríguez SB. 2002. Crecimiento y rendimiento de naranja valencia injertada en 16 portainjertos de cítricos establecidos en el suelo calcimórfico, y calidad del jugo. Agrocencia 36 (2): 137-148.
- Petrova Y. 2012. The effect of light intensity on the stomatal density of lavender, *Lavandula angustifolia*. Young Scientists Journal 5(12): 89.
- Pilon SEA, Quinn CF, Tapken W, Malagoli M, Schiavon M. 2009. Physiological functions of beneficial elements. Current Opinion in Plant Biology 12(3): 267-274. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.04.009>
- Popescu GC, Popescu M. 2018. Yield, berry quality and physiological response of grapevine to foliar humic acid application. Bragantia 77(2): 273–282. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4499.2017030>

- Qureshi MA, Jaskani MJ, Khan AS, Ahmad R. 2022. Influence of endogenous plant hormones on physiological and growth attributes of kinnow mandarin grafted on nine rootstocks. *Journal of Plant Growth Regulation* 41(3): 1254-1264. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10380-9>
- Raven JA. 2014. Speedy small stomata? *Journal of Experimental Botany* 65(6): 1415-1424. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/eru032>
- Robles GPL, Sánchez AHM, Loeza KE. 2008. Programa nacional de certificación de material propagativo de cítricos en México. SAGARPA-SENASICA. D.F., México.
- Rocha PM. 2002. Enfermedades de los cítricos causadas por virus y otros agentes infecciosos transmitidos por injerto. Memoria del Primer Simposio Nacional de Capacitación Citrícola en el Estado de Oaxaca. Puerto Escondido, Oaxaca.
- Rodrigues MJDS, Oliveira ERMD, Girardi EA, Ledo CADS, Soares FWDS. 2016. Produção de mudas de citros com diferentes combinações copa e porta-enxerto em viveiro protegido. *Revista Brasileira de Fruticultura* 38(1): 187-201. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-2945-284/14>
- Sáenz RJ, Muñoz FHJ, Pérez CMÁ, Rueda S A, Hernández RJ. 2014. Calidad de planta de tres especies de pino en el vivero "Morelia", estado de Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 5 (26): 98-111.
- Salgado GS, Núñez ER. 2010. Manejo de fertilizantes químicos y orgánicos. Ediciones Mundi prensa. México, D.F. Ppp 53-62.
- Sandoval RJA. 2011. Producción de planta certificada en vivero. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, Martínez de la Torre, Veracruz, México.
- Sanjuán J, Nápoles MC, Pérez MD, Lorite MJ, Rodríguez NDN. 2023. Microbials for Agriculture: why do they call them biostimulants when they mean probiotics? *Microorganisms* 11(1): 153. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010153>
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 9(7): 671–675. DOI: [10.1038/nmeth.2089](https://doi.org/10.1038/nmeth.2089).
- Scivittaro WB, Oliveira RP, Morales CFG, Radmann EB. 2004. Adubação nitrogenada na formação de porta-enxertos de limoeiro 'Cravo' em tubetes. *Revista Brasileira de Fruticultura* 26(1): 131-135. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452004000100036>
- Serrano LAL, Marinho CS, Carvalho AJC, Monnerat PH. 2004. Efeito de sistemas de produção e doses de adubo de liberação lenta no estado nutricional de porta-enxerto cítrico. *Revista Brasileira de Fruticultura* 26 (3): 524-528. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452004000300036>
- SIAP (Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural). 2022. Citricultura, actividad de alta prioridad para la secretaría de Agricultura. Ciudad de México. México. <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/citricultura-actividad-de-alta-prioridad-para->

la-secretaria-de-agricultura?idiom=es#:~:text=En%202021%20se%20produjeron%208.6,de%20jugo%20de%20naranja%2C%20anot%C3%B3. (Recuperado: noviembre, 2022).

Sofiyanti N, Wahyuni PI, Iriani D. 2022. Stomatal characteristics of 5 *Citrus* L. species (Rutaceae) from Pekanbaru, Riau province. *Journal Biologi Tropis* 22 (1): 173-178. DOI: [10.29303/jbt.v22il.3100](https://doi.org/10.29303/jbt.v22il.3100)

Teixeira PDTL, Schäfer G, Souza PVDD, Todeschini A. 2009. Desenvolvimento vegetativo de porta-enxertos de citros produzidos em diferentes recipientes. *Ciência Rural* 39(6): 1695-1700. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000122>

Trevisan S, Pizzeghello D, Ruperti B, Francioso O, Sassi A, Palme K, Quaggiotti S, Nardi S. 2010. Humic substances induce lateral root formation and expression of the early auxin-responsive IAA19 gene and DR5 synthetic element in *Arabidopsis*. *Plant Biology* 12(4): 604-614. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2009.00248.x>

Vatansever R, Ozyigit II, Filiz E. 2017. Essential and beneficial trace elements in plants, and their transport in roots: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 18(1): 464-482. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2224-3>

Vessey JK. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255: 571-586. DOI: [10.1023/a:1026037216893](https://doi.org/10.1023/a:1026037216893)

Vidal MNA. 2014. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en portainjertos de cítricos. Tesis de maestría en ciencias. Postgrado en Agroecosistemas Tropicales. Colegio de Postgraduados. 79 p.

Villegas MA, Aguilera AM. 2011. Avances de la fruticultura en México. *Revista Brasileira de Fruticultura* 33: 179-186. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011000500021>

Vimos CF, Toalombo PA, Díaz H, Trujillo JV. 2020. Rendimiento productivo del *Pennisetum* sp. con varios niveles de sustancias húmicas más una base de enraizador. *Archivos de Zootecnia* 69 (2665): 226-232. DOI: <https://doi.org/10.21071/az.v69i266.5118>

Wang Z, Li G, Sun H, Ma L, Guo Y, Zhao Z, Gao H, Mei L. 2018. Effects of drought stress on photosynthesis and photosynthetic electron transport chain in young apple tree leaves. *Biology Open* 7(11): bio035279. DOI: [10.1242/bio.035279](https://doi.org/10.1242/bio.035279).

Xu Z, Zhou G. 2008. Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *Journal of Experimental Botany* 59 (12): 3317-3325. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/ern185>

Yakhin OI, Lubyantsev AA, Yakhin IA, Brown PH. 2017. Biostimulants in plant science: a global perspective. *Frontiers in Plant Science* 7: 2049. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02049>

Zamora OPB, Rodríguez SB, Urrutia VM. 2003. Selección de portainjertos para naranja "Valencia" en suelos calcimórficos. *Terra Latinoamericana* 21 (1): 47-55.

Zhao W, Sun Y, Kjelgren R, Liu X. 2015. Response of stomatal density and bound gas exchange in leaves of maize to soil water deficit. *Acta Physiologiae Plantarum* 37:17041-9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1704-8>

APÉNDICE

Cuadro 1-A. Ecuaciones de crecimiento en altura de la planta y diámetro del tallo en dos portainjertos de cítricos con diferentes bioestimulantes en etapa de tubete en vivero en condiciones de invernadero.

Tratamientos	Limón Volkameriano			
	Ecuación (Altura, cm)	R ²	Ecuación (Diámetro, mm)	R ²
Ruter AA	$y = 6.1531x - 3.1438$	0.9869	$y = 0.3645x + 1.2552$	0.9785
Raizal 400	$y = 4.9031x - 1.0708$	0.9998	$y = 0.3473x + 1.2973$	0.9895
Testigo	$y = 5.85x - 3.5042$	0.999	$y = 0.3383x + 1.2727$	0.9815
Tratamientos	Citrange 35			
	Ecuación (Altura, cm)	R ²	Ecuación (Diámetro, mm)	R ²
Ruter AA	$y = 10.281x - 5.8292$	1.000	$y = 0.4558x + 1.1435$	0.9711
Raizal 400	$y = 10.741x - 5.9396$	0.9988	$y = 0.4955x + 1.2006$	0.9883
Testigo	$y = 8.0875x - 5.325$	0.9905	$y = 0.4244x + 1.1883$	0.9809

Cuadro 2-A. Peso de materia fresca y seca de raíz principal, raíces laterales de primer orden y cantidad total raíces laterales de primer orden de limón Volkameriano y Citrange C-35 en tres bioestimulantes y Testigo a los 90 días después del trasplante en vivero en condiciones de invernadero.

Tratamientos	g kg ⁻¹				
	PFRP	PSRP	PFRLPO	PSRLPO	TRLPO
Limón Volkameriano					
Humic+P	0.404 ^a	0.155 ^{ab}	1.442 ^a	0.199 ^a	29.333 ^a
Raizal 400	0.461 ^a	0.173 ^a	1.493 ^a	0.251 ^a	28.167 ^a
Ruter AA	0.419 ^a	0.153 ^{ab}	1.409 ^a	0.204 ^a	26.500 ^a
Testigo	0.345 ^a	0.098 ^b	1.287 ^a	0.196 ^a	23.500 ^a
DMSH _{0.05}	0.126	0.058	0.554	0.095	11.901
CV	18.522	23.894	23.660	26.991	26.613
Citrange 35					
Humic+P	0.694 ^a	0.236 ^a	1.563 ^a	0.246 ^a	29.667 ^a
Raizal 400	0.491 ^{ab}	0.158 ^{ab}	1.369 ^a	0.190 ^a	37.167 ^a
Ruter AA	0.405 ^b	0.135 ^b	1.033 ^a	0.153 ^a	29.500 ^a
Testigo	0.560 ^{ab}	0.186 ^{ab}	1.419 ^a	0.226 ^a	31.333 ^a
DMSH _{0.05}	0.251	0.081	0.609	0.096	11.361
CV	28.102	27.342	27.199	28.465	21.391

Valores con la misma letra por columna son estadísticamente iguales, de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). DMSH_{0.05}: diferencia mínima significativa honesta, CV: coeficiente de variación. **PFRP**: peso de materia fresca de raíz principal, **PSRP**: peso de materia seca de raíz principal, **PFRLPO**: peso de materia fresca raíz lateral de primer orden, **PSRLPO**: peso de materia seca raíz lateral de primer orden, **TRLPO**: total raíces laterales de primer orden, ($n= 6$).

Cuadro 3-A. Número de hojas de dos portainjertos en tres bioestimulantes y Testigo a los 90 días después del trasplante en vivero en condiciones de invernadero.

Tratamientos	Número de hojas
Limón Volkameriano	
Humic+P	16.83 ^a
Raizal 400	15.83 ^a
Ruter AA	16.25 ^a
Testigo	13.50 ^b
DMS	1.64
CV	9.52
Citrango 35	
Humic+P	26.00 ^a
Raizal 400	24.00 ^{ab}
Ruter AA	23.58 ^b
Testigo	21.25 ^c
DMS	2.10
CV	8.00

Valores con la misma letra por columna son estadísticamente iguales, de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). DMS_{0.05}: diferencia mínima significativa honesta, CV: coeficiente de variación, ($n = 12$).

Cuadro 4-A. Variables de la parte aérea de limón Volkameriano en tres bioestimulantes y Testigo a los 90 ddt en vivero en condiciones de invernadero.

Tratamientos	Diámetro	Área foliar	Tallo			Hoja		
			Materia fresca	Materia seca	Agua (%)	Materia fresca	Materia seca	Agua (%)
Gramos								
Testigo	8.27 ^a	1391.0 ^a	40.12 ^a	18.60 ^a	53.9 ^a	34.08 ^a	12.21 ^a	64.2 ^a
Ruter AA	8.60 ^a	1550.1 ^a	33.38 ^a	19.88 ^a	54.2 ^a	37.52 ^a	13.29 ^a	64.6 ^a
Raizal 400	8.13 ^a	1494.7 ^a	39.56 ^a	17.68 ^a	55.4 ^a	35.79 ^a	12.50 ^a	65.1 ^a
Humic+P	8.04 ^a	1352.1 ^a	36.77 ^a	16.95 ^a	53.9 ^a	31.96 ^a	11.65 ^a	63.5 ^a
DMSH _{0.05}	0.74	293.27	23.22	5.07	1.95	7.53	3.12	1.71
CV	4.05	9.18	28.09	12.58	1.86	9.79	11.40	1.45

Valores con la misma letra por columna son estadísticamente iguales, de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). DMSH_{0.05}: diferencia mínima significativa honesta, CV: coeficiente de variación, ($n= 4$).

Cuadro 5-A. Variables de la raíz de limón Volkameriano en tres bioestimulantes y Testigo a los 90 ddt en vivero en condiciones de invernadero.

TRATA	PFRLPO	PSRLPO	PFRRLLPO	PSRRLLPO	Agua (%)
Testigo	25.80 ^a	6.51 ^a	5.67 ^a	1.20 ^a	71.7 ^a
Ruter AA	26.03 ^a	6.03 ^a	7.09 ^a	1.41 ^a	73.2 ^a
Raizal 400	21.68 ^a	5.16 ^a	5.67 ^a	1.31 ^a	72.2 ^a
Humic+P	23.76 ^a	5.37 ^a	7.06 ^a	1.35 ^a	74.5 ^a
DMSH _{0.05}	6.92	2.66	3.14	0.49	4.40
CV	12.89	20.87	22.31	17.10	3.40

Valores con la misma letra por columna son estadísticamente iguales, de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). DMSH_{0.05}: diferencia mínima significativa honesta, CV: coeficiente de variación. **TRATA**: tratamientos, **PFRLPO**: peso de materia fresca raíz lateral de primer orden, **PSRLPO**: peso de materia seca raíz lateral de primer orden, **PFRRLLPO**: peso de materia fresca del resto de raíces laterales de primer orden, **PSRRLLPO**: peso seco del resto de raíces laterales de primer orden, ($n = 4$).