




**UNIVERSIDAD DE MATANZAS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**



**Evaluación de los bioestimulantes naturales IHO-BIO y IHO-MINERAL en plantas pomelo 'Marsh' afectadas por Huanglongbing en Jagüey Grande Cuba**

**Tesis presentada en opción al**  
**Título de Especialista en Fruticultura Tropical**

**Autor:** Ing. Benito González Rodríguez

**Tutor:** MSc. Alina Puente Sánchez

Jagüey Grande

2018

## **DEDICATORIA**

A mi familia, particularmente a mis hijos para que sigan el ejemplo de su padre

## **AGRADECIMIENTOS**

De forma especial a toda mi familia que siempre me ha estimulado en mis ansias de superación.

A la Empresa Agroindustrial “Victoria de Girón” por darnos la oportunidad de superarnos.

A todos los profesores de la Universidad de Matanzas por su dedicación.

A mi tutor MSc. Alina Puente Sánchez por su valiosa contribución.

Al Dr. C. Miguel Aranguren González por sus oportunas recomendaciones.

A todos mis compañeros de trabajo que me alentaron para salir adelante.

A todos muchas gracias

## **RESUMEN**

Atendiendo a los resultados favorables en cuanto a disminución del deterioro de las en plantaciones de cítricos observados en Indian River en la Florida con la aplicación de los productos IHO, se decide extender la experiencia a la empresa Agroindustrial "Victoria de Girón". Por tanto, es necesario conocer la influencia de los bioestimulantes naturales IHO-MINERAL y IHO-BIO en la producción y la calidad de los frutos en plantaciones de pomelo 'Marsh'. En una plantación de pomelo 'Marsh', se aplicaron cuatro tratamientos de aplicaciones foliares de bioestimulantes. En cada tratamiento se determinó el área foliar y la longitud de los brotes, así como la producción y calidad de los frutos. Las aplicaciones foliares de los bioestimulantes evaluados no brindaron efecto positivos en el desarrollo vegetativo de las plantas. Las aplicaciones foliares de los bioestimulantes mostraron resultados inferiores en la producción y el rendimiento a los obtenidos por la tecnología de la empresa. La valoración económica de los resultados obtenidos permitió un ahorro considerable por la no importación de los bioestimulantes IHO. La aplicación foliar de los bioestimulantes naturales IHO-MINERAL y IHO-BIO no resultó una alternativa viable para incrementar la producción y calidad de los frutos en plantaciones de pomelo 'Marsh'.

**Palabras clave:** bioestimulantes, producción, calidad de los frutos.

<b>ÍNDICE</b>	<b>Pág.</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.</b>	<b>3</b>
2.1. El cultivo de los cítricos.	3
2.1.1. El Huanglongbing de los cítricos.	7
2.1.1.2. Agente causal y propiedades.	9
2.1.1.3. Síntomas.	10
2.1.1.3.1. Síntomas foliares.	10
2.1.1.3.2. Síntomas y daños en frutos.	10
2.2. Bioestimulantes.	12
2.2.1. Acción de los bioestimulantes.	14
2.2.2. Tipos de bioestimulantes.	16
2.2.2.1. Bioestimulante a base de aminoácidos.	16
2.2.2.2. Bioestimulante a base de algas pardas.	17
2.2.2.3. Bioestimulante a base de ácidos fulvicos.	17
2.2.2.4. Bioestimulante a base de bacterias.	18
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>20</b>
3.1. Ubicación del experimento.	20
3.2. Tratamientos y diseño experimental.	20
3.3. Efecto de las aplicaciones foliares de bioestimulantes naturales IHO-MINERAL y IHO-BIO en el desarrollo vegetativo de las plantas.	21
3.3.1. Determinación del índice área foliar.	21
3.3.2. Determinación de la longitud de los brotes.	21
3.4. Influencia de las aplicaciones foliares de bioestimulantes en la producción.	21
3.5. Efecto de las aplicaciones foliares de bioestimulantes en la calidad de los frutos.	21

3.6. Análisis y programa estadístico empleado.	22
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b>	23
4.1. Efecto de las aplicaciones foliares de bioestimulantes naturales IHO-MINERAL y IHO-BIO en el desarrollo vegetativo de las plantas.	23
4.1.1. Área foliar en pomelo 'Marsh'.	23
4.1.2. Longitud de los brotes en pomelo 'Marsh'.	27
4.2. Resultados de las aplicaciones foliares de los Bioestimulantes IHO en la producción.	28
4.3. Resultados de las aplicaciones en la calidad de los frutos en pomelo 'Marsh'.	29
4.4. Valoración económica de los resultados.	30
<b>5. CONCLUSIONES.</b>	32
<b>6. RECOMENDACIONES.</b>	33
<b>7. BIBLIOGRAFIA.</b>	34

## **1. INTRODUCCIÓN.**

En los últimos años ha ganado terreno el desarrollo de productos naturales amigables con el medio ambiente para su empleo en la agricultura. Recientemente la Empresa IHO-Agro International Inc. registró los fertilizantes naturales IHO-MINERAL e IHO-BIO en EE.UU, Panamá y algunos países de Europa y se encuentra en vías de registro en Canadá, Guatemala, Chile, California y Cuba (Hossu, 2015).

IHO-MINERAL, bioestimulante natural, concentrado de extractos de diferentes sales, incluyendo sales marinas, arena y algo de materia orgánica, de origen natural que se encuentra en la superficie de la tierra. Es considerado un suplemento mineral de micro-nutrientes para las plantas, contiene más de 70 elementos, la mayoría de ellos son difíciles de detectar debido a su baja concentración (Hossu, 2015).

IHO-BIO, es un concentrado de extractos de diferentes sales, incluyendo sales marinas, arena y extractos de plantas. Contiene todos los micro-nutrientes presentes en IHO-MINERAL, además contiene extractos de plantas ricos en aminoácidos, vitaminas y diversas hormonas vegetales. Es un producto complejo, que contiene las vitaminas A, B, C, D, E, K, U, B1, B2, B6, y B12, así como proteínas, aminoácidos, ácidos, azúcares y muchos otros compuestos orgánicos complejos. Contiene hormonas vegetales de origen natural, tales como triacantanol, auxinas, citoquininas y giberelinas (Hossu, 2015).

Los ensayos realizados con estos productos en cultivos como tomate, pepino, lechuga, uva, manzanas, papaya, entre otros, manifestaron incrementos en las variables evaluadas, destacándose los aumentos en el rendimiento y calidad de las cosechas. En cultivos de frutales, el IHO-BIO incrementó el rendimiento en 20,1%; manzanas 12,1% en uvas; 27% en fresa y 25% en papaya (Hossu, 2015).

En Cuba, se realizaron estudios por el IIH "Liliana Dimitrova" en pimientos y gladiolos con la aplicación foliar de IHO-MINERAL a dosis de 425 mL.100 L de H<sub>2</sub>O con una frecuencia de tres aplicaciones como complemento a la fertilización normal. Los resultados en pimiento indicaron un incremento en el tamaño de las plantas, el contenido relativo de clorofila, el porcentaje de N y Mg, la cantidad de frutos y la productividad (Hernández, 2015).

Los resultados en gladiolos también fueron positivos, destacándose el incremento de los niveles de N, Ca, Zn y Mn, así como el porcentaje de floración y la calidad alcanzada, también se informa sobre su capacidad para aumentar la tolerancia en las plantas ante el ataque de plagas y enfermedades (Hernández, 2015).

El objetivo de esta investigación es evaluar los efectos de las aplicaciones de los fertilizantes naturales IHO-BIO y IHO-MINERAL, en la fisiología de los árboles, los indicadores de productividad y la situación del Huanglongbing (HLB) en plantaciones de cítricos afectadas por esta enfermedad.

Tales premisas conducen a plantear el siguiente **problema científico**: ¿se pueden disminuir los efectos de las deficiencias nutricionales, elevar la producción y la calidad de los frutos en plantaciones de pomelo 'Marsh' (*Citrus paradisi* Macf.) con el empleo de bioestimulantes?

A partir de este problema se formuló la **hipótesis**: El empleo de los bioestimulantes naturales IHO-MINERAL y IHO-BIO en árboles de pomelo 'Marsh' (*Citrus paradisi* Macf.), puede promover una mejor nutrición de las plantas, eleva la producción y calidad de los frutos.

**Objetivo general:** Evaluar la influencia de los bioestimulantes naturales IHO-MINERAL y IHO-BIO en la producción y la calidad de los frutos en plantaciones de pomelo 'Marsh'.

**Objetivos específicos:**

- Evaluar el efecto de las aplicaciones foliares de bioestimulantes naturales IHO-MINERAL y IHO-BIO en el desarrollo vegetativo de las plantas.
- Analizar la influencia de las aplicaciones foliares de bioestimulantes naturales IHO-MINERAL y IHO-BIO en el estado nutricional de las plantas.
- Determinar el efecto de las aplicaciones foliares de biofertilizantes naturales IHO-MINERAL y IHO-BIO en la producción y calidad de los frutos.



## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.**

### **2.1. El cultivo de los cítricos.**

Los cítricos constituyen el tercer cultivo frutal de mayor importancia en todo el mundo, después de la manzana y el plátano, debido a su papel en los hábitos alimenticios de gran parte de la población mundial (Talon y Gmitter, 2008; Singh y Rajam, 2009). Con el nombre de agrios en España, agrumes en Francia, Agrumi en Italia y citrus en los países de habla inglesa, es comúnmente designado un conjunto de plantas, como naranjo dulce y amargo, limonero, mandarina, pomelo o toronjo; pertenecientes a los géneros *Citrus*, *Poncirus* y *Fortunella* según González (1999) citado por Cueto (2009).

Son utilizados en la alimentación por su alto valor nutricional y en la industria farmacéutica y de cosméticos por su contenido de aceites esenciales. Constituyen un importante complemento de la dieta humana debido al elevado contenido de vitaminas, minerales, azúcares y otros compuestos que contienen según González (1999) citado por Cueto (2009).

Los cítricos son frutos de gran valor comercial que se han distribuido ampliamente por regiones tropicales y subtropicales del mundo, donde su cultivo ha representado una vía importante para diversificar la economía de diferentes naciones, con la obtención de ganancias que respaldan el continuo crecimiento de la producción y la exportación, a partir de la comercialización de frutos frescos y subproductos. Brasil, Estados Unidos y China, acumulan más del 40% de la producción mundial, mientras que Cuba se ubica en el lugar 17 entre los países productores, y junto a los Estados Unidos e Israel entre los principales proveedores de pomelos del mundo (FAO, 2003 a, b).

Las condiciones insulares de Cuba, su ubicación geográfica en la región tropical, la permanencia de los cítricos y los elementos del agroecosistema, son factores que favorecen el desarrollo de insectos, ácaros y microorganismos, que afectan el desarrollo vegetativo, el rendimiento y la calidad del fruto cítrico según González (1999) citado por Cueto (2009).

En 1959 la producción de cítricos en Cuba era de alrededor de 60 000 t y la superficie plantada era aproximadamente de 12 000 ha. A partir de 1968 se despliega un amplio esfuerzo para dotar al país de una tecnología adecuada para el

fomento y las atenciones que el cultivo de los cítricos requiere según González (1999) citado por Cueto (2009) resultando la fertilización y el riego las labores más importantes debido a la influencia de estas en la obtención de elevados rendimientos.

El Programa de Cítricos en Cuba, se inició en el año 1968 con el objetivo de realizar exportaciones al Campo Socialista e incrementar el consumo interno, a un costo de 600 millones de pesos. A partir de la década de los sesenta, la citricultura cubana tuvo un crecimiento vertiginoso, la producción representó 662000t en una superficie de alrededor de 70 000 ha, existiendo un incremento sustancial de producción y de área plantada (Cueto, 2009).

En 1990 el área plantada sobrepasó las 140 mil hectáreas y la producción obtenida fue de algo más de un millón de toneladas de frutas con un rendimiento promedio cercano a las 7,0 toneladas por hectárea. En 1991 desapareció el mercado Socialista y como consecuencia del Período Especial, en la campaña 1993-1994 la producción se redujo hasta aproximadamente la mitad de la obtenida en 1990 (Cueto, 2009).

Todo esto condujo a que durante los años 1995-1996 se realizara una revisión del Programa de Cítricos, priorizando la industria como el destino final de las frutas. Se seleccionaron las áreas a atender, se categorizaron y se establecieron tecnologías de producción de acuerdo a las posibilidades reales de rendimientos de cada plantación. Esto permitió que en el año 2000, el área de cítricos bajo atención especializada se redujera hasta algo más de 50 mil hectáreas y la producción alcanzada fuera cercana a las 900 mil toneladas, creciendo el rendimiento hasta 17 toneladas por hectárea. Los jugos y aceites se convirtieron en el principal renglón exportable y financieramente se alcanzó un saldo favorable (Cueto, 2009).

En el período 2001-2005 la producción cítrica fue afectada por el paso de cuatro huracanes por la región occidental y por la intensa sequía que azotó la región oriental, ocasionando pérdidas acumuladas de un millón 165 mil toneladas de frutas y 131 millones de USD. En el período 2001-2007 por problemas fitosanitarios y financieros sólo se sembraron algo más de nueve mil hectáreas (Cueto, 2009).

Las plantaciones continuaron con un deterioro acumulado por la edad, presencia de enfermedades de alto impacto económico y afectaciones a las tecnologías, lo

que conllevó a que en el año 2007 el área dedicada a la producción de cítricos se redujera a 42 mil hectáreas, y la producción a sólo 374 mil toneladas; el déficit financiero se incrementó (Cueto, 2009).

La productividad de los cítricos, al igual que todas las plantas cultivadas, está estrechamente ligada a sus disponibilidades de agua a lo largo de su ciclo vegetativo. Como constituyente esencial del protoplasma, el agua puede suponer hasta un 95% del peso total de algunas especies vegetales y la mayor parte de los procesos fisiológicos que realizan, están influidos directa o indirectamente por su abastecimiento (Del Amor, 2001).

Podemos decir que el agua, constituye uno de los elementos más importantes para la producción agrícola, por tal motivo es importante asegurar un suministro adecuado, no solo en cantidad, sino en disponibilidad a lo largo del ciclo del cultivo (Del Amor, 2001).

Existe un conjunto de factores que influyen en el crecimiento adecuado de las plantas, entre los que se pueden citar las condiciones nutricionales y el clima. Las condiciones climáticas de Cuba son favorables para lograr rendimientos aceptables y no significa por tanto un impedimento real, sin embargo el suelo no posee la riqueza en nutrientes, necesaria para lograr producciones óptimas (Borroto y Borroto, 1991).

La fertilización o nutrición, algunos autores la definen como el conjunto de relaciones existentes entre la planta y determinados componentes químicos, se puede clasificar en: hídrica, carbonada y mineral. De acuerdo con esta clasificación, las plantas para lograr un buen desarrollo requieren de 16 elementos esenciales, sus deficiencias reducen drásticamente el crecimiento y provocan síntomas visuales que son superables con el suministro del nutrimento (IIFT, 1999)

Es esencial para la obtención de altos rendimientos en los cítricos la aplicación de nitrógeno, fósforo y potasio. Es sin dudas, primordial para el desarrollo vegetativo y la producción de los cítricos Del Amor (2001). Los suelos no poseen generalmente cantidades suficientes para garantizar por sí solos altas producciones agrícolas de forma continuada; por lo que las aplicaciones de fertilizantes son una condición determinante para alcanzar buenos resultados en la agricultura moderna (Rodríguez, 1996).

La sostenibilidad y eficiencia de la agroindustria de este cultivo a nivel mundial está amenazada por la rápida expansión de enfermedades de alto impacto económico. En apenas tres décadas la situación fitosanitaria se ha visto comprometida por la rápida diseminación de algunas enfermedades tales como cancrrosis, tristeza, leprosis; la introducción en países del área del Caribe de enfermedades y vectores como Huanglongbing (HLB) y su vector *Diaphorina citri* Kuw.; el agravamiento de los efectos de enfermedades como black spot y otras enfermedades producidas por hongos y por viroides, así como la presencia de nuevas enfermedades como clorosis variegada y muerte súbita que son tanto o más dañinas que la tristeza en algunos casos y de otras ya conocidas.

Teniendo en cuenta el empeoramiento de la situación fitosanitaria en el continente y en Cuba y su efecto sobre la producción citrícola, así como la necesidad de una recuperación financiera a corto plazo. La dirección del país aprobó un programa de desarrollo con el objetivo de que este posibilitará el cambio hacia una citricultura intensiva y sostenible. Caracterizando las áreas actuales de producción en cada circuito para la atención tecnológica de las que posean potencial para mantener e incrementar los rendimientos. Las áreas no seleccionadas son atendidas solamente para la cosecha de sus producciones residuales, manteniéndose bajo control fitosanitario hasta su demolición (Cueto, 2009).

En el 2011, estos cultivos cubren una extensión de 45 800 ha, con un rendimiento promedio de  $5,35 \text{ t.ha}^{-1}$  y una producción anual de 2 451 toneladas de frutas (FAOSTAT, 2011). Estos bajos rendimientos en la producción citrícola se deben, fundamentalmente, al efecto negativo que ejercen los factores climáticos y la alta incidencia de plagas en estos cultivos (Singh y Rajam, 2009).

Cada año las temperaturas altas y el aumento de la frecuencia, magnitud e intensidad de las olas de calor causan considerables pérdidas económicas en diversos cultivos (Long y Orthu, 2010; Saidi *et al.*, 2011). Producto del calentamiento global se estima que el promedio de temperatura puede incrementarse entre  $3\text{-}6^{\circ}\text{C}$  para el año 2100, lo cual causaría serios daños económicos en la producción citrícola, sobre todo en períodos lluviosos, donde se incrementa significativamente la incidencia de plagas. De ahí que la prioridad básica y las inversiones en el sector están dirigidas al fomento de plantaciones de cítricos con especies tolerantes a las principales enfermedades frecuentes de la

región y a elevar la eficiencia industrial de sus producciones (Prévez y Sánchez, 1997 y Ferragut y Ochoa, 2012).

### **2.1.1. El Huanglongbing de los cítricos.**

En el siglo XVIII se describió un problema severo en los cítricos de las provincias centrales de la India que recibió el nombre de muerte regresiva (Capoor, 1963). Se desconocía la causa de este declinamiento.

Posteriormente Reinking (1919) hizo una breve descripción del amarillamiento y un moteado foliar que apareció en el Sur de China. Se supo después que los campesinos de esta área de China conocían la enfermedad y la llamaban “huanglongbing” (HLB) desde finales del siglo 19 (Zhao, 1981). Este nombre se había traducido al inglés como “yellow dragon disease” (*enfermedad del dragón amarillo*) (Halbert y Manjunath, 2004a), pero Zhao (1981) le llamó en inglés “yellow shoot disease” (*enfermedad del brote amarillo*), y más recientemente Zhao (2006) confirmó que este es el significado correcto.

El Sur de China se ha considerado históricamente como el área de origen de la forma asiática de la enfermedad, sin embargo, descripciones realizadas anteriormente sobre la muerte regresiva aparecida en la India indican que dicha enfermedad estuvo presente allí anteriormente. Capoor (1963) atribuyó la muerte regresiva al *virus de la tristeza de los cítricos* tras realizar algunos estudios de indexing biológico, pero Raychaudhuri *et al.* (1969) y Raychaudhuri *et al.* (1974) demostraron después que el HLB era un componente fundamental del problema.

Husain y Nath (1927) describieron un declinamiento y muerte de los cítricos en Punjab que atribuyeron a daños ocasionados por psílidos al alimentarse de la planta, sin embargo, probablemente se debió al HLB, especialmente por su descripción de “fruta insípida”, este pudiera ser el primer reporte de un insecto asociado con el problema. Ahora parece probable que el HLB se haya establecido en la India antes de diseminarse a China.

Beattie *et al.* (2006) dieron a conocer recientemente su hipótesis de que la enfermedad realmente pudo haberse originado en África, posiblemente en un hospedante asintomático como *Verpris lanceolata*. Pudo haberse transmitido por un insecto a los cítricos en un asentamiento europeo de la costa oriental de África, y

de allí, haberse trasladado al subcontinente en plantas o material de propagación infectado hace 300 o 500 años; y posteriormente a China.

Esto pudiera explicar por qué el HLB no se reportó en China con anterioridad, a pesar de que los cítricos se cultivaron allí durante miles de años (Zhang, 1981). Otro asunto a considerar en este sentido es que un declinamiento similar al del HLB apareció en escritos de la India sólo en el siglo 18 (Husain y Nath, 1927).

Desde los años 20, se describen otras nuevas enfermedades de los cítricos en numerosos países de Asia, todas con síntomas similares o idénticos a los del HLB. En Filipinas, se reportó la enfermedad del moteado amarillo (Lee, 1921), "likubin" en Taiwán alrededor de 1930 y la degeneración del floema en Indonesia durante los años 40.

El HLB se convirtió en un problema serio en China en 1935 (Lin, 1963), mientras que en Filipinas no se reportó como un grave problema hasta 1957 (Martínez y Wallace, 1967). En Indonesia, se destruyeron tres millones de árboles entre 1960 y 1970 (Tirtawidjaja, 1980). En la India el HLB se describió en los años 60 como el causante de pérdidas catastróficas (Fraser *et al.*, 1966).

En 1929, citricultores sudafricanos informaron de un trastorno similar (Van der Merwe y Andersen, 1937; Oberholzer *et al.*, 1965). En el noroeste del país lo llamaron "rama amarilla", mientras que en el Noreste, en un lugar próximo a una estación experimental abierta recientemente en Nelspruit, la llamaron "greening" (enverdecimiento) debido a un mal desarrollo del color amarillo en el fruto (Van der Merwe y Andersen, 1937).

El término "greening" se acuñó por la literatura científica probablemente debido a la proximidad de los científicos de Nelspruit, y no fue hasta 1955 que en el Congreso de la Asociación Internacional de Virólogos de Cítricos (IOCV), celebrado en China, se tomó la decisión de adoptar oficialmente el término original en chino "huanglongbing" (Moreno *et al.*, 1996).

Durante muchos años se consideró que la enfermedad era causada más por deficiencias, toxicidades, e inundación, que por un patógeno. Lin (1956) demostró su transmisibilidad por injerto. Posteriormente se demostró que el HLB era transmitido por injerto (McClellan y Oberholzer, 1965b), así como por el psílido *Trioza erytreae* Del Guercio (McClellan y Oberholzer, 1965a).

Poco después, experimentos realizados en la India y Filipinas demostraron que otra especie de psílido, *Diaphorina citri* Kuwayama, también era vector de la enfermedad en Asia (Capoor *et al.*, 1967; Martínez y Wallace, 1967).

Antes del año 2004, se sabía que el HLB estaba presente en Asia, que había entrado al este de Japón a través del Sur de China, el sureste Asiático y que también se encontraba en el subcontinente Indio hasta Pakistán. También existe en la península Arábiga, pero no en Irán. En África, puede encontrarse en todo el este, la parte central y sur; mientras que en Brasil, América, sólo se detectó el vector *D. citri* (Halbert y Núñez, 2004).

Posteriormente en el 2004, el HLB se detectó en São Paulo, Brasil (Colleta –Filho *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2005a); luego en la Florida en el 2005 (Halbert, 2005) y ya en el 2007 Cuba informó también su presencia. Estos hechos evidencian y justifican las preocupaciones expresadas sobre las amenazas que enfrentan los cítricos.

#### **2.1.1.2. Agente causal y propiedades.**

El descubrimiento de que el HLB era transmisible por injerto llevó a la conclusión de que se trataba de un virus. Sin embargo, el descubrimiento por microscopía electrónica de que los organismos similares a los micoplasmas están asociados con enfermedades “amarillas”, inspiró a otros estudios ultramicroscópicos sobre los cítricos afectados por HLB; se reportó que en los elementos cribosos del floema de plantas cítricas infectadas había Mollicutes (MLOs), no así en las sanas (Lafliche y Bové, 1970).

Al hacer un examen minucioso, estos organismos mostraron tener envolturas más gruesas que los MLOs, lo que indica que eran bacterias auténticas. Hasta hoy, todos los esfuerzos por aislar la bacteria en cultivos puros han sido infructuosos (Garnier y Bové, 1993), pero la combinación de microscopía electrónica y tratamientos enzimáticos mostraron que las paredes celulares eran del tipo Gram negativo (Garnier *et al.*, 1984).

Al utilizar cebadores universales, se obtuvieron ADN ribosomal 16S de dos líneas de la bacteria por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y las comparaciones con secuencias del Banco de Genes mostraron que el organismo causal del HLB pertenece a una subdivisión de la clase Protobacteria, pero que es diferente de los

otros miembros. Hasta el momento se han identificado tres especies de esta bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Ca. L. africanus* (Garnier *et al.*, 2000) y recientemente en Brasil se caracterizó *Ca. L. americanus* (Teixeira *et al.*, 2005b).

### **2.1.1.3. Síntomas.**

#### **2.1.1.3.1. Síntomas foliares.**

Los síntomas del HLB varían y pueden aparentar otros trastornos. Sin embargo, hay algunas características únicas. Un árbol que se infecta en el campo suele desarrollar uno o más brotes amarillos, de aquí el nombre de la enfermedad. Si otras partes del árbol permanecen sanas o asintomáticas, la enfermedad asumirá una apariencia sectorizada. Las hojas afectadas desarrollan un patrón de áreas amarillas y verdes, carentes de límites claros entre estas coloraciones, dando una apariencia “moteada con manchas” (McClellan y Schwarz, 1970).

Este moteado suele ser asimétrico en relación al nervio central de la hoja y constituye el síntoma foliar más característico. Las hojas también pueden manifestarse más gruesas y coriáceas, con nervaduras alargadas y corchosas en su apariencia. En etapas posteriores, pueden aparecer síntomas de deficiencia de zinc, seguidas de la caída de hojas y muerte regresiva de las ramitas finas (Bové, 2006).

#### **2.1.1.3.2. Síntomas y daños en frutos.**

En las plantas enfermas se presenta una excesiva caída de frutos. Los frutos con síntomas son pequeños, torcidos y en la medida que maduran el extremo estilar permanece verde, de aquí el nombre de “greening” (enverdecimiento). En el interior de los frutos pueden observarse semillas abortadas de color oscuro, y los haces vasculares en el eje del fruto son decolorados. La fruta, especialmente las naranjas dulces, también pueden tener una apariencia moteada, y si la corteza se hunde al presionarla con un dedo, surgirá un área hundida color plateada (McClellan y Schwarz, 1970).

La expresión de los síntomas depende de las condiciones climáticas, el huésped infectado y la raza de *Candidatus Liberibacter*. Aunque los síntomas son generalmente los mismos, la forma asiática se considera más severa ya que la muerte regresiva puede ser más fuerte, y eventualmente puede provocar la muerte del árbol. Esta es además, tolerante al calor; mientras que la africana no es capaz



de resistir temperaturas por encima de los 30°C, por lo que sólo se encuentra infectando cítricos plantados en elevaciones por encima de los 700 m, mientras que la asiática sobrevive en áreas calientes y bajas.

La forma americana recién descubierta en Brasil (Teixeira *et al.*, 2005a) es muy similar al tipo asiático en cuanto a expresión de síntomas y severidad; sin embargo, las pruebas hechas en Brasil demuestran que es intolerante al calor, similar al tipo africano.

La enfermedad HLB se considera la más destructiva para los cítricos y se encuentra ampliamente diseminada en el continente americano (Bove, 2006, 2008; Gottwall, 2010). Se asocia a bacterias fastidiosas gramnegativas, restringidas al floema (Garnier y Bové, 1983; Jagoueix *et al.*, 1994), que hasta el momento no han podido ser cultivadas en medios artificiales. Sin embargo, recientemente se ha informado el mantenimiento por tiempo prolongado de la forma asiática en medios enriquecidos con jugos cítricos (Parker *et al.*, 2014).

Aunque los postulados de Koch no han sido cumplimentados, se acepta que la enfermedad es causada por tres especies del género *Liberibacter*, denominadas según la región en donde se han encontrado, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Ca. L. africanus* (CLaf) y *Ca. L. americanus* (CLam) (Garnier *et al.*, 2000; Bové, 2006.). Además, se han informado, dos fitoplasmas en plantas de cítricos asociados con sintomatología similar a la causada por estas bacterias, uno en Brasil y otro en China (Teixeira *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009). El genoma de CLas ha sido secuenciado completamente informándose una talla de aproximadamente 1,22 Mb (Duan *et al.*, 2009).

Los síntomas característicos de la enfermedad son: las hojas con moteado asimétrico, los nervios cloróticos y engrosados, en ocasiones corchosos. En estados avanzados de la enfermedad, las hojas jóvenes afectadas son pequeñas y erectas (“orejas de conejo”), con clorosis intensa o deficiencias nutricionales. Los síntomas varían de acuerdo al tiempo de infección, la etapa de la enfermedad, y pueden ser confundidos con los síntomas que aparecen en otras enfermedades o con carencias de nutrientes como zinc, hierro y manganeso (Bové, 2006).

Schneider *et al.* (1968) y Achor *et al.* (2010) plantean la hipótesis de que producto de los bloqueos del floema se crea una reserva de almidón en niveles

extremadamente altos; este factor es uno de los que contribuye a la textura coriácea de dichas hojas. La acumulación excesiva de almidón provoca la desintegración del sistema de tilacoides de los cloroplastos y causa el síntoma característico de moteado asimétrico en las hojas con HLB. El contenido de almidón en las hojas afectadas con HLB puede llegar a ser 20 veces mayor que el de los árboles sanos (Takushi *et al.*, 2007; Achor *et al.*, 2010).

El HLB se informó en Cuba en el año 2007, asociada a la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Llauger *et al.*, 2008) y transmitida por *Diaphorina citri* Kuwayama, que está presente desde 1999, con poblaciones en todo el país (González *et al.*, 2007). Posteriormente en el período 2007-2008 se comprobó mediante la técnica de diagnóstico de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la presencia de este patógeno en todas las áreas citrícolas comerciales y el sector residencial (Luis *et al.*, 2009).

## **2.2. Bioestimulantes.**

En agricultura, los bioestimulantes se definen como aquellos productos que son capaces de incrementar el desarrollo, producción y/o crecimiento de los vegetales. Otros autores lo definen como fertilizantes líquidos que ejercen funciones fisiológicas al aplicarlos a los cultivos, así como, son moléculas biológicas que actúan potenciando determinadas expresiones metabólicas y/o fisiológicas de las plantas (González *et al.*, 2015).

Según Chiriboga (2011), determinó que la aplicación de bioestimulantes en el cultivo de cebolla (*Allium cepa* L.) influyó significativamente en las variables: altura de planta, diámetro y longitud de los bulbos y rendimiento.

Según Lara (2009), en la evaluación de bioestimulantes foliares en el cultivo de soya (*Glycine max* L.), las variables, número de vainas por planta y peso de 100 semillas, fueron influenciadas positiva y significativamente.

Finalmente, se reporta que para elaborar un programa de nutrición vegetal con base a bioestimulantes hay que establecer pruebas de efectividad de los productos. “Ubicar lotes representativos de prueba y medir las cosechas contra testigos para determinar el costo beneficio que resulte con y sin la utilización de los bioestimulantes. El uso de productos no debe de representar un gasto. Se debe de

recuperar la inversión y debe de existir un beneficio adicional. Una vez comprobado esto puede incorporarlo a sus programas de nutrición (Zarate, 2012).

Diversos autores cubanos han tratado las potencialidades del uso de los bioestimulantes (Martínez *et al.*, 2010; Torrientes, 2010 y Dibut *et al.*, 2011). Sin embargo los resultados de la ciencia y la innovación sobre bioestimulantes no son ampliamente aplicados por los productores agropecuarios en Cuba, ni en la mayor parte de los países subdesarrollados (Martínez y Da, 2012).

Esta situación impulsó que se creara en Cuba en los años 90 el Programa Gubernamental de Biofertilizantes, Bioplaguicidas y Bioestimulantes, en función de incrementar la investigación, producción y disponibilidad de estos productos al servicio de una agricultura con bases sostenibles, a través de las capacidades acumuladas en el país desde el surgimiento y desarrollo de la red de producción biofertilizantes y bioestimuladores (Dibut *et al.*, 2011).

Además del efecto biocontrolador de patógenos, se ha comprobado que la inoculación de *T. harzianum* aporta otros beneficios a las plantas; a través de la descomposición de materia orgánica, libera nutrientes en formas disponibles para la planta (Howell, 2003 y Godes, 2007). Presenta actividad solubilizadora de fosfatos (Vera *et al.*, 2002; Valencia *et al.*, 2007 y Valero, 2007), por lo cual se utiliza frecuentemente como un organismo biofertilizante en diferentes productos comerciales (Moreno *et al.*, 2007). Promueve el crecimiento y desarrollo de los cultivos produciendo metabolitos que estimulan los procesos de desarrollo vegetal (Sutton y Peng, 1993). Tiene la capacidad de multiplicarse en el suelo y colonizar las raíces de las plantas liberando factores de crecimiento (auxinas, giberelinas y citoquininas) que estimulan la germinación y el desarrollo de las plantas. Produce sustancias que actúan como catalizadores o aceleradoras de los tejidos meristemáticos primarios en las partes jóvenes de la planta, acelerando su reproducción celular. Estas permiten que las plantas se desarrollen más rápido en comparación con plantas que no han sido tratadas con dicho microorganismo. También ha sido reportado como promotor del crecimiento vegetal en cultivos de berenjena, arveja, frijol, café, tomate, pimientos papa, vid y especies forestales, entre otros (Valencia *et al.*, 2007).

### **2.2.1. Acción de los bioestimulantes.**

En los últimos años se han incrementado las investigaciones y estudios básicos, a fin de esclarecer el papel biológico de los bioestimulantes en determinadas especies vegetales, así como su relación con el crecimiento y desarrollo de plantas, y su empleo para mejorar la calidad de diferentes procesos (González *et al.*, 2015)

La respuesta a las prácticas de aplicación exógena de los bioestimulantes, está en correspondencia con la influencia de diversos factores, entre ellos, la disponibilidad a nivel intracelular en forma libre o conjugada (Rampey *et al.*, 2004).

Los reguladores del crecimiento vegetal actúan a muy bajas concentraciones en los procesos fisiológicos de las plantas, y cuando no se aplican los niveles requeridos, se pueden inducir alteraciones fisiológicas, que a su vez, pueden causar cambios morfológicos de significación (Shirani *et al.*, 2009).

La disponibilidad de auxinas en los tejidos vegetales puede regularse a través de su tasa de síntesis, la velocidad de transporte entre órganos y los diferentes mecanismos de desactivación, dentro de ellos, la conjugación con otras moléculas como azúcares o aminoácidos (Marques *et al.*, 2001).

Algunos estudios evidencian la presencia de conjugados auxínicos, detectados en semillas y plántulas como tal (Staswick *et al.*, 2005) siendo estos conjugados reversibles, a diferencia de la degradación que sí constituye un proceso irreversible. Estos aspectos corroboran la relación entre el metabolismo y el mecanismo de acción hormonal en plantas, implicado directamente en todas las fases de desarrollo (Taiz y Zeiger, 2006).

Diversas investigaciones demuestran la producción de sustancias con efecto regulador del crecimiento vegetal por parte de bacterias y su impacto en diferentes procesos asociados al desarrollo y crecimiento de plantas (Compant *et al.*, 2010; Adesemoye y Kloepper, 2009; Hernández *et al.*, 2010 y Pedraza *et al.*, 2010).

En este sentido, la necesidad de desarrollar estudios que faciliten la selección y el empleo de las dosis adecuadas de estos productos, son los objetivos que se persiguen en cuanto a procesos a inducir y al cultivo en cuestión, ya que son repuestas que en gran medida están en correspondencia con la especie y el estado fisiológico de la planta (González *et al.*, 2015).

En este sentido, al emplear el bioestimulante *Azotobacter chroococcum*, en posturas de la especie *Coffea arabica* L., se obtuvo mejor comportamiento al realizar la aplicación en el momento del trasplante y en el primer par de hojas (Bustamante *et al.*, 2010).

Asimismo, al emplear un biopreparado de origen bacteriano a partir de *Burkholderia cepacia* Palleroni y Holme, durante las fases de crecimiento y desarrollo de plántulas de cafeto de *Coffea canephora* P. cv. 'Robusta', se obtuvieron resultados favorables para los indicadores número de pares de hojas, altura de la planta y masa seca (González *et al.*, 2011). De igual modo, han sido informadas respuestas positivas en diferentes cultivos como arroz (*Oryza sativa*) y maíz (*Zea mays*) al emplear bioproductos obtenidos a partir de otras especies de bacterias estimulantes del crecimiento vegetal (Hernández *et al.*, 2010 y Pedraza *et al.*, 2010).

En este sentido, estudios precedentes corroboran las potencialidades de diversos géneros bacterianos (Pedraza *et al.*, 2010 y Bustamante *et al.*, 2010), así como efectos beneficiosos del tratamiento con biopreparados obtenidos a partir de los mismos (Hernández *et al.*, 2010 y González *et al.*, 2011), en diferentes estados físicos y fisiológicos de los microorganismos; y utilizando diversas formas de aplicación sobre índices morfofisiológicos de plántulas de cafeto (Adriano *et al.*, 2011; Bustamante *et al.*, 2010 y González *et al.*, 2011), apreciándose mayor crecimiento y porcentaje de supervivencia en las plantas tratadas. Dichos efectos se atribuyen al aporte de sustancias bioestimuladoras del crecimiento, tales como auxinas, citoquininas, giberelinas, aminoácidos y vitaminas, que permiten la aceleración del desarrollo en plantas (Adesemoye y Kloepper, 2009).

Estos comportamientos indican la respuesta favorable del material vegetal a la bioestimulación, y que la efectividad de los tratamientos con biopreparados de origen bacteriano está en dependencia de la concentración de los mismos, la especie, cultivar o genotipo en estudio y el momento y forma de aplicación.

Según Nuñez (1998) los bioestimulantes activan, sin alterar los procesos naturales del metabolismo de las plantas. Su forma de actuar se concreta básicamente en dos formas que son:

a) Aumenta el nivel de prolina, este aumento se produce en el interior de las plantas proporcionándole una mayor defensa frente a los estados de estrés, bien sea hídrico, térmico, por enfermedad o plaga entre otros. Proporcionando grupos tiónicos (-SH) a la planta.

b) La expresión externa de esta potenciación se traduce en un efecto benéfico sobre:

✓ La producción, con incrementos de la cosecha acompañados de una mejor calidad de los frutos y de otros aspectos relacionados con los mismos como coloración, tersura de la piel, uniformidad y aumento de tamaño, menor pérdida de peso pos-cosecha, entre otros.

✓ La vegetación, proporcionando un mejor desarrollo vegetativo y mayor vigor en las brotaciones, así como un aumento de la masa radicular.

### **2.2.2. Tipos de bioestimulantes.**

Los bioestimulantes son moléculas de muy amplia estructura, que pueden estar compuestos en base a hormonas o extractos vegetales metabólicamente activos, como aminoácidos y ácidos orgánicos. Son utilizados principalmente para incrementar el crecimiento y rendimiento en plantas, así como para sobrellevar periodos de estrés (Jorquera y Yuri, 2006).

#### **2.2.2.1. Bioestimulante a base de aminoácidos.**

Los aminoácidos son compuestos orgánicos que contienen un grupo amino [ $\text{NH}_2$ ] y un grupo carboxilo [ $\text{COOH}$ ]. Veinte de estos compuestos son los constituyentes de las proteínas, conocidos como alfa-aminoácidos y son los siguientes: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. Los grupos amino y carboxilo se encuentran unidos al mismo átomo de carbono, y ligado a él se encuentra un grupo variable (R). Es en dichos grupos R donde las moléculas de los 20 alfa-aminoácidos se diferencian unas de otras (Sanabria, 2011).

Los aminoácidos constituyen la base fundamental de cualquier molécula biológica, y son compuestos orgánicos. No puede realizarse proceso biológico alguno, sin que en alguna fase del mismo intervengan los aminoácidos. Son moléculas

orgánicas ricas en Nitrógeno y constituyen las unidades básicas de las proteínas. También son el punto de partida para la síntesis de otros compuestos, tales como vitaminas, nucleótidos y alcaloides (Jorquera y Yuri, 2006).

El uso de aminoácidos en cantidades esenciales es bien conocido como un medio para aumentar la producción y la calidad total de cosechas. Aunque las plantas tienen la capacidad por sí solas de sintetizar todos los aminoácidos que necesita a partir del nitrógeno, carbono, oxígeno e hidrógeno el proceso bioquímico es muy complejo y consumidor de energía; por lo que, la aplicación de aminoácidos permite un ahorro de energía y un mejor desempeño de la planta en etapas críticas donde requiere elementos altamente disponibles para realizar sus funciones (Ángulo, 2009).

#### **2.2.2.2. Bioestimulante a base de algas pardas.**

Algunos de los bioestimulantes de origen natural más usados en nuestra agricultura son derivados de algas marinas. Estos productos basan su éxito en la recuperación de los elementos hormonales y/o nutricionales de los cultivos acuáticos, para ser aplicados en los cultivos agrícolas (Carrera y Canacuán, 2011).

Las algas pardas de grandes dimensiones: especies de los géneros *Laminaria* y *Ascophyllum* en Europa, *Sargassum* en países más cálidos como Filipinas, son las más utilizadas (Medjdoub, 2012).

El efecto de los extractos líquidos de algas, más que como abono (que no lo es, atendiendo a que su aporte mineral es mínimo), consiste principalmente en la estimulación de sistema radicular y en general, en la estimulación del vigor de la planta. Los extractos líquidos de algas son bioestimulantes (estimuladores del desarrollo y del sistema inmunitario y de defensa de la planta). Los principales disparadores (elicitores) de las reacciones metabólicas que generan la bioestimulación de la planta están compuestos por unos tipos especiales de azúcares (oligosacáridos: moléculas compuestas entre 7 y 25 monómeros de azúcar) que se encuentra en las paredes celulares de las algas (García, 2005).

#### **2.2.2.3. Bioestimulante a base de ácidos fúlvicos.**

Los bioestimulantes nutricionales son complejos de abonos foliares especiales de enmiendas de sustancias húmicas (ácidos húmicos y fúlvicos) líquidas, que se

define como un bioestimulante que activa, sin alterar, los procesos naturales del metabolismo de las plantas (Gallardo, 1998).

Los ácidos fúlvicos son fracciones activas solubles en ácidos fuertes. Constituyen una serie de compuestos sólidos o semisólidos, amorfos, de color amarillento y naturaleza coloidal, fácilmente dispersables en agua y no precipitables por los ácidos, susceptibles en cambio de experimentar floculación en determinadas condiciones de pH y concentración de las soluciones de cationes no alcalinos (FOSAC, 2007).

Son de muy rápida asimilación por las plantas debido a sus conformaciones estructurales simples y pequeñas, actuando como bioestimulantes (FOSAC, 2007).

Según FUMEX (2012) entre las principales ventajas de utilizar ácido fúlvico en agricultura se encuentran:

- ✓ Regula el pH de la solución.
- ✓ Favorece el crecimiento de las plantas.
- ✓ Facilita la absorción de nutrientes que, por su naturaleza, son difícilmente absorbidos por las plantas.
- ✓ Sirve como bioestimulante.
- ✓ Estimula la división celular y el crecimiento de las plantas.
- ✓ Aumenta la resistencia de las plantas a la sequía.
- ✓ Hace más eficaz la recuperación de cultivos.
- ✓ Mejora los suelos.
- ✓ Promueve la formación de ácidos nucleicos.

#### **2.2.2.4. Bioestimulantes a base de bacterias.**

La obtención de productos eficientes, a partir de bacterias con propiedades benéficas, representa una alternativa de gran interés (Thirumala *et al.*, 2010; Compant *et al.*, 2010 y Baset *et al.*, 2010), y en especial para el desarrollo de cultivos de importancia económica en el contexto de una agricultura sustentable (Adesemoye y Kloepper, 2009; Hernández *et al.*, 2010 y Lara *et al.*, 2010).



Estos bioproductos contribuyen de manera más efectiva a la supervivencia y crecimiento de los cultivos, pues reducen los efectos negativos del estrés asociado a la nutrición, las relaciones con el agua, la estructura del suelo, el pH, los metales pesados y los patógenos (Kuffner *et al.*, 2008).

Investigaciones recientes apuntan al Bioenraiz®, obtenido a partir de una cepa de *Rhizobium* sp., como nuevo bioproducto regulador del crecimiento vegetal, debido a evidencias científicas que muestran que dada su composición química a base de auxinas, juega un importante papel en la germinación de semillas y posterior desarrollo de las plántulas.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **3.1. Ubicación del experimento.**

El estudio se realizó en la Empresa Agroindustrial Victoria de Girón (ECVG), Jagüey Grande, Matanzas, Cuba, en la UEB 1 en plantas de pomelo 'Marsh' Jibarito (*Citrus paradisi* Macf.) de nueve años de edad injertadas sobre Citrange 'Carrizo' (*Citrus sinensis* L. Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) plantadas a 4m x 6m en el Lote T-25, cuadrante tres, banda C.

Atendiendo a las recomendaciones del proveedor que con dos aplicaciones se lograba un reverdecimiento de la plantación, como ocurrió en varias granjas en la Florida. Se seleccionó una plantación con un avanzado estado de deterioro, escaso follaje, abundantes ramas secas y clorosis generalizada, para comprobar infaliblemente la efectividad del producto.

#### **3.2. Tratamientos y diseño experimental.**

Los tratamientos se distribuyeron en un diseño en bloques al azar con siete réplicas de cinco plantas. En total se evaluaron 35 árboles en cada tratamiento.

Los tratamientos fueron los siguientes:

I. Testigo.

II. Aplicación del producto IHO-BIO.

III. Aplicación del producto IHO-MINERAL.

IV. Testigo relativo (Esquema tecnológico de la EAVG).

Las aspersiones de los productos se realizaron vía foliar en tres momentos: 15 de abril y 16 de mayo y 16 de junio. Aun cuando el representante IHO recomendaba dos aplicaciones.

Las aplicaciones se realizaron con una asperjadora marca Teyme de 2 000 L de capacidad, a una dosis de 4 L.ha<sup>-1</sup> de cada producto comercial y una solución final de 1000 L.ha<sup>-1</sup>.

Se usaron 16 boquillas rojas (abajo), 12 boquillas verdes (arriba) y presión de trabajo de 13 atm, con una velocidad del tractor de 3,5 km/h y cinco minutos por calle.

Al testigo relativo (Esquema Tecnológico de la Empresa) se le realizó una sola aplicación edáfica en abril de 94,5 kg de nitrógeno por hectárea y se utilizó como portador el sulfato de amonio.

### **3.3. Efecto de las aplicaciones foliares de bioestimulantes naturales IHO-MINERAL y IHO-BIO en el desarrollo vegetativo de las plantas.**

#### **3.3.1. Determinación del índice área foliar.**

Se tomó una hoja por cada punto cardinal de cada planta evaluable por tratamiento y se midió el largo y ancho de cada hoja con el empleo de una regla graduada (cm). Se determinó el área foliar con la siguiente fórmula:

$$AF=5,09+0,35*(LH*AH).$$

AF=Área foliar (cm).

LH=Largo de la hoja.

AH=Ancho de la hoja.

#### **3.3.2. Determinación de la longitud de los brotes.**

Se midió la longitud de los brotes (cm) desde la base al ápice con una regla graduada, se seleccionó un brote por cada punto cardinal de cada planta en dos momentos en abril y julio. Se determinó el incremento en el crecimiento de los brotes en una hoja por cada punto cardinal de cada planta evaluable por tratamiento.

### **3.4. Influencia de las aplicaciones foliares de bioestimulantes en la producción.**

Para evaluar la producción la cosecha se realizó de forma individual en las plantas de cada tratamiento, tomando el peso total y el número de frutos.

### **3.5. Efecto de las aplicaciones foliares de bioestimulantes en la calidad de los frutos.**

Para evaluar la calidad de los frutos en el momento de la cosecha se realizó un muestro al azar de 15 frutos por replica, para un total de 75 por tratamiento, los que se analizaron en el laboratorio de la Unidad de Beneficio de la Empresa Agroindustrial "Victoria de Girón". Se determinaron las variables físicas de calidad: masa de los frutos (g), diámetro y altura del fruto (mm) y las variables de calidad interna: contenido de jugo (%), sólidos solubles totales (°Brix), acidez titulable (%) e

índice de madurez (SST/acidez), según los métodos de ensayo (NC 77-11:1981; NC-ISO IDT 2173:2001; NC-ISO IDT 750:2001).

### **3.6. Análisis y programa estadístico empleado.**

Los datos obtenidos se procesaron mediante análisis de varianza de clasificación simple y se establecieron las diferencias entre los tratamientos mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan para un nivel de significación del 5%. Se empleó el paquete estadístico STATISTIC, Versión 6.0.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Efecto de las aplicaciones foliares de bioestimulantes naturales IHO-MINERAL y IHO-BIO en el desarrollo vegetativo de las plantas.

#### 4.1.1. Área foliar en pomelo 'Marsh'.

Al analizar los resultados del efecto de las aplicaciones foliares de los bioestimulantes naturales IHO-MINERAL y IHO-BIO en el desarrollo vegetativo de las plantas (figura 1), se comprobó que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados.

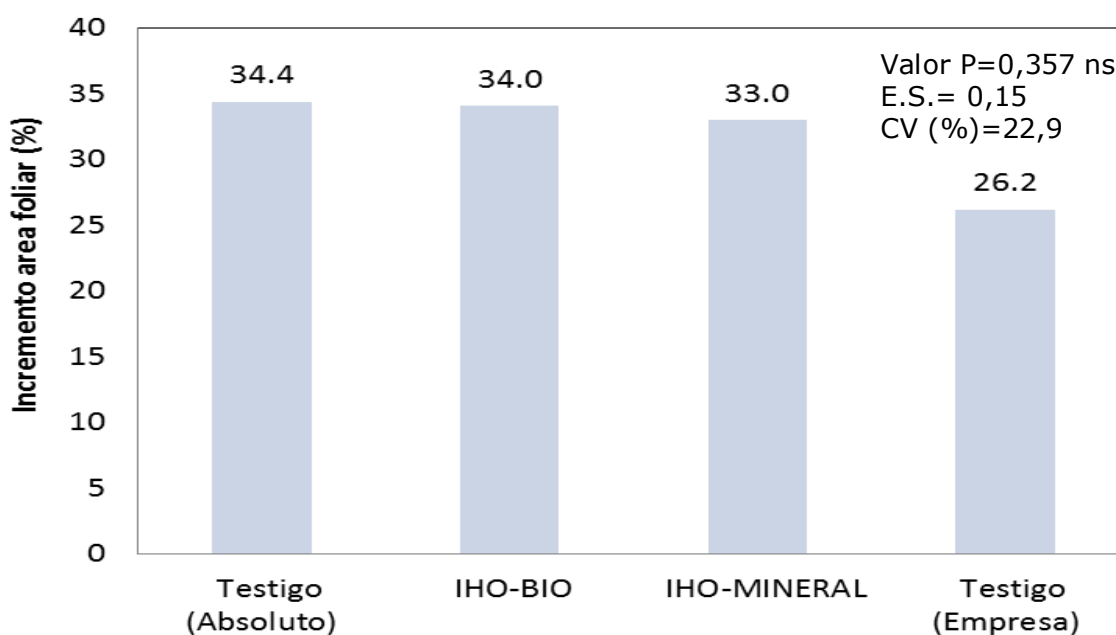


Figura 1. Influencia de los bioestimulantes IHO en el incremento del área foliar en pomelo 'Marsh'.

En este sentido se puede inferir que los productos empleados no ejercieron influencia alguna en el incremento del área foliar, resultados similares encontraron Corbera y Nápoles (2013) en el cultivo de la soya al utilizar el estimulador del crecimiento Pectimorf.

No obstante el proveedor refiere resultados positivos en el crecimiento del volumen de la copa de los árboles, al emplear similares dosis y número de aplicaciones en plantaciones con Greening (HLB) en Indian River, Florida (IHO-Agro, 2015).

En ensayos llevados a cabo por el Instituto de Investigaciones Hortícolas "Lilliana Dimitrova", se encontró con el empleo del IHO-MINERAL en el cultivo del pimiento

un incremento de 28,11% en el crecimiento de las plantas al compararlo con el grupo control. Es necesario señalar que independientemente que en cultivos hortícolas se hayan reportado resultados alentadores, los encontrados después de haber realizado tres aplicaciones de ambos productos en pomelo la respuesta no coincidió con las recomendaciones del proveedor, atendiendo a que las aplicaciones foliares de los bioestimulantes IHO no ejercieron influencia en el desarrollo vegetativo de las plantas.

Asimismo como se muestra en la figura 2 en las condiciones de Jagüey Grande no se observó diferencias en cuanto a mejoramiento del aspecto de la plantación entre tratamientos.





Figura 2. Apariencia de las plantas de pomelo 'Marsh' posterior a tres aplicaciones (a: Testigo absoluto, b: IHO-BIO, c: IHO-MINERAL, d: Testigo Relativo)

Estos resultados no coinciden con los obtenidos por IHO-Agro (2015) en plantaciones con Greening (HLB) en Indian River, Florida, donde se reporta un marcado enverdecimiento y aumento del follaje de la plantación al realizar solo dos aplicaciones de IHO-BIO, atendiendo a que las plantas de todos los tratamientos brotaron manteniendo la clorosis típica de la presencia de un estado avanzado de HLB.

La enfermedad HLB se considera la más destructiva para los cítricos y se encuentra ampliamente diseminada en el continente americano (Bove, 2006, 2008; Gottwall, 2010). Se asocia a bacterias fastidiosas gramnegativas, restringidas al floema (Garnier y Bové, 1983; Jagoueix *et al.*, 1994), que hasta el momento no han podido ser cultivadas en medios artificiales. Sin embargo, se ha informado el mantenimiento por tiempo prolongado de la forma asiática en medios enriquecidos con jugos cítricos (Parker *et al.*, 2014).

Aunque los postulados de Koch no han sido cumplimentados, se acepta que la enfermedad es causada por tres especies del género *Liberibacter*, denominadas según la región en donde se han encontrado, *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas), *Ca. L. africanus* (CLaf) y *Ca. L. americanus* (CLam) (Garnier *et al.*, 2000; Bové, 2006). Además, se han informado, dos fitoplasmas en plantas de cítricos asociados con sintomatología similar a la causada por estas bacterias, uno en Brasil y otro en China (Teixeira *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009). El genoma de CLas ha sido secuenciado completamente informándose una talla de aproximadamente 1,22Mb (Duan *et al.*, 2009).

Los síntomas del HLB varían y pueden aparentar otros trastornos. Sin embargo, hay algunas características únicas. Un árbol que se infecta en el campo suele desarrollar uno o más brotes amarillos, de aquí el nombre de la enfermedad. Si otras partes del árbol permanecen sanas o asintomáticas, la enfermedad asumirá una apariencia sectorizada. Las hojas afectadas desarrollan un patrón de áreas amarillas y verdes, carentes de límites claros entre estas coloraciones, dando una apariencia “moteada con manchas” (McClellan y Schwarz, 1970).

En estados avanzados de la enfermedad, las hojas jóvenes afectadas son pequeñas y erectas (“orejas de conejo”), con clorosis intensa o deficiencias nutricionales. Los síntomas varían de acuerdo al tiempo de infección, la etapa de la enfermedad, y pueden ser confundidos con los síntomas que aparecen en otras enfermedades o con carencias de nutrientes como zinc, hierro y manganeso (Bové, 2006).

Schneider (1968) y Achor *et al.* (2010) plantean la hipótesis de que producto de los bloqueos del floema se crea una reserva de almidón en niveles extremadamente altos; este factor es uno de los que contribuye a la textura coriácea de dichas hojas. La acumulación excesiva de almidón provoca la desintegración del sistema de



tilacoides de los cloroplastos y causa el síntoma característico de moteado asimétrico en las hojas con HLB. El contenido de almidón en las hojas afectadas con HLB puede llegar a ser 20 veces mayor que el de los árboles sanos (Takushi *et al.*, 2007; Achor *et al.*, 2010).

En este sentido, la necesidad de desarrollar estudios que faciliten un mejoramiento del estado clorótico de las plantaciones y favorezcan el mantenimiento de su vida útil, son fundamentales, es por ello que el empleo productos novedosos así como adecuar sus dosis, es una necesidad de la citricultura contemporánea, atendiendo a que son repuestas que en gran medida están en correspondencia con la especie y el estado fisiológico de la planta (González *et al.*, 2015).

#### 4.1.2. Longitud de los brotes en pomelo 'Marsh'.

Al analizar el resultado de las aplicaciones de los bioestimuladores IHO-BIO y IHO-MINERAL en el desarrollo vegetativo de las plantas (figura 3) se observó que no existió diferencias significativas entre los tratamientos dos, tres y cuatro o sea entre los productos IHO aplicados y la tecnología que utiliza tradicionalmente la empresa, pero si con el testigo absoluto.

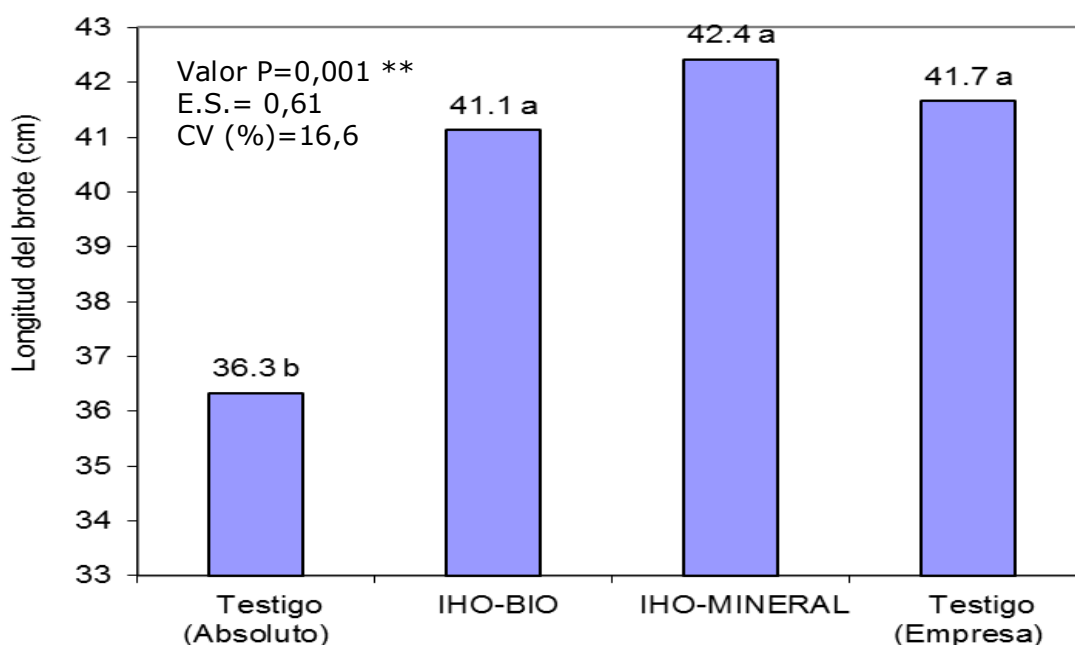


Figura. 3. Influencia de las aplicaciones de los bioestimulantes IHO en la longitud de los brotes en pomelo 'Marsh'.

En este sentido Costales *et al.* (2007) y Benítez *et al.* (2008) informaron efectos del bioestimulador Pectimorf sobre la altura de las plantas en cultivos como el tomate y la palma areca respectivamente.

Así pudiera citarse el uso de *Azotobacter* en clones de *Coffea canephora* P., en los que se obtuvieron resultados favorables en la fase de vivero (Bustamante *et al.*, 2010). En este mismo sentido, al emplear el bioestimulante *Azotobacter chroococcum*, pero en posturas de la especie *Coffea arabica* L., se obtuvo mejor comportamiento al realizar la aplicación en el momento del trasplante y en el primer par de hojas.

Asimismo, al emplear un bioestimulante de origen bacteriano a partir de *Burkholderia cepacia* Palleroni y Holme, durante las fases de crecimiento y desarrollo de plántulas de cafeto de *Coffea canephora* P. cv. 'Robusta', se obtuvieron resultados favorables para los indicadores número de pares de hojas, altura de la planta y masa seca (González *et al.*, 2015).

De igual modo, han sido informadas respuestas positivas en diferentes cultivos como arroz (*Oryza sativa*) y maíz (*Zea mays*) al emplear bioproductos obtenidos a partir de otras especies de bacterias estimulantes del crecimiento vegetal (Pedraza *et al.* 2010).

#### **4.2. Resultados de las aplicaciones foliares de los bioestimulantes IHO en la producción.**

Al analizar en los diferentes tratamientos el efecto de las dosis aplicadas en la producción y los rendimientos estimados por hectárea (figura 4), se observó que la mayor producción se alcanzó en el tratamiento cuatro con 12,33 kg por plantas, con diferencias significativas con el resto de los tratamientos. Mientras que el valor más bajo 7,9 kg por planta se obtuvo en el tratamiento uno (testigo) sin diferencias con los tratamientos que recibieron aplicaciones de los bioestimulantes IHO.

Por lo que se puede suponer que estos bioestimulantes no influyeron en la producción. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Corbera y Nápoles (2013) quienes encontraron en el cultivo de la soya que el bioestimulador vegetal Pectimorf, no ejerció un efecto significativo sobre el número de vainas por planta.

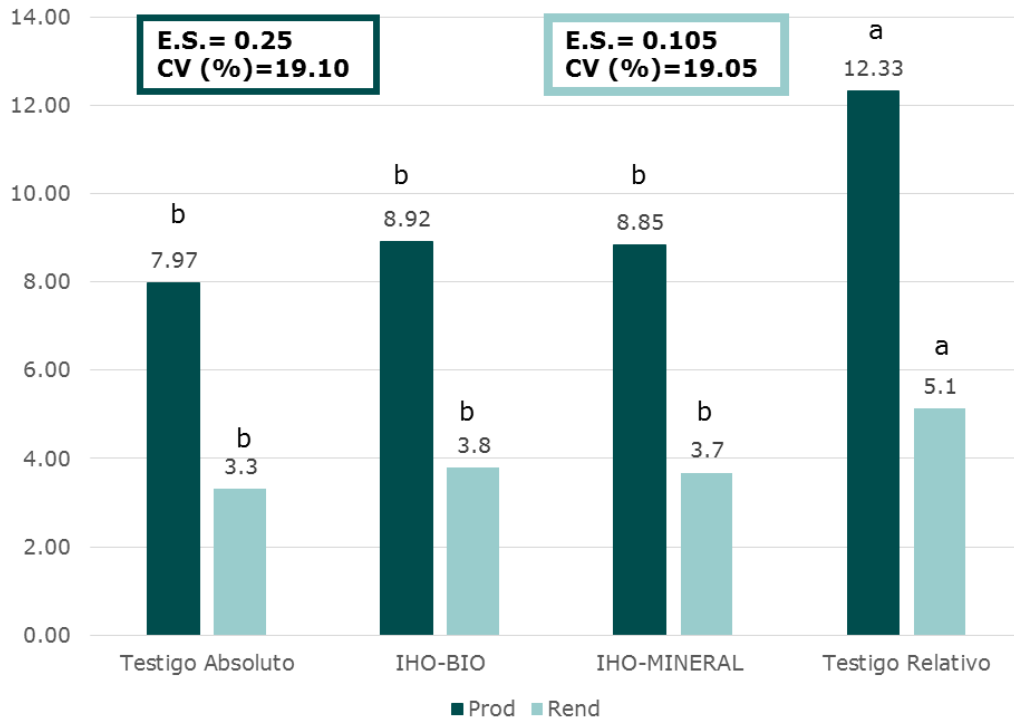


Figura 4: Producción y rendimientos obtenidos por tratamientos.

Asimismo Tapia (1983), encontró que los bioestimulantes Evergreen y Best-k no incrementaron los rendimientos en sandías, lo que contrasta con lo citado por Química Sagal (2000) que indican que los bioestimulantes provocan respuestas favorables en los cultivos, lo que conlleva a un incremento de la producción.

Negrín (2011) en su investigación en injertos de mamey colorado (*Pouteria sapota* Jacq) y tabaco respectivamente, utilizando Biobras-16 (análogo funcional DI-31) proporcionaron resultados favorables en los rendimiento en  $t \cdot ha^{-1}$ , con la utilización de una dosis de  $0,01 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ .

### 4.3. Resultados de las aplicaciones en la calidad de los frutos en pomelo 'Marsh'.

Al analizar el efecto de las aplicaciones de los bioestimuladores IHO-BIO y IHO-MINERAL en la calidad de los frutos (tabla 1) se observó que no existió diferencias significativas entre los tratamientos. Por lo que se puede suponer que estos estimulantes ejercieron influencia en las diferentes variables de calidad analizadas.

Tabla 1. Análisis de calidad de frutos de los diferentes tratamientos.

Tratamiento	Masa (g)	Diámetro (mm)	Altura (mm)	Jugo (%)	Sólidos (Brix)	Acidez (%)	Índice Madurez
<b>Testigo</b>	389,0	95,3	92,3	28,8	7,7	1,93	4,0
<b>IHO-BIO</b>	365,0	92,8	93,1	25,6	7,9	2,08	3,8
<b>IHO-MINERAL</b>	324,7	83,3	80,6	34,9	9,0	1,90	4,8
<b>Empresa</b>	355,4	92,5	90,6	29,1	7,9	2,02	3,9
<b>E.S.</b>	19,61	2,23	2,41	2,09	0,21	0,05	0,15
<b>CV (%)</b>	<b>18,9</b>	<b>8,5</b>	<b>9,4</b>	<b>24,5</b>	<b>8,9</b>	<b>8,2</b>	<b>12,6</b>
<b>Sig.</b>	<b>0,77<sup>ns</sup></b>	<b>0,26<sup>ns</sup></b>	<b>0,24<sup>ns</sup></b>	<b>0,52<sup>ns</sup></b>	<b>0,09<sup>ns</sup></b>	<b>0,54<sup>ns</sup></b>	<b>0,06<sup>ns</sup></b>

Lo mencionado hasta este momento deja en evidencia que la efectividad de un bioestimulante está en dependencia de la composición del mismo así como el origen y calidad de sus componentes.

#### **4.4. Valoración económica de los resultados.**

Las aplicaciones de los bioestimulantes IHO-BIO e IHO-MINERAL no dieron las respuestas recomendadas por el proveedor de IHO-Agro International, si se tiene en cuenta que el costo de ambos productos (tabla 2), se incurrió en un ahorro en USD de \$ 360 158,04 al no tener que importarlos.

En este sentido Zarate (2012) reporta que para elaborar un programa de nutrición vegetal que incluya la aplicación de bioestimulantes hay que establecer pruebas de efectividad de los productos. Ubicar lotes representativos de prueba y medir las cosechas contra testigos para determinar el costo beneficio que resulte con y sin la utilización de los bioestimulantes. El uso de productos no debe de representar un gasto. Se debe de recuperar la inversión y debe de existir un beneficio adicional. Una vez comprobado esto puede incorporarlo a sus programas de nutrición.

Tabla 2. Análisis de los costos de aplicación de los bioestimulantes IHO

Tratamientos	Dosis hectárea	Costo de un litro en USD	Costo de una hectárea	Costo de aplicación en producción
IHO-MINERAL	4 L	\$ 10	\$ 40	\$ 163 708,2
IHO-BIO	4 L	\$ 12	\$ 48	\$ 196 449,84

Atendiendo a estos señalamientos y por los resultados obtenidos fue innecesario incluir estos bioestimulantes en los programas de manejo de la fertilización en cítricos en Jagüey Grande.

No obstante diversos autores cubanos han tratado las potencialidades del uso de los bioestimulantes (Torrientes, 2010 y Dibut *et al.*, 2011) sin embargo los resultados de la ciencia y la innovación sobre bioestimulantes en arboles perennes son inapreciables si se compara con su aplicación en cultivos de ciclos cortos. Es un reto para la investigación y para los fruticultores cubanos.

## **5. CONCLUSIONES.**

1. Las aplicaciones foliares de los bioestimulantes evaluados no brindaron efecto positivos en el desarrollo vegetativo de las plantas.
2. Las aplicaciones foliares de los bioestimulantes mostraron resultados inferiores en la producción y el rendimiento a los obtenidos por la tecnología de la empresa.
3. La valoración económica de los resultados obtenidos permitió un ahorro considerable por la no importación de los bioestimulantes IHO.
4. La aplicación foliar de los bioestimulantes naturales IHO-MINERAL y IHO-BIO no resultó una alternativa viable para incrementar la producción y calidad de los frutos en plantaciones de pomelo 'Marsh'.

## **6. RECOMENDACIONES**

1. Por los resultados obtenidos no incluir el uso de los productos IHO en las tecnologías de manejo de los cítricos en Jagüey Grande.
2. Extender por un mínimo de tres años las pruebas de productos atendiendo a que se evalúan árboles perennes.

## 7. BIBLIOGRAFIA.

1. Achor, D. S.; Etxeberria, E; Wang, N.; Folimonova, S. Y.; Chung, K. R. and Albrigo, L. G. 2010. Sequence of anatomical symptom observations in citrus affected with huanglongbing disease. *J. Plant Pathol.* 9: 56-64.
2. Adesemoye, A. y Kloepper, J. 2009. Plant-microbe sinteractions in enhanced fertilizer use efficiency. *Applied microbiology and biotechnology.* 85 p.
3. Adriano, M.; Jarquín, R.; Ramos, C.; Salvador, M. y Vargas, C. 2011. Biofertilizer of organic coffee in stage of seedlings in Chiapas, México. *Mexicana de Ciencias Agrícolas.* 2(3): 53-62.
4. Angulo, R. F. R. 2009. Evaluación de cuatro bioestimulantes comerciales en el desarrollo de plantas injertadas de cacao (*Theobroma cacao* L.) cultivar nacional. Tesis en opción al título de Ingeniero Agrónomo. Escuela Superior Politecnica de Chimborazo Ecuador.
5. Baset, M.; Shamssudin, Z.; Wahab, Z. y Marcia, M. 2010. Effect of plant growth promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation on growth Ans nitrogen incorporation of tissue-cultured Musa plantlets under nitrogen-free hydroponics conditions. *Australian Journal of Crop Science.* 4(2):85-90.
6. Beattie, G. A. C.; Holford, P.; Mabblerley, D. J.; Haigh, A. M.; Bayer, R. and Broadbent, P. 2006. Aspects and insights of Australia - Asia collaborative research on *Huanglongbing*. In: Proc. of the Intl. Workshop for the Prevention of Citrus Greening Disease in Severely Infected Areas. Intl. Res. Div., Agric. Forestry Fisheries Res. Counc. Secretariat, Ministry of Agric., Forestry and Fisheries, Tokyo, Japan. p. 47 - 64
7. Borroto, N. C. y Borroto, A. 1991. Citricultura Tropical. En: Nutrición. Tomo 1, La Habana, Cuba. p. 181-218.
8. Bové J. M. 2008. Citrus Diseases, Huanglongbing, Text and Image Gallery [en línea]. Disponible en: <http://www.ivia.es/iocv>. [Consulta: junio, 18 2017].
9. Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *J. Plant Pathology.* 88:7-37.
10. Bustamante, C. A.; Rodríguez, M. I. y Pérez, A. 2010. Respuesta de clones de *Coffea canephora* a la aplicación de Azotobacter en fase de vivero. *Café Cacao.* 9(1): 8-13.



11. Capoor, S. P. 1963. Decline of citrus trees in India. Bull. Nat. Inst. Sci. 24: 48 - 64.
12. Capoor, S. P.; Rao, D. G. and Viswanath, S. M. 1967. *Diaphorina citri* Kuway, a vector of the greening disease of citrus in India. Ind. J. Agric. Sci. 37: 572 - 576.
13. Carrera D. E. y Canacuán A. Z. 2011. Efecto de tres bioestimulantes orgánicos y un químico en dos variedades de frijol arbustivo, cargabello y calima rojo (*Phaseolus vulgaris* L.) en coatacachi-imbabura [en línea]. Disponible en: <http://repositorio.utn.edu.ec.pdf>. [Consulta: junio, 18 2017].
14. Chen, J. G.; Cheng, S. H.; Cao, W. and Zhou, X. 2009. Involvement of endogenous plant hormone in the effect of mixes nitrogen source on growth and till ring of wheat. Informações Agronômicas. 81:87-97.
15. Chiriboga, A. 2011. Efectos de aplicación de tres bioestimulantes foliares sobre el rendimiento de la cebolla de bulbo (*Allium cepa* L.) en el cantón Montufar, provincia del Carchi. [en línea]. Disponible en: <http://repositorio.utb.edu.ec:8080/handle/123456789/105>. [Consulta: octubre, 11 2017].
16. Colleta - Filho, H. D.; Targon, M. L. P. N.; Takita, M. A.; De Negri, J. D.; Amaral, A. M.; Müller, G. W.; Pompeu Júnior, J.; Carvalho, S. A. and Machado, M. A. 2004. Detecção do agente causal do greening do citros (*Candidatus Liberibacter asiaticus*) no estado de São Paulo. Summa Phytopathol. 30: 510.
17. Compant, E.; Climent, C. y Sessitsch, A. 2010. Plant growth promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. Soil Biology and Biochemistry. 42(5):669-678.
18. Cueto, R. 2009. Hacia una nueva citricultura en Cuba. Jornada de la Citricultura. Conferencia. Empresa de Cítricos Ceiba.
19. Del Amor, F. 2001. Fertirrigación óptima en cítricos [en línea]. Disponible en: <http://par.cebascsic.es/publi/160500.html>. [Consulta: noviembre, 21 2017].
20. Dibut Álvarez, B.; Hernández, G.; López, M.; Martínez, A.; Bach, T.; Rivera, R.; Hernández, A.; Fernández, F.; Medina, N. y Herrera, R. 2011. Surgimiento y desarrollo en Cuba de la red de producción de biofertilizantes y bioestimuladores. Agrotecnia de Cuba. 35(1): 61-72.

21. Duan, Y. P.; Zhou, J. I.; Hall, D. G.; Li, W. B.; Doddapaneni, H.; Lin, H.; Liu, L.; Vahling, C. M.; Gabriel, D. W.; Williams, K. P.; Dickerman, A. and Gottwald, T. 2009. Complete genome sequence of Citrus huanglongbing bacterium, *Candidatus Liberibacter asiaticus* obtained through metagenomics. *Molecular Plant Microbe Interactions* 22: 1011-1120.
22. FAO. 2003a. Proyecciones de la producción y consumos mundiales de cítricos en el año 2010. Comité de problemas de productos básicos. 13ª Reunión Grupo Intergubernamental sobre Frutos Cítricos. Enero, CCP: CI 03/2. 9 p.
23. FAO. 2003b. Industria Citrícola de Cuba: Crecimiento y perspectivas de mercado. Comité de Problemas de Productos Básicos. 13ª Reunión Grupo Intergubernamental sobre Frutos Cítricos. Mayo, CCP: CI 03/9. 9 p.
24. FAOSTAT. 2011. Datos provisionales 2011 de producción [en línea]. Disponible en: [faostat.fao.org/faostat](http://faostat.fao.org/faostat). [Consulta: septiembre, 24 2017].
25. Ferragut F, N. D. y Ochoa R. 2012. New mite invasions in citrus in the early years of the 21st century. *US National Library of Medicine National Institutes of Health*. 59 (1/2):145.
26. Fraser, L. R.; Singh, D.; Capoor, S. P. and Nariani, T. K. 1966. Greening virus, the likely cause of citrus dieback in India. *Plant Prot. Bull.* 14: 127 - 130.
27. FUMEX. 2012. Bioestimulantes [en línea]. Disponible en: <http://www.fumex.cl/ecobioestimulantes.html>. [Consulta: septiembre, 24 2017].
28. García R. G. 2005. Efectos de un multiextracto de algas y cianobacterias sobre la producción y calidad de tomate ecológico e integrado. [en línea]. Disponible en: <http://www.horticom.com/pd/imagenes/59/039/59039.html>. [Consulta: enero, 20 2018].
29. Garnier M. and Bove, J. M. 1983. Transmission of the organism associated with *Citrus* greening disease from sweet orange to periwinkle by dodder. *Phytopathology* 73:1358-1363.
30. Garnier, M. and Bové, J. M. 1993. Citrus greening disease and the greening bacterium. In: Proc. of the 12th Conf. Intl. Organ. Citrus Virologists. P. Moreno; J. V. da Graça and L. W. Timmer, eds. IOCV, Riverside, CA. p. 212 - 219
31. Garnier, M.; Danel, N. and Bové, J. M. 1984. Etiology of citrus greening disease. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 135 A: 169 - 179.
32. Garnier, M.; Jagoueix-Eveillard, S.; Cronje, P.; Le Reoux, H.; Bové, J. M. 2000. Genomic characterization of a liberibacter present in an ornamental

- rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in Western Cape Province of South Africa. Proposal of *Candidatus Liberibacter africanus* subsp. *capensis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 50: 2119-2125.
33. Godes, A. 2007. Perspectivas de los inoculantes fúngicos en Argentina. En: Izaguirre-Mayoral, M.L., C. Labandera y J. Sanjuán (eds.). *Biofertilizantes en Iberoamérica: una visión técnica, científica y empresarial*. Imprenta Denad Internacional, Montevideo. p. 11-14.
  34. González, C.; Gómez, M.; Fernández, M.; Hernández, D.; Tapia, J. L., Batista, L. 2007. *Diaphorina citri* Kuw. (Hemiptera: Psyllidae), behavior and natural enemies in Cuban citriculture. Program and Abstracts of the XVII IOCV, Adana, Turkey: 180 p.
  35. González, M. E.; Castilla, Y. y Hernández, A. 2011. Obtención de suspensiones celulares y embriones somáticos de caféto (*Coffea canephora* P.), con el empleo de metabolitos bacterianos. *Revista Colombiana de Biotecnología.* 13(1):123-131.
  36. González, M.; Rosales, P.; Castilla, Y.; Lacerra, J. A. y Ferrer, M. 2015. Efecto del Bioenraiz® como estimulante de la germinación y el desarrollo de plántulas de caféto (*Coffea arabica* L.) *Cultivos tropicales.* 36(1):73-79.
  37. Gottwald, T. R. 2010. Current epidemiological understanding of *Citrus huanglongbing*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 48:119-139.
  38. Halbert, S. 2005. The discovery of Huanglongbing in Florida. Page 50 in: *Proc. of the 2nd Intl. Citrus Canker and Huanglongbing Worksh.*, Orlando, FL.
  39. Halbert, S. E. and Manjunath, K. L. 2004a. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease in citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. *Fla. Entomol.* 87: 330 - 354.
  40. Halbert, S. E. and Nuñez, C. A. 2004. Distribution of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Sternorrhyncha: Psyllidae) in the Caribbean basin. *Fla. Entomol.* 87: 401 - 402.
  41. Hernández, E. 2015. Evaluación de los bioestimilantes IHO en cultivos Hortícolas. *Certifico de Registro. Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova"*. 3p.
  42. Hernández-Rodríguez, A.; Heydrich-Pérez, M.; Diallo, B.; El Jaziri, M. and Vandeputte, O. 2010. Cell-free culture medium of *Burkholderia cepacia* improves

- seed germination and seedling growth in maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*). *Plant Growth Regul.* 60(3):191-197.
43. Hossu, I. 2015. Efectividad de IHO-BIO e IHO MINERAL, en granjas de Indian River Florida [en línea]. Disponible en: <http://www.ihoagrointernational.com>. [Consulta: noviembre, 7 2017].
  44. Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Dis.* 87: 4-10.
  45. Husain, M. A. and Nath, D. 1927. The citrus psylla (*Diaphorina citri* Kuw.) [Psyllidae: Homoptera]. *Mem. Dept. Agric. India, Entomol. Ser.* 10: 1 - 27.
  46. IIFT (Instituto de Investigaciones en Fruticultura). 1999. Principios básicos de la citricultura tropical, Ministerio de la Agricultura. La Habana. p. 47-48.
  47. Jorquera, Y. y Yuri, J. A. 2006. Bioestimulantes. Centro de Pomáceas de la Universidad de Talca. [en línea]. Disponible en: [http://pomaceas.otalca.cl/html/Docs/pdf/2006\\_06\\_06.pdf](http://pomaceas.otalca.cl/html/Docs/pdf/2006_06_06.pdf). [Consulta: noviembre, 7 2017].
  48. Kuffner, M.; Puschenreiter, M.; Wiesshammer, G.; Gorfer, M. y Sessitsch, A. 2008. Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant Soil.* (304):35-44.
  49. Laflèche, D. and Bové, J. M. 1970. Structures de type mycoplasme dans les feuilles d'orangers atteints de la maladie du greening. *C. R. Acad. Sci. Ser.* 270: 455 - 465.
  50. Lara L., S. E. 2009. Evaluación de varios bioestimulantes foliares en la producción del cultivo de soya (*Glycine max* L.), en la zona de Babahoyo Provincia de Los Ríos. [en línea]. Disponible en: <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/6573/1/D-39141.pdf> [Consulta: noviembre, 22 2017].
  51. Lara, C.; García, T. y Oviedo, L. 2010. Using a solid waste culture medium for growing a native strain having biofertiliser potential. *Colombiana de Biotecnología.* 12(1):103-112.
  52. Lee, H. A. 1921. The relation of stocks to mottled leaf of citrus leaves. *Phil. J. Sci.* 18: 85 - 95.
  53. Lin, K. H. 1956. Observations on yellow shoot on citrus. Etiological studies of yellow shoot of citrus. *Acta Phytopathol. Sin.* 2: 237 - 242.

54. Lin, C. K. 1963. Notes on citrus yellow shoot disease. *Acta Phytophylact.* Sin. 2: 243 - 251.
55. Llauger, R., Luis, M., Collazo, C., Peña I., González, C., Batista, L., Teixeira, D., Martins, E., Perdomo, A., Casín, J. C., Pérez, J. L., Cueto, J. R. and Bové, J. M. 2008. Current situation of citrus huanglongbing in Cuba. En: Proceedings of the International Research Conference on huanglongbing. p. 97-100.
56. Long, S. P. y Orthu, D. R. 2010. More than taking the heat: crops and global change. *Current Opinion Plant Biol.* 13(3):240–247.
57. Luis, M.; Collazo, C.; Llauger, R.; Blanco, E.; Peña, I.; López, D.; González, C.; Casín, J. C.; Batista, L.; Kitajima, E.; Tanaka, F. A. O.; Salaroli, R. B.; Teixeira, D. C.; Martins, E. C. and Bové, J. M. 2009. Occurrence of citrus huanglongbing in Cuba and association of the disease with *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *J. Plant Pathol.* 91: 709-712.
58. Marqués, L.; Pascual, M.; Rezende, A.; Barreto, A. y Cavalcante-Alvres, J. 2001. Cultura *in vitro* de embriões de *Coffea arabica*: Influência de NAA e BAP. *Ciênc. Agrotec.* 25(5):1063-1070.
59. Martínez, A. L. and Wallace, J. M. 1967. Citrus leaf – mottle - yellow disease in the Philippines and transmission of the causal virus by a psyllid, *Diaphorina citri*. *Plant Dis. Rep.* 51: 692 - 695.
60. Martínez-Viera, R. y Dá, B. 2012. Biofertilizantes bacterianos. La Habana: Científico-Técnica.
61. Martínez-Viera, R.; Dibut, B. y Ríos, Y. 2010. Efecto de la integración de aplicaciones agrícolas de biofertilizantes y fertilizantes minerales sobre las relaciones suelo–planta. *Cultivos Tropicales.* 31(3):27-31.
62. McClean, A. P. D. and Oberholzer, P. C. J. 1965a. Citrus psylla, a vector of greening disease of sweet orange. *S. Afr. J. Agric. Sci.* 8: 297 - 298.
63. McClean, A. P. D. and Oberholzer, P. C. J. 1965b. Greening disease of sweet orange: Evidence that it is caused by a transmissible virus. *S. Afr. J. Agric. Sci.* 8: 253 - 276.
64. McClean, A. P. D. and Schwarz, R. E. 1970. Greening or blotchy - mottle disease of citrus. *Phytophylactica* 2: 177 - 194.
65. Medjdoub, R. 2012. Las algas marinas y la agricultura [en línea]. Disponible en: <http://www.terraia.com/articulo.php?recordID=5806>. [Consulta: noviembre, 22 2017].

66. Moreno, P.; da Graça, J. V. and Yokomi, R. K. 1996. Preface. Pages 5 - 6 in: Proc. of the 13th Conf. Intl. Organ. Citrus Virol. P. Moreno; J. V. da Graça and R. K. Yokomi, eds. IOCV, Riverside, CA.
67. Moreno, P.; Piquer, J.; Pina, J. A.; Juarez, J.; Cambra, M. 2007. Spread of citrus tristeza virus in a heavily infested citrus area in Spain. In: L. W. Timmer; S. M. Garnsey; L. Navarro, eds. Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, Riverside, USA: International Organization of Citrus Virologists. p. 71 - 76.
68. NC 77-11. Métodos de Ensayo, Frutos y Vegetales Naturales. Vig. 1981.
69. NC-ISO 2173. Productos de Frutas y Vegetales, Determinación del contenido de sólidos solubles. Código refractométrico. (ISO 2173:1978. IDT). Vig. 2001.
70. NC-ISO 750. Productos de Frutas y Vegetales. Determinación de la acidez valorable. (ISO 750:1998. IDT). Vig. 2001.
71. Oberholzer, P. C. J.; Von Standen, D. F. A. and Basson, W. J. 1965. Greening disease of sweet orange in South Africa. In: Proc. of the 3rd Conf. Intl. Organ. Citrus Virol. W. C. Price, ed. Univ. Florida Press, Gainesville, FL. p. 213 - 219
72. Parker, J. K.; Wisotsky, S. R.; Johnson, E. G.; Hijaz, F. M.; Killiny, N.; Hilf, M. E and De la Fuente, L. 2014. Viability of *Candidatus Liberibacter asiaticus* prolonged by addition of juice to culture medium. Phytopathology. 104: 15-26.
73. Pedraza, R.; Teixeira, O.; Fernández, K.; Scavino, A.; García de Salamone, I.; Baca, B. E.; Azcón, R.; Baldani, O. y Bonilla, R. 2010. Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 11(2): 155-164.
74. Prévez, L. y Sánchez, M. 1997. Manual de producción más limpia para el sector industrial cítrico. Programa de producción más limpia de la Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (ONUDI). p. 2-16.
75. Rampey, R.; Leclere, S.; Kowalczyk, M.; Ljung, K.; Sandberg, G. and Bartel, B. 2004. A family of auxin-conjugate hydrolases that contributes to free indole-3 acetic acid levels during *Arabidopsis* germination. Plant Physiology. (135):978-988.
76. Raychaudhuri, S. P.; Nariani, T. K. and Lele, V. C. 1969. Citrus die-back problem in India. Proc. of the 1st Intl. Citrus Symp. 3: 1433 - 1437.

77. Raychaudhuri, S. P.; Nariani, T. K.; Ghosh, S. K.; Viswanath, S. M. and Kumar, D. 1974. Recent studies on citrus greening in India. In: Proc. of the 6th Conf. Intl. Organ. Citrus Virol. L. G. Weathers and M. Cohen, eds. Univ. California, Div. Agric. Sci. p. 53 - 57
78. Reinking, O. A. 1919. Diseases of economic plants in southern China. Phil. Agric. 8: 109 - 135.
79. Rodríguez, A. 1996. Comportamiento de los contenidos de potasio en suelos de la ECVG de Jagüey Grande. Ponencia Presentada en el XII Forum de Ciencia y Técnica. Estación Experimental de Cítricos de Jagüey Grande "Félix Duque Guelmes". IICT. Cuba.
80. Saidi, Y.; Finka, A. y Goloubinoff, P. 2011. Heat perception and signalling in plants: a tortuous path to thermotolerance Minireview. New Phytologist, 190(3):556–565.
81. Sanabria, H. 2011. Beneficio de aminoácidos ante situaciones de estrés del cultivo. [en línea]. Disponible en: <http://www.hortalizas.com/articulo/26092/beneficios-de-aminoacidos-antesituaciones-de-estres-del-cultivo>. [Consulta: noviembre, 22 2017].
82. Schneider, H. 1968. Anatomy of greening-disease sweet orange shoots. Phytopathology 58:1155-1160.
83. Shirani, S.; Mahdavi, F. y Maziah, M. M. 2009. Morphological abnormality among regenerated shoots of banana and plantain (*Musa* spp.) after in vitro multiplication with TDZ and BAP from excised shoot tips. African Journal of Biotechnology. 8(21): 5755-5757.
84. Singh, S. y Rajam M. V. 2009. Citrus biotechnology: Achievements, limitations and future directions. Physiol. Mol. Biol. Plants. 15(1): 3-23.
85. Staswick, P.; Serban, B.; Rowe, M.; Tiryaki, I.; Maldonado, M.; Suza, W. 2005. Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3 acetic acid. Plant Cel. (17):616-627.
86. Taiz, L. y Zeiger, E. 2006. Auxin: The growth hormone. En: Associates, S. (ed). Plant Physiology. Sinauer Associates. Sunderland, M. A. p. 424-460.
87. Takushi, T.; T. Toyozato; S. Kawano; S. Taba; A. Ooshiro; M. Numazawa; M. Tokeshi. 2007. Starch method for simple, rapid diagnosis of citrus huanglungbing using iodine to detect high accumulatuion of starch in citrus leaves. Ann Phytopathol Soc. 73: 3-8.

88. Teixeira, D. C.; Ayres, A. J.; Kitajima, E. W.; Tanaka, F. A. O.; Danet, J. L.; Jagoueix - Eveillard, S.; Saillard, C. and Bové, J. M. 2005a. First report of a *Huanglongbing* - like disease of citrus in São Paulo State, Brazil, and association of a new liberibacter species, "*Candidatus Liberibacter americanus*", with the disease. *Plant Dis.* 89: 107.
89. Teixeira, D. C.; Wulff, N. A.; Martins, E. C.; Kitajima, E. W.; Bassanezi, R.; Ayres, A. J.; Saillard, C. and Bové, J. M. 2008. A Phytoplasma closely related to the Pigeon Pea Witches'-Broom phytoplasma (16Sr IX) is associated with Citrus huanglongbing symptoms in the state of São Paulo, Brazil. *Phytopathol.* 98 (9): 977-984.
90. Teixeira, D. C.; Saillard, C.; Jagoueix - Eveillard, S.; Danet, J. L.; Ayres, A. J. and Bové, J. M. 2005b. "*Candidatus Liberibacter americanus*" associated with citrus *Huanglongbing* (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *Intl. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1857 - 1862.
91. Thirumala, M.; Vishnuvardhan-Reddy, S. y Mahmood, S. K. 2010. Production and characterization of PHB from two novel strains of *Bacillus* spp. isolated from soil and activated sludge. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 37(3):171-178.
92. Tirtawidjaja, S. 1980. Citrus virus research in Indonesia. Pages 129 - 132 in: *Proc. of the 5th Conf. Intl. Organ. Citrus Virol.* W. C. Price, ed. Univ. Florida Press, Gainesville, FL.
93. Torrientes, D. 2010. Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar. Perspectiva de su uso en Cuba. *Cultivos Tropicales.* 31(1):19-26.
94. Valencia, H., Sánchez, J.; Vera, D.; Valero, N. Y Cepeda, M. 2007. Microorganismos solubilizadores de fosfatos y bacterias fijadoras de nitrógeno en páramos y región cálida tropical. Ed. Colombia. p. 169-183.
95. Valero, N. 2007. Determinación del valor fertilizante de microorganismos solubilizadores de fosfato en cultivos de arroz. p.169-183.
96. Van der Merwe, A. J. and Andersen, F. G. 1937. Chromium and manganese toxicity. Is it important in Transvaal citrus greening? *Fmg. S. Afr.* 12: 439 - 440.
97. Vera, D.; Pérez, H. y Valencia, H. 2002. Aislamiento de hongos solubilizadores defosfatos de la rizosfera del arazá (*Eugenia stipitata*, Myrtaceae). *Acta Biol. Colomb.* 7: 33-40



98. Zárate Chávez, J. D. 2012. El uso de bioestimulantes se traduce en cultivos sanos y fuertes [en línea]. Disponible en: <http://www.horticultivos.com/component/content/article/49-front-page/605-el-uso-de-bioestimulantes-se-traduce-en-cultivos-sanos-y-fuertes>. [Consulta: abril, 2 2017].
99. Zhao X. Y. 2006. *Huanglongbing* in China. In: Proc. of the *Huanglongbing* - Greening Intl. Workshop, Ribeirão Preto, Brazil. p. 3
100. Zhao, X. Y. 1981. Citrus yellow shoot (*Huanglungbin*) in China: A review. Proc. of the Intl. Soc. Citricult. 1: 466 - 469.