

Foto 1. Esporas de *Glomus intraradices* (*R. irregulare*) en el interior de una raíz (microscopio).

**Amelia Camprubí y
Cinta Calvet**

Institut de Recerca
i Tecnologies
Agroalimentàries
(IRTA). Protecció
Vegetal Sostenible.
Cabrls, Barcelona

Experiencias de aplicación de micorrizas en viveros de cítricos

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (MA) están presentes de forma natural en la mayoría de los suelos, aunque su presencia puede verse disminuida por la aplicación continuada de pesticidas o un uso excesivo de fertilizantes que pueden limitar su diversidad y su función. Tradicionalmente, los viveros de cítricos se establecen en terrenos vírgenes ya que la desinfección de los suelos para reducir las poblaciones de organismos patógenos puede provocar falta de crecimiento y clorosis férrica en las plantas, síntomas que no siempre se corrigen con la utilización de fertilizantes. Este problema de replante se ha atribuido también a la eliminación de los hongos formadores de micorrizas arbusculares que forman la simbiosis en las raíces de las plantas. En este artículo se recopilan estudios realizados con patrones de cítricos micorrizados y se evalúa la aplicación de micorrizas en el proceso de producción viverística en suelos de replante.

Micorrizas en cítricos

La presencia de micorrizas arbusculares en plantas de cítricos fue descrita por primera vez en 1935 (Reed y Fremont, 1935). Desde entonces se han realizado numerosos estudios y no existen dudas acerca de la importancia que tiene esta simbiosis, establecida entre las raíces de las plantas y determinados hongos del suelo, para el correcto crecimiento de las plantas, muy especialmente en condiciones adversas.

Las raíces de los cítricos son relativamente gruesas, tienen pocas raíces secundarias y pocos pelos radiculares, lo que disminuye notablemente su superficie de contacto con el suelo. Es por ello que los cítricos se benefician de la presencia de micorrizas en sus raíces, ya que favorecen la captación de nutrientes y de agua más allá de la zona de agotamiento que se crea a su alrededor, alcanzando elementos a los que las raíces por sí solas no tendrían acceso. La causa principal de estos efectos es la expansión de las hifas del hongo por la rizosfera. Podríamos decir que la micorriza que forman los hongos arbusculares con las raíces de los cítricos es una extensión de su sistema radicular y del área de absorción gracias a la extensa red de hifas del hongo que conectan las raíces con zonas más alejadas de la rizosfera. De esta manera los principales efectos de las micorrizas en las plantas serían una mejora en la captación de nutrientes minerales, principalmente de los que tienen poca movilidad en el suelo (como P, Zn o Cu), la mejora en la utilización de los recursos hídricos, el incremento de la tolerancia a situaciones de estrés de origen tanto biótico como abiótico y, como consecuencia de todo ello, la mejora del crecimiento y desarrollo de las plantas.

Aislamiento y recuperación de hongos nativos de plantaciones y viveros de cítricos

A pesar del efecto positivo de las micorrizas arbusculares, no todos los hongos formadores de micorrizas son igual de efectivos en promover el crecimiento de los cítricos (Graham y col., 1982) y un mismo

Patrón	Tratamiento	Altura (cm)	Diám. Cuello (cm)	Sup. Foliar (cm ²)	Peso Seco Aéreo (g)	% MA
Amargo	Control	5,52 a	1,55 a	12,58 a	0,14 a	-
	<i>G.mosseae</i>	7,82 b	2,00 b	28,47 a	0,29 ab	24±16
	In. mixto	8,85 b	1,86 ab	51,78 b	0,45 bc	69±19
	<i>G.intraradices</i>	9,11 b	2,05 b	58,65 b	0,54 c	65±16
Cleopatra	Control	6,37 a	1,58 a	10,11 a	0,13 a	-
	<i>G.mosseae</i>	8,47 ab	1,88 ab	21,13 a	0,24 ab	42±13
	In. mixto	12,16 c	2,41 bc	66,54 b	0,63 bc	79±15
	<i>G.intraradices</i>	12,90 c	2,63 c	59,85 b	0,67 c	86±8
Troyer	Control	8,83 a	2,05 a	8,92 a	0,18 a	-
	<i>G.mosseae</i>	10,68 ab	2,45 a	19,64 ab	0,28 ab	37±15
	In. mixto	12,15 b	2,21 a	25,75 b	0,35 b	55±21
	<i>G.intraradices</i>	12,15 b	2,43 a	28,56 b	0,39 b	66±15
Citrumelo	Control	5,86 a	1,59 a	4,65 a	0,10 a	-
	<i>G.mosseae</i>	8,14 b	1,92 b	6,38 a	0,14 a	4±2
	In. mixto	8,94 b	1,86 b	15,16 b	0,22 b	64±14
	<i>G.intraradices</i>	7,96 b	1,79 ab	4,30 a	0,13 a	0

Los datos son media de 10 plantas; Medias en la misma columna, para un mismo patrón, seguidas por la misma letra no son estadísticamente distintas según el Test de Tukey (P<0,05)

Tabla 1. Resultados de crecimiento y de colonización micorrícica obtenidos en plantas micorrizadas con *G. mosseae* (actualmente *F. mosseae*), inoculo mixto y *G. intraradices* (actualmente *R. irregulare*) y controles no micorrizados de los patrones naranjo amargo, mandarino Cleopatra, Citrange Troyer y Citrumelo Swingle tras cinco meses de crecimiento en maceta en condiciones controladas de invernadero.

patrón puede responder de forma distinta a diferentes hongos arbusculares (Camprubi y Calvet, 1996). De igual modo, distintos patrones presentan diferente respuesta a la micorrización con el mismo hongo arbuscular, siendo algunos más dependientes que otros, por lo que no existe una respuesta generalizada. Esto indica la importancia de un adecuado proceso de aislamiento y selección dirigido a escoger el hongo más efectivo.

Con el fin de recuperar los hongos formadores de micorrizas arbusculares nativos de las zonas productoras de cítricos, se realizó un exhaustivo muestreo de suelos de viveros y plantaciones. En concreto se recogieron muestras de suelo y de raíz de treinta viveros y plantaciones de cítricos.

En todas las zonas de muestreo, las raíces de los patrones de cítrico estaban micorrizadas sin ninguna excepción, no observándose diferencias en la colonización debidas a la edad de las plantas. Sin embargo, sí que se encontraron diferencias en el potencial micorrícico de los suelos (Porter, 1979), siendo éste mucho mayor en los suelos de semillero (758 propágulos/100 ml de suelo) que en los de viveros (27 a 73 propágulos/100 ml de suelo) y que en suelos de viejas plantaciones de cítricos (2 a 17 propágulos/100 ml de suelo).

Como resultado, se aislaron y clasificaron morfológicamente nueve especies incluidas en el grupo tradicional de *Glomus*, una especie de *Acaulospora*, una de *Gigaspora* y una de *Scutellospora*. Las morfoespecies más abundantes fueron *Glomus intraradices* (actualmente *Rhizoglomus irregulare*) (Foto 1) y *Glomus mosseae* (actualmente *Funnelformis mosseae*), que se encontraron en prácticamente todas las zonas prospectadas. Teniendo en cuenta que los hongos arbusculares son simbiontes obligados que necesitan una planta huésped para completar su ciclo de vida, estas especies se multiplicaron en asociación con plantas de puerro en condiciones de invernadero para disponer de suficiente cantidad de inóculo para su posterior aplicación.

Dependencia a la micorrización de patrones de cítricos en condiciones controladas

Para la realización de este estudio se utilizaron cuatro patrones de cítrico: Citrange Troyer, mandarino Cleopatra, Citrumelo Swingle y naranjo amargo, y tres aislados de *Glomus* s.l. (*sensu lato*) nativos de suelos de cítricos: *Glomus intraradices* (actualmente *Rhizoglomus irregulare*), *Glomus mosseae* (actualmente *Funneli-*

Dependencia relativa a la micorrización

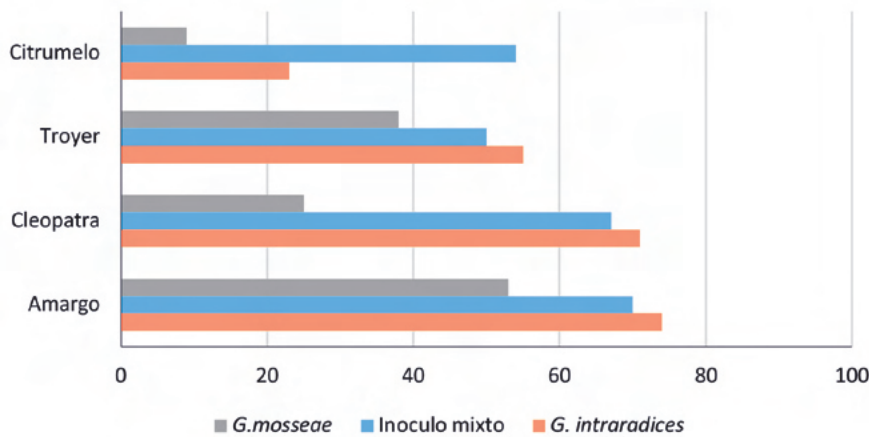


Figura 1. Dependencia relativa a la micorrización con *G. intraradices* (actualmente *R. irregulare*), *G. mosseae* (actualmente *F. mosseae*) e inoculo mixto de los patrones naranja amargo, mandarina Cleopatra, citrange Troyer y Citrumelo Swingle.

Supervivencia

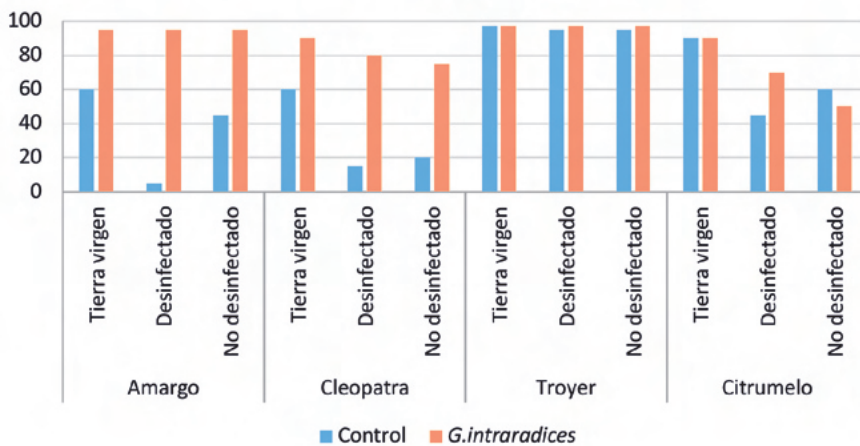


Figura 2. Supervivencia al trasplante a campo, en tierra virgen, en suelo de vivero desinfectado y en suelo de vivero no desinfectado, de los cuatro patrones de cítricos micorrizados (*G. intraradices*) y no micorrizados (Control).

Altura (cm)

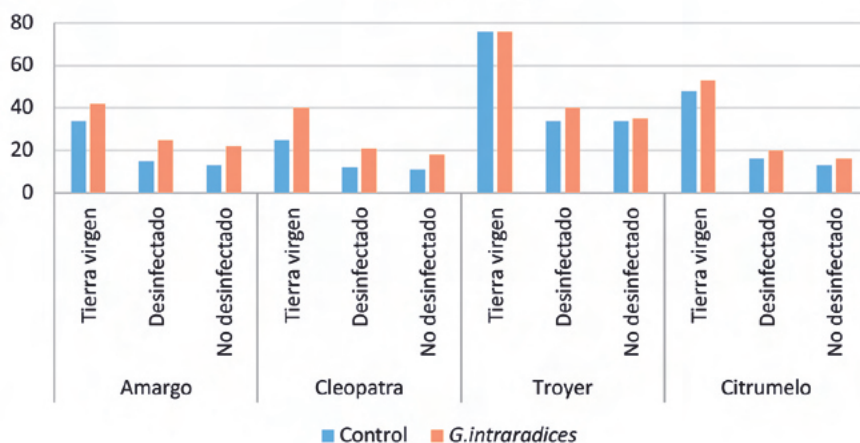


Figura 3. Altura a los 12 meses del trasplante a campo, en tierra virgen, en suelo de vivero desinfectado y en suelo de vivero no desinfectado, de los cuatro patrones de cítricos micorrizados (*G. intraradices*) y no micorrizados (control).

formis mosseae) y un inóculo mixto formado por la mezcla de diferentes especies. Los ensayos incluyeron la evaluación de la capacidad de colonización de los hongos MA y los efectos sobre el desarrollo de los cuatro patrones estudiados.

Los resultados de estos ensayos indicaron que el aislado nativo de la especie de *G. intraradices* (actualmente *R. irregulare*) era el más idóneo para la micorrización temprana de cítricos. Este hongo resultó ser el más efectivo en promover el crecimiento de los patrones de cítrico (Tabla 1).

En cuanto a la dependencia relativa a la micorrización, se encontraron distintas respuestas según el hongo utilizado, presentando mayor dependencia a *G. intraradices*. Según la clasificación de Habte y Manjunath, 1991, se encontró que en general, naranja amargo y mandarina cleopatra manifestaron una alta dependencia (entre 50% y 75%), mientras que Citrange Troyer exhibió una dependencia moderada (entre 25-50%) y Citrumelo Swingle presentó la dependencia más baja (Figura 1). De estos resultados se puede deducir que los patrones que son especies de *Citrus*, como son naranja amargo (*Citrus aurantium*) y mandarina cleopatra (*Citrus reshni*), son más dependientes que los patrones de *Poncirus trifoliata* y sus híbridos, en este caso Citrange Troyer (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sunensis*) y Citrumelo Swingle (*Poncirus trifoliata* x *Citrus paradisi*). Otro resultado importante fue que la dependencia relativa a la micorrización variaba según la especie de hongo formador de MA utilizado. Estos resultados confirman que la elección del hongo formador de micorrizas es fundamental para obtener los mayores beneficios de la micorrización.

Trasplante de plantas micorrizadas a suelos de vivero

Una vez seleccionado el hongo formador de MA se evaluó el efecto de la micorrización controlada sobre el trasplante de patrones de cítrico a suelos de vivero. Plantas de los cuatro patrones procedentes de semilla se micorrizaron en condiciones de invernadero con el hongo seleccionado, *G. intraradices* (actualmente

Feromona para el control
mediante confusión sexual
de Piojo Rojo de California
Aonidiella aurantii (Maskell)

MASSLURE® AoAu

**LA TÉCNICA
BIORRACIONAL
QUE EVOLUCIONA**
Eficaz, respetuosa
con el entorno
y sin residuos

COMERCIAL QUÍMICA MASSÓ, S.A.
Viladomat, 321 5° - 08029 Barcelona
Tel. 93 495 25 00 - Fax 93 495 25 02
masso@cqm.es
www.massogro.com

M **MASSÓ**
AGRO DEPARTMENT

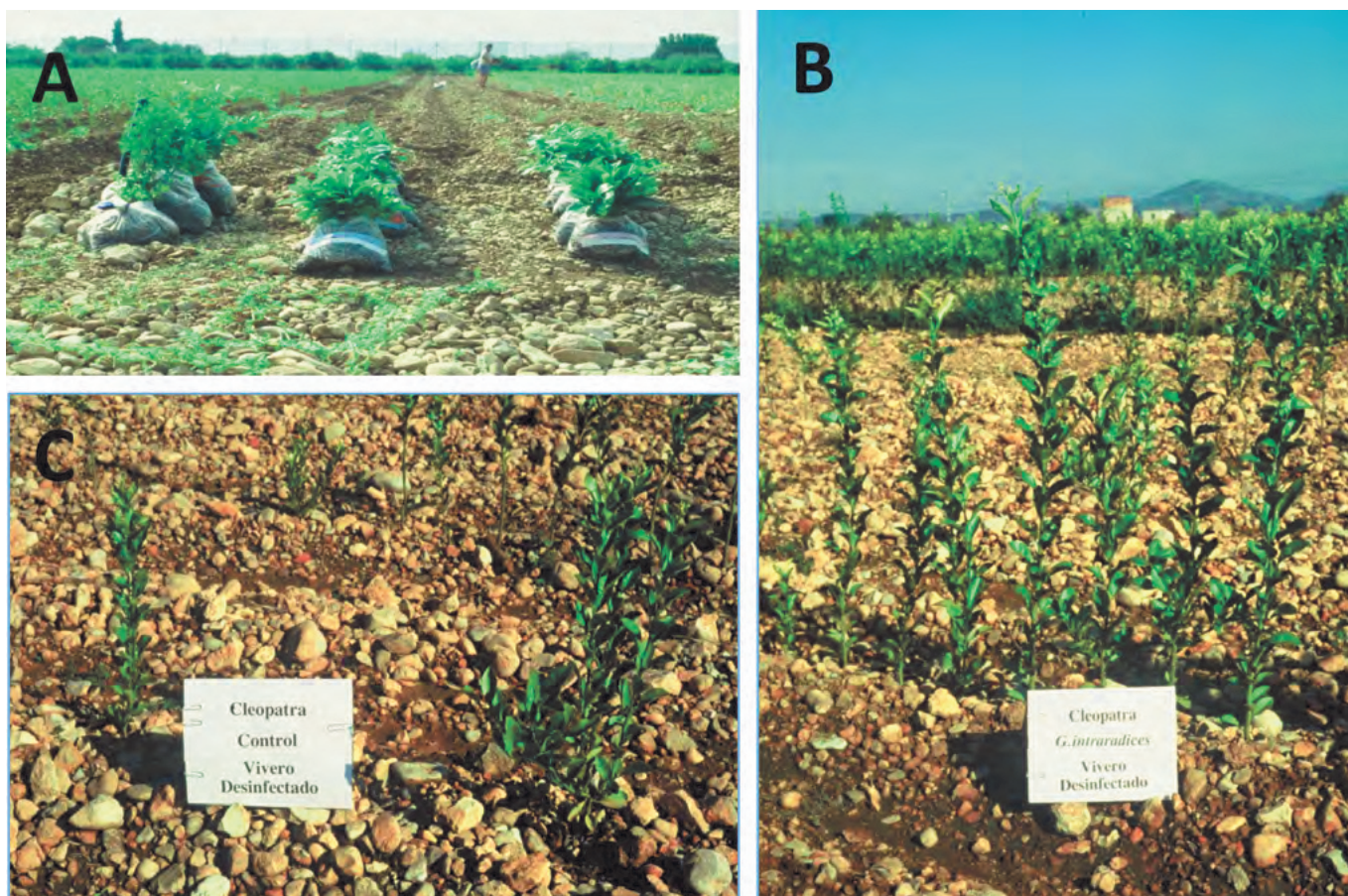


Foto 2. Trasplante de plantas de mandarina Cleopatra a un suelo de vivero. En el momento de la plantación (A) y a los doce meses del trasplante de plantas micorrizadas (B) y no micorrizadas (C) en suelo de vivero desinfectado.

R. irregulare). A los seis meses de la inoculación, y tras comprobar la presencia de micorrizas en las plantas, éstas se trasplantaron a tres parcelas de características diferenciadas: (1) suelo de vivero reutilizado, (2) suelo de vivero desinfectado y (3) suelo virgen.

Las plantas se distribuyeron en las tres parcelas en bloques al azar con ocho bloques de diez plantas cada uno de los cuatro patrones por tratamiento, que fueron: (1) plantas previamente micorrizadas y (2) plantas control no micorrizadas. Un año después del trasplante a suelo de vivero se midieron parámetros de crecimiento no destructivos y se determinó la supervivencia al trasplante de los patrones.

Como resultado se comprobó que la micorrización aumentó significativamente la supervivencia al trasplante (Figura 2) y el desarrollo de los patrones amargo y Cleopatra en las tres parcelas (Figura 3), y especialmente en el suelo de vivero desinfectado



Foto 3. Efecto de la aplicación de micorrizas localizada en suelo de semillero a los seis meses de la siembra. A la izquierda plantones micorrizados (MA) y a la derecha no micorrizados (C).

(Foto 2). Sin embargo, la micorrización de los híbridos Citrange Troyer y Citrumelo Swingle no tuvo efecto significativo sobre la supervivencia excepto en una parcela desinfecta-

da, aunque sí favoreció el crecimiento de Citrange Troyer en las dos parcelas de suelo de vivero reutilizado. Los resultados de campo demostraron el papel de la micorrización tem-

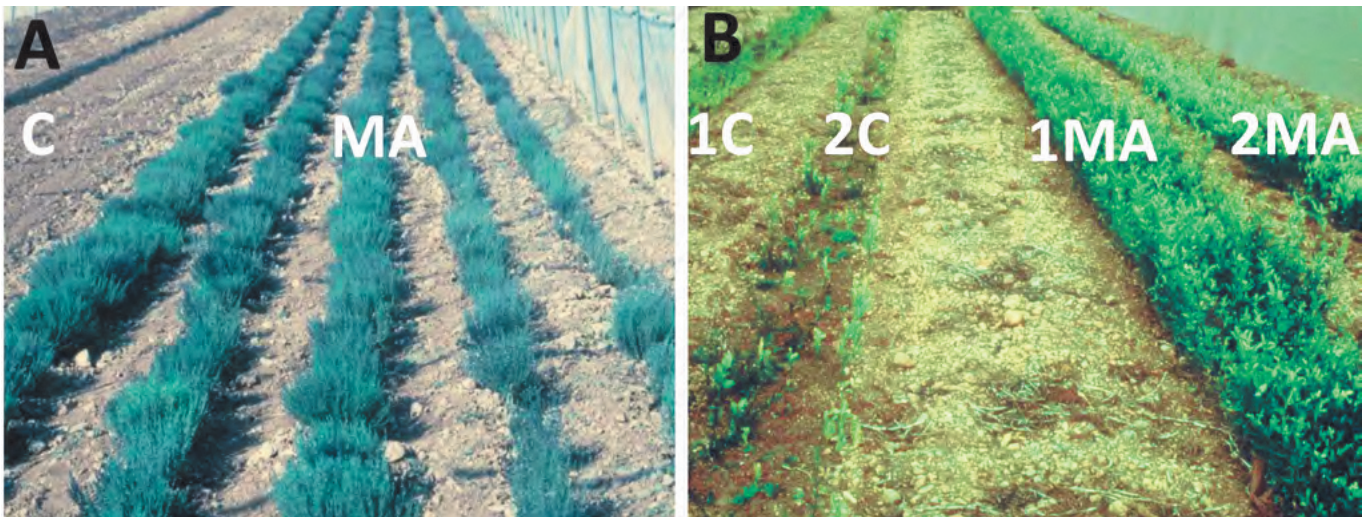


Foto 4. Rotación de cultivo con plantas aromáticas micorrizadas. (A) Plantación de tomillo micorrizado en un suelo de replante antes de la siembra y (B) desarrollo de las plantas de citrange Troyer (1) y mandarina Cleopatra (2) sembradas en la zona control sin plantas micorrizadas (C) y en las franjas de suelo con plantas micorrizadas (MA).

	Citrange Troyer		Mandarino Cleopatra	
	Altura (cm) ¹	Densidad ²	Altura ¹	Densidad ²
Semillero desinfectado				
Con plantas micorrizadas	33 c	243 b	22 b	78 b
Sin plantas micorrizadas	12 a	149 a	13 a	10 a
Semillero No desinfectado				
Con plantas micorrizadas	26 b	258 b	27 c	69 b
Sin plantas micorrizadas	13 a	132 a	15 a	9 a

¹Los datos son media de 200 plantas; ²Los datos son media de 3 réplicas de 1 m de sección de semillero. Medias en la misma columna seguidas por la misma letra no son estadísticamente distintas según el Test de Tukey (P<0,05)

Tabla 2. Altura (cm) y densidad (número de plantas/m de sección de semillero) de plantas de citrange Troyer y mandarina Cleopatra a los seis meses de la siembra en un suelo de semillero de replante desinfectado o no desinfectado con o sin pre-cultivo de plantas de *Thymus vulgaris* micorrizadas.

prana para el desarrollo y la supervivencia al trasplante de los patrones de cítrico en suelos de replante, especialmente de los patrones más dependientes de la micorrización.

Micorrización en campo a nivel de semillero

Se evaluó la posibilidad de reutilizar un suelo de semillero de cítricos en años consecutivos mediante la incorporación de micorrizas en el suelo del semillero. Para ello se estudiaron dos sistemas de micorrización: (1) la inoculación directa en el suelo en el momento de la siembra de las semillas y (2) la inoculación mediante rotación de cultivo con plantas aromáticas portadoras de micorrizas.

Micorrización localizada del semillero

En primer lugar, se llevó a cabo la in-

corporación del hongo seleccionado directamente en el suelo desinfectado de un invernadero preparado para semillero de patrones de cítrico. En el surco de siembra se aplicó el inóculo de micorrizas multiplicado en las instalaciones del IRTA en el Centro de Cabrils (Barcelona) de forma localizada, justo debajo de las semillas de Citrange Troyer y de Mandarina Cleopatra. Se realizaron dos tratamientos que fueron inoculación con *G. intraradices* (actualmente *R. irregulare*) y control no inoculado.

Las diferencias de desarrollo entre las plantas micorrizadas y no micorrizadas ya se apreciaron visualmente a los seis meses de la siembra (Foto 3) manteniéndose la diferencia de crecimiento hasta un año después de la siembra, en que se midieron parámetros de crecimiento no destructivos que confirmaron diferen-

cias estadísticamente significativas entre las plantas micorrizadas y no micorrizadas.

Precultivo de plantas aromáticas micorrizadas

A la vista de los resultados, se estudió la posibilidad de reutilizar un suelo de semillero de cítricos en años consecutivos introduciendo plantas portadoras de micorrizas como sistema de inoculación. Para ello se realizó un precultivo con plantas aromáticas micorrizadas previa a la siembra de las semillas de cítrico. Las plantas aromáticas escogidas fueron tomillo (*Thymus vulgaris*), romero (*Rosmarinus officinalis*) y lavanda (*Lavandula vera*) por ser especies aromáticas autóctonas. Las plantas se micorrizaron en condiciones de invernadero, y tras cinco meses de crecimiento en condiciones controladas, y una vez comprobada la colonización micorrízica por *G. intraradices* (actualmente *R. irregulare*) en sus raíces, las plantas se trasplantaron a un suelo que había sido utilizado como semillero en años anteriores. Una sección del suelo se desinfectó y se dejó otra sin desinfectar. En cada sección se delimitaron dos espacios y en uno de ellos se trasplantaron las plantas aromáticas en hileras con una separación entre plantas de 20 cm. Las plantas aromáticas crecieron en el campo durante seis meses para coincidir con el momento de siembra de las semillas de cítrico. En ese momento las plantas aromáticas se segaron,

transferencia tecnológica

| micorrizas |

dejando las raíces micorrizadas en el suelo y sobre la misma zona se sembraron semillas de Citrange Troyer y de mandarina Cleopatra. A los seis meses de la siembra las diferencias en el crecimiento y en la supervivencia fueron visibles a simple vista para los dos patrones de cítrico (Foto 4). El resultado fue un crecimiento muy superior, con diferencias estadísticamente significativas, de los plantones sembrados en las zonas sometidas a la rotación con plantas aromáticas en ambos tipos de suelo, desinfectado y no desinfectado, especialmente en el caso de mandarina Cleopatra (Tabla 2). Al observar las raíces de los cítricos, se constató que las plantas provenientes de los semilleros micorrizados presentaban colonización interna en sus raíces,

mientras que las plantas sembradas en los semilleros no micorrizados, prácticamente no presentaban colonización AM. Las plantas de tomillo fueron las que resultaron más adecuadas como plantas portadoras de micorrizas.

Agradecimientos

Los autores quieren agradecer a Viveros Gurbí, (Alcanar, Tarragona) su colaboración en los estudios llevados a cabo en sus instalaciones.

Abstract

Arbuscular mycorrhizal fungi (AM) are naturally present in most soils, although their presence may heavily decrease by the continued application of pesticides or by the excessive use of fertilizers that may limit their

diversity and function. Traditionally citrus nurseries have been established in virgin lands since the disinfection of soils used to reduce the populations of pathogenic organisms can decrease growth and cause ferric chlorosis in plants, symptoms that are not always corrected with the use of fertilizers. This replant situation in citrus nurseries has been attributed to the elimination of the arbuscular mycorrhizal fungi that form spontaneous symbiosis in the roots of plants. In this article, studies conducted with citrus rootstocks inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi are reported and the application of mycorrhizae in the nursery production process in replant soils is evaluated.

Bibliografía

- ! **Camprubi, A., Calvet, C.** 1996. Isolation and screening of mycorrhizal fungi from citrus nurseries and orchards and inoculation studies. *HortScience* 31(3), 366-369.
- Graham, J.H., Linderman, R.G., Menge, J.A.** 1982. Development of external hyphae by different isolates of mycorrhizal *Glomus* sp. in relation to root colonization and growth of Troyer citrange. *New Phytol.* 91, 683.
- Habte, M., Manjunath, A.** 1991. Categories of vesicular-arbuscular mycorrhizal dependency of host species. *Mycorrhiza* 1, 3-12.
- Porter, W.N.** 1979. The most probable number method for enumerating infective propagules of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Austral. J. Soil Res.* 17, 515-519.
- Reed, H., Fremont, T.** 1935. Factors that influence the formation and development of mycorrhizal associations in citrus roots. *Phytopathology* 25, 645.