

ISSN 2307-1990

# APF

Revista Agropecuaria y Forestal

Volumen 10 (1) 2021



Sociedad Dominicana de Investigadores Agropecuarios y Forestales  
(SODIAF)



## ***“La investigación al servicio de la producción”***

La Sociedad Dominicana de Investigadores Agropecuarios y Forestales (SODIAF) se fundó el 20 de febrero del año 1992 y es una organización sin fines de lucro, que agrupa a más de 200 investigadores agropecuarios y forestales del país.

### **Valores de la SODIAF:**

- *Calidad de la investigación*
- *Formación y crecimiento de sus miembros*
- *Promoción y difusión de las investigaciones*
- *Cooperación con instituciones nacionales e internacionales*
- *Establecimiento de un código ético*
- *Solidaridad con la mejora de las condiciones de trabajo para los investigadores*
- *Creación de opinión sobre nuevas tecnologías y problemas agropecuarios*

### **Misión de la SODIAF**

Es una Sociedad sin fines de lucro, comprometida con la formación, crecimiento, ética y condiciones de trabajo de los investigadores, que promueve la calidad, difusión y pertinencia de las investigaciones, la cooperación nacional e internacional y que orienta a la sociedad sobre el desarrollo científico y tecnológico del sector agropecuario y forestal.

### **Visión de la SODIAF**

Asegurar la calidad y pertinencia de las investigaciones agropecuarias y forestales en la República Dominicana; ser la primera institución dominicana de orientación sobre el desarrollo de tecnologías agropecuarias y forestales; y procurar un ambiente adecuado para el ejercicio del investigador.

# Revista APF

Órgano de difusión de la Sociedad Dominicana de Investigadores Agropecuarios y Forestales, Sodiaf.

La Revista APF de la Sociedad Dominicana de Investigadores Agropecuarios y Forestales es un mecanismo para contribuir con la difusión e intercambio de información sobre el quehacer científico y tecnológico. Se pone a la disposición del Sistema Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Forestales e investigadores de la región del Caribe y América Latina. Está dirigida a un público global, interesado en las disciplinas biofísicas o socioeconómicas que inciden en el desarrollo de la agropecuaria y los recursos naturales.

## Instituciones Auspiciadoras

- Ministerio de Agricultura (MA)
- Consejo Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (Coniaf)
- Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (Idiaf)
- Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc. (Cedaf)
- Sociedad Dominicana de Investigadores Agropecuarios y Forestales (Sodiaf)
- Instituto de Innovación en Biotecnología e Industria (IIBI)

---

## Correspondencia:

Toda la correspondencia dirigida a la Revista debe dirigirse al Editor en Jefe:

### José Richard Ortiz

Editor en Jefe

Revista APF

José Amado Soler 50, Ensanche Paraíso,

Santo Domingo, República Dominicana

(Oficinas del Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc. - Cedaf)

Teléfono: 809-565-5603 Ext 222 (Cedaf)

Fax: 809-544-4727 Atención Sodiaf

Email: [sodiaf@sodiaf.org.do](mailto:sodiaf@sodiaf.org.do) • [editor.revista@sodiaf.org.do](mailto:editor.revista@sodiaf.org.do)

Sitio Web: [www.sodiaf.org.do](http://www.sodiaf.org.do)

**Cita correcta:** Revista APF. 2021. Sociedad Dominicana de Investigadores Agropecuarios y Forestales (Sodiaf). Santo Domingo, DO. Volumen 10(1).

Revista electrónica: <http://www.sodiaf.org.do/apf>

## Editor en Jefe

*José Richard Ortiz, Idiaf*

## Editor Asociado

*Elpidio Aviles, Sodiaf*

## Consejo Asesor:

*José Pablo Morales  
Universidad de Puerto Rico*

*Graciela Godoy  
Idiaf*

*Modesto Reyes  
UASD*

*Jesús Rosario  
Sodiaf*

*Birmania Wagner  
Sodiaf*

*Freddy Contreras  
Idiaf*

*Elpidio Aviles  
Idiaf/ Sodiaf*

## Comité Editorial:

*Elpidio Aviles  
Sodiaf*

*Gonzalo Morales  
CEDAF*

## Diseño y Diagramación

*Gonzalo Morales  
Cedaf/Sodiaf*

## Foto de Portada:

*Aislamiento y selección de hongos endófitos nativos con potencial antagónico a nematodos fitoparásitos.*

*Foto: Investigadora Marisol Morel.*

# Revista APF

Revista Agropecuaria y Forestal

Sociedad Dominicana de Investigadores Agropecuarios y Forestales, Sodíaf



Revista APF - Vol 10 No 1, 2021

## Contenido y Autores

Pág.

### iii Editorial

*Ing. Elpidio Aviles, M.Sc.*

*Presidente de la Junta Directiva Sodíaf 2018-2021*

## Artículos Científicos

- 1-10 **Aislamiento de hongos fitopatógenos de las principales zonas de producción de vegetales bajo ambiente protegido de la República Dominicana**  
Socorro García, Marisol Morel, Juan Moya, Elpidio Avilés, Pedro Nuñez y Luis Matos
- 11-24 **Aislamiento y selección de hongos endófitos nativos con potencial antagonico a nematodos fitoparásitos en banano en las provincias Valverde y Montecristi**  
Marisol Morel, Socorro García, Yency Castillo, Juan de Dios Moya, Domingo Rengifo, Teófila Reinoso y Nélsida Martínez
- 25-40 **Evaluación de la capacidad endófito de cepas nativas de *Trichoderma* en plantas de tomate en casa malla**  
Marisol Morel, Yency Castillo, Socorro García, Marianela Conce, Juan de Dios Moya, Teófila Reinoso, Pedro Núñez y Katherine Alonzo
- 41-52 **Caracterización de micorrizas autóctonas en suelos y raíces provenientes de pasturas en Santiago Rodríguez, República Dominicana**  
Birmania Wagner, Elfrida Pimentel, Iris Marcano, Adriana Bueno, Abigail Salazar, Chery Merari y Pedro Núñez
- 53-68 **Identificación de micorrizas asociadas con el cultivo de cacao en la Estación Experimental Engombe de la UASD**  
Birmania Wagner, Elfrida Pimentel, Iris Marcano, Chery Kabe, Benitho Colin y Pedro Núñez
- 69-80 **Presencia de residuos de organofosforados y carbamatos en vegetales orientales en La Vega, República Dominicana**  
Pedro Núñez, Maira Santana, Ana Mejía, Cecilio Cabral, Juan Arias, Glenny López-Rodríguez y Leocadia Sánchez

# Editorial

*Todos los países del mundo deben procurar conseguir la seguridad alimentaria, pues enfrentan problemas de gran impacto como cambios climáticos, escasez de agua, aumento de población y empobrecimiento de la misma. Los elementos climatológicos como la humedad, el tipo de suelo y todas las condiciones que la localización geográfica conlleva, varían en la implementación de las nuevas tecnologías, al igual que el cultivo. Estos son los beneficios de la tecnología en la agricultura. Sensores remotos: son los encargados de capturar datos del cultivo, suelo, humedad, precipitaciones, crecimiento de las plantas, infestación de plagas y fertilizantes por medio de redes inalámbricas como Wi-Fi y Bluetooth. Sistemas de recomendación aplicados a cosechas: dichos sistemas muestran mapas de rendimiento y mapas de productividad de los cultivos basados en información de cosechas pasadas, lo que mejora la gestión de los cultivos. Aeronaves pilotadas remotamente, mejor conocidos como drones, ofrecen soluciones modernas y económicas en el ámbito de obtención de imágenes en zonas de difícil acceso y monitoreo del cultivo. Todas estas estrategias tienen como principal objetivo el optimizar los recursos y aumentar la calidad y los rendimientos del cultivo. El proceso y desarrollo de la tecnología en la agricultura son de suma importancia, ya que este sector es el encargado de alimentar al mundo. En tal sentido la Sodiaz que es una sociedad sin fines de lucro, que tiene como misión estar comprometida con la formación, crecimiento, ética y condiciones de trabajo de los investigadores; que promueve la calidad y difusión y pertinencia de las investigación cooperación nacional e internacional y orienta a la sociedad dominicana sobre el desarrollo científico y tecnológico del sector agropecuario y forestal y en especial, la Junta Directiva de la Sodiaz (2018-2021) se siente satisfecha al entregar este nuevo número de la revista APF 10 (1), 2021 a la comunidad científica dominicana e internacional, así como a los estudiantes, técnico y productores del país.*

**Ing. Elpidio Aviles, M.Sc.**

*Presidente de la Junta Directiva Sodiaz 2018-2021*



## Aislamiento de hongos fitopatógenos de las principales zonas de producción de vegetales bajo ambiente protegido de la República Dominicana

Socorro García<sup>1</sup>, Marisol Morel<sup>1</sup>, Juan Moya<sup>1</sup>, Elpidio Avilés<sup>2</sup>, Pedro Nuñez<sup>2</sup> y Luis Matos<sup>3</sup>

Investigadores agrícolas del Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (Idiaf). <sup>1</sup>Estacion Experimental Cacaotera Mata Larga en San Francisco de Macorís. <sup>2</sup>Centro Norte, La Vega y <sup>3</sup>Centro de Tecnologías Agrícolas (Centa), Pantoja, Santo Domingo Oeste. Correo electrónico: [sgarcia@idiaf.gov.do](mailto:sgarcia@idiaf.gov.do)

### RESUMEN

En los cultivos bajo ambiente protegido se presentan problemas por enfermedades radiculares producidas por fitopatógenos de suelos. Este estudio tuvo como objetivo realizar un diagnóstico de los principales hongos fitopatógenos que afectan el sistema radicular de los cultivos bajo ambiente protegido de las provincias Espaillat, La Vega y San José de Ocoa de la República Dominicana en el periodo diciembre 2016 hasta agosto 2017. Se realizó un muestreo exploratorio no probabilístico en 72 estructuras bajo ambiente protegido, sembrados de ajíes, tomates y pepino. Se colectaron muestras de plantas con síntomas aparentes de enfermedad. Se seleccionaron partes del tallo y del sistema radicular de los diferentes cultivos. Las muestras se cortaron en trozos pequeños, y bajo una cabina de flujo laminar se procedió a la desinfección por inmersión en alcohol isopropílico 70 % durante 10 segundos, luego se pasaron tres veces por agua destilada estéril y se colocaron en papel filtro por tres minutos. Se cultivaron en plato Petri con medio de cultivo AA y PDA al 10 % con antibiótico. Los platos fueron incubados a  $28 \pm 2$  °C. Los géneros encontrados fueron *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* y *Phytophthora*. *Fusarium* estuvo presente en el 77.8 % de las estructuras bajo ambiente protegido muestreados, *Pythium* en el 51.4 %, *Rhizoctonia* en el 33.3 % y *Phytophthora* en el 31.9 %. La mayor incidencia en los diferentes cultivos muestreados la presentó *Fusarium*. El cultivo de ají presentó la mayor prevalencia, siendo más afectado por *Fusarium* y *Pythium*.

*Palabras claves:* Invernadero, vegetales, *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* y *Phytophthora*.

### ABSTRACT

In crops under a protected environment there are problems due to root diseases produced by soil phytopathogens. The objective of this study was to make a diagnosis of the main phytopathogenic fungi that affect the root system of crops under a protected environment in the Espaillat, La Vega and San José de Ocoa provinces of the Dominican Republic in the period December 2016 to August 2017. An exploratory sampling was not carried out. probabilistic in 72 structures under a protected environment, planted with peppers, tomatoes and cucumber. Plant samples with apparent symptoms of disease were collected. Parts of the stem and root system of the different crops were selected. The samples were cut into small pieces, and under a laminar flow cabinet they were disinfected by immersion in 70% isopropyl alcohol for 10 seconds, then they were passed through sterile distilled water three times and placed on filter paper for three minutes. They were cultured in a Petri dish with AA culture medium and 10% PDA with antibiotics. The dishes were incubated at  $28 \pm 2$  °C. The genera found were *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* and *Phytophthora*. *Fusarium* was present in 77.8% of the sampled protected environment structures, *Pythium* in 51.4%, *Rhizoctonia* in 33.3% and *Phytophthora* in 31.9%. The

highest incidence in the different sampled crops was presented by *Fusarium*. The chili pepper crop presented the highest prevalence, being more affected by *Fusarium* and *Pythium*.

*Keywords: Greenhouse, Fusarium, vegetable, Pythium, Rhizoctonia y Phytophthora.*

## INTRODUCCIÓN

En la República Dominicana, los cultivos bajo ambiente protegido presentan problemas por la presencia de enfermedades radiculares producidas por fitopatógenos de suelos. Estas enfermedades disminuyen la productividad y la calidad de la cosecha, reduciendo su rentabilidad, Gilchrist *et al.* (2005).

Hubert (2008) reportó incidencia de los hongos *Fusarium*, *Phytophthora* y *Rhizoctonia*, entre otros, en cultivos bajo ambiente protegido de San José de Ocoa, tanto a nivel de agua de riego como de sustratos. *Fusarium* sp. estuvo presente en el 100 % de los invernaderos muestreados, seguido por *Phytophthora* con un 50 % y *Rhizoctonia* un 41.5 %.

El cultivo de tomate en la República Dominicana es atacado por los hongos *Phytophthora parasítica*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium* sp., *Verticillium* sp., entre otros, Valdez *et al.* (2016).

Según Ramírez y Pérez (2017) los suelos agrícolas de Jarabacoa se reconocen por la alta contaminación de hongos fitopatógenos *Fusarium*, *Pythium*, y *Phytophthora*; además, en una menor proporción los hongos *Rhizoctonia* y *Verticillium* en el agua que se emplea para el riego de los cultivos bajo ambiente protegido.

La mayoría de los productores tratan de controlar las enfermedades con la aplicación de gran cantidad de plaguicidas químicos. El abuso de la aplicación de los productos químicos conlleva a un aumento del riesgo de aparición de resistencia, contaminación ambiental y presencia de residuos en las cosechas.

La obtención de estos microorganismos fitopatógenos a través de los muestreos y aislamientos permitirá probar la eficacia de cepas nativas de *Trichoderma* spp. como agentes de biocontrol de los mismos, con lo cual se puede contribuir a la seguridad alimentaria y a la disminución de la contaminación ambiental. También, puede favorecer la creación y desarrollo de industrias locales para el procesamiento de productos biológicos. Esto puede contribuir con la generación de riqueza, mediante la creación de empleos, ahorro de divisas, reducción de costos de producción y mercadeo de productos inocuos.

El objetivo de este estudio fue realizar un diagnóstico de los principales hongos fitopatógenos que afectan los cultivos en cultivos bajo ambiente protegido en las principales zonas productoras de la República Dominicana.



## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se ejecutó durante en el periodo diciembre 2016 hasta agosto 2017 como una actividad del proyecto "Evaluación de cepas nativas de *Trichoderma* spp. en el control de hongos fitopatógenos de suelo bajo ambiente protegido", auspiciado a través del correo Fondo Nacional de Innovación y Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondocyt).

Se tomaron muestras en las principales zonas de producción de agricultura bajo ambiente protegido de las provincias Espaillat, La Vega y San José de Ocoa, Figura 1. El tipo de muestreo fue exploratorio no probabilístico, Hernández *et al.* (1998).

En la provincia Espaillat se realizó toma de muestras en seis estructuras bajo ambiente protegido: tres en el municipio Juan López y tres correspondiente a Villa Trina. En La Vega, en la parte baja se muestreó una estructura y en la parte alta 37 estructuras. En la provincia San José de Ocoa, se muestrearon 28 estructuras, Tabla 1. De cada estructura bajo ambiente protegido, se colectaron muestras de plantas con síntomas aparente de enfermedad, se tomaron 3 submuestra del sistema radicular para formar una muestra, Figura 2. Las muestras se procesaron en el laboratorio de Protección Vegetal del Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (Idiaf), en la Estación Experimental Cacaotera Mata Larga en San Francisco de Macorís.



Figura 1. Provincias muestreadas

Tabla 1. Cantidad de estructuras bajo ambiente protegido muestreados en las provincias Espaillat, La Vega y San José de Ocoa.

Provincia	Municipio	No. de estructuras BAP
Espaillat	Villa Trina	3
	Juan López	3
La Vega	Zona baja	1
	Jarabacoa	21
	Constanza	16
San José de Ocoa	Rancho arriba	7
	Sabana Larga	2
	Naranjal	2
	El Pinar	3
	La Ciénaga	10
	Las Auyamas	4
Total		72



Figura 2. Muestreos en cultivos bajo ambiente protegido de plantas con síntomas por la presencia de patógenos

Para conseguir los datos sobre el manejo de los cultivos bajo ambiente protegido muestreados, se les aplicó una encuesta a los encargados o a los propietarios de los mismos. Estas estructuras se georreferenciaron utilizando el sistema de posicionamiento global (GPS).

## Procesamiento de muestras y aislamiento de hongos fitopatógenos

Las muestras se procesaron siguiendo la metodología descrita por Watanabe (2002), Dhingra y Sinclair (1994), French y Herbert (1982). Se utilizaron medios de cultivo apropiados, AA (agar agua), PDA (papa dextrosa agar), los cuales se prepararon 3 a 5 días antes de la siembra. Para la preparación del Agar se utilizaron 10 g/l de agua, y para el PDA 39 g/l de agua, este último se complementó con 5 gramos de agar. Luego de preparado el medio de cultivo se colocó en plato calentador agitador durante a 45 a 60 minutos hasta disolver el agar. Ambos medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos a 1.2 kg/cm<sup>2</sup> de presión. Luego se dejó refrescar y se le agregó antibiótico a razón de 200 mg/l de amoxicilina y 20 gotas de ácido láctico 80 %. Se distribuyeron 10 ml de medio de cultivo en placas de Petri.

Para el aislamiento de los patógenos se seleccionó la parte afectada del tejido vegetal del tallo y del sistema radicular de los diferentes cultivos muestreados. Estas muestras fueron cortadas en trozos pequeños utilizando una tijera de jardinería y bisturí. Las muestras fueron trabajadas en la cabina de flujo laminar, Figura 3. Dentro de la cabina se procedió a realizar la desinfección por inmersión en alcohol al 70 %, durante 10 segundos; cumplido el tiempo, se eliminó el alcohol y se pasaron tres veces por agua destilada estéril por 10 segundos en cada lavada. Luego, se colocaron en un papel filtro estéril por tres minutos para eliminar el exceso de humedad.



Figura 3. Preparación de las muestras: A) Selección del tejido vegetal B) Desinfección y siembra en medio de cultivos

El tejido vegetal de cada una de las muestras fue colocado en el medio de cultivo en placa Petri para favorecer el desarrollo de los microorganismos. Los platos fueron incubados a  $28 \pm 2$  °C hasta que se observó el crecimiento de los micelios, Figura 4.

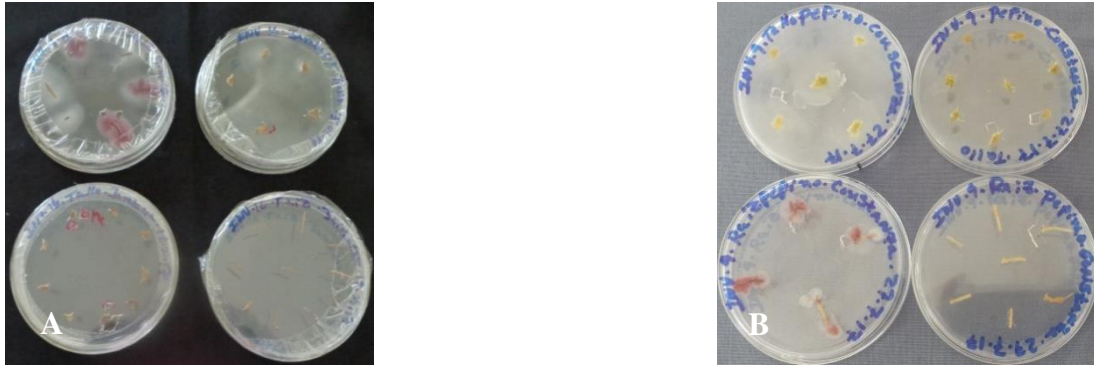


Figura 4. Crecimiento micelial de hongos de tejido vegetal: A) Jarabacoa B) Constanza, C y D) San José de Ocoa

### Variables evaluadas

Entre tres (3) y cinco (5) días después de la siembra, se calculó la cantidad de hongos fitopatógenos aislados de muestras de tejido vegetal procedentes de los cultivos bajo ambiente protegidos por provincia y municipio. Los mismos se identificaron según las características morfológicas.

### Purificación y conservación de los aislados fitopatógenos

Después de identificados, se procedió a purificar los aislados, realizando siembra con punta de hifas en medio de cultivo PDA, Figura 5. Transcurrido 5 a 8 días, se prepararon discos de micelio con un sacabocado de 5 milímetro y se colocaron de 8 a 10 discos en microtubos de 2 ml con agua destilada estéril; y, también, en microtubos conteniendo glycerol. Luego se incubaron en una nevera a una temperatura 5 °C.

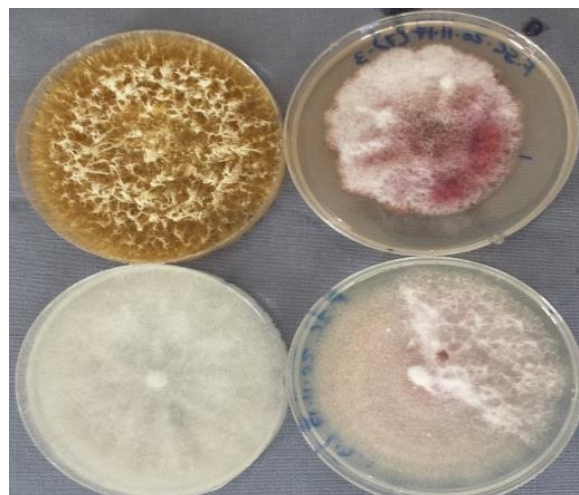


Figura 5. Hongos fitopatógenos purificados.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los aislados de los hongos fitopatógenos encontrados en las 72 estructuras bajo ambiente protegido muestreados fueron clasificados por provincia y municipio, Tabla 2. Se aislaron los géneros *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* y *Phytophthora*. En total, se obtuvo 140 aislados, de los cuales 56 fueron del género *Fusarium*, 37 de *Pythium*, 24 de *Rhizoctonia* y 23 de *Phytophthora*, Figura 6.

*Fusarium* estuvo presente en el 77.8 % de los invernaderos muestreados, *Pythium* en el 51.4 %, *Rhizoctonia* en el 33.3 % y *Phytophthora* en el 31.9 %. Resultados similares fueron reportados por Hubert (2008) en cultivos abjo ambiente protegido de San José de Ocoa, donde prevalecieron los hongos *Fusarium*, *Phytophthora* y *Rhizoctonia*.

Tabla 2. Estructuras bajo ambiente protegido afectados por hongos fitopatógenos.

Provincia	Municipio	Invernaderos evaluados (Unid.)	Fitopatógeno	Invernaderos afectados (Unid.)
Espaillat	Juan López	3	<i>Fusarium</i>	2
			<i>Phytophthora</i>	2
			<i>Pythium</i>	1
			<i>Rhizoctonia</i>	2
	Villa Trina	3	<i>Fusarium</i>	3
			<i>Phytophthora</i>	2
			<i>Pythium</i>	0
			<i>Rhizoctonia</i>	3
La Vega	Concepción de La Vega	1	<i>Fusarium</i>	1
			<i>Phytophthora</i>	1
			<i>Pythium</i>	0
			<i>Rhizoctonia</i>	1
	Jarabacoa	21	<i>Fusarium</i>	12
			<i>Phytophthora</i>	5
			<i>Pythium</i>	5
			<i>Rhizoctonia</i>	5
	Constanza	16	<i>Fusarium</i>	16
			<i>Phytophthora</i>	3
			<i>Pythium</i>	10
			<i>Rhizoctonia</i>	3
San José de Ocoa	Rancho arriba	7	<i>Fusarium</i>	5
			<i>Phytophthora</i>	2
			<i>Pythium</i>	6
			<i>Rhizoctonia</i>	5
	Sabana Larga	2	<i>Fusarium</i>	2
			<i>Phytophthora</i>	0
			<i>Pythium</i>	2
			<i>Rhizoctonia</i>	1
	San José de Ocoa	19	<i>Fusarium</i>	15
			<i>Phytophthora</i>	8
			<i>Pythium</i>	14
			<i>Rhizoctonia</i>	4

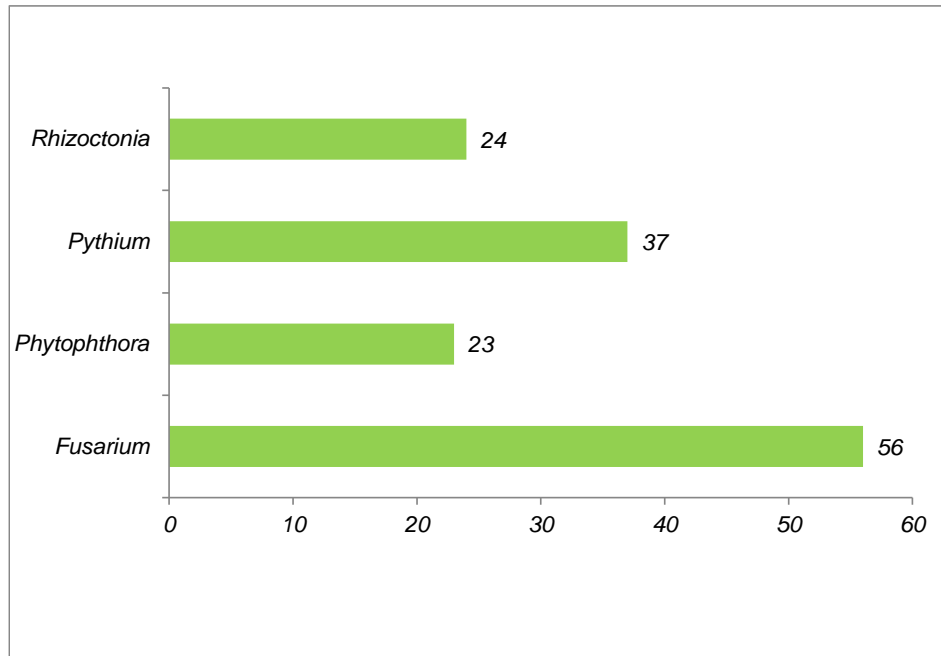


Figura 6 . Fitopatógenos aislados en estructuras bajo ambiente protegido

De los 56 aislados obtenidos de *Fusarium*, veintinueve (29) colonias correspondieron a la provincia de La Vega, veintidós (22) a San José de Ocoa y cinco (5) a Espaillat. En cuanto a los 37 aislados de *Pythium*, quince (15) pertenecen a La Vega, veintiuno (21) a San José de Ocoa y uno (1) a Espaillat. Mientras que del hongo *Rhizoctonia* se aislaron 24 (veinticuatro), de los cuales diez (10) son de La Vega, diez (10) de San José de Ocoa y cinco (5) de Espaillat. Del género *Phytophthora*, de los 23 aislados encontrados nueve (9) pertenecen a La Vega, diez (10) a San José de Ocoa y cuatro (4) a Espaillat, Figura 7. Estos cuatro géneros de hongos fitopatógenos también fueron reportados por Ramírez y Pérez (2017), al evaluar el agua utilizada para el riego en invernadero en Jarabacoa.

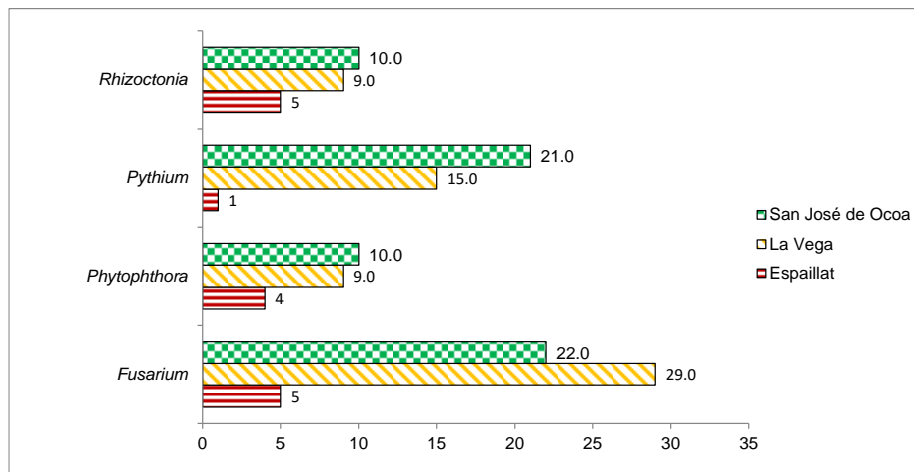


Figura 7. Invernadero afectado por fitopatógenos por provincia.

Además, en este trabajo se determinó que los cultivos que mayor predominaron bajo ambiente protegido fueron el ají, tomate y pepino, los cuales fueron afectados en mayor proporción por los géneros *Fusarium* y *Pythium*, Tabla 3.

Tabla 3. Cantidad de fitopatógenos aislados por cultivo.

Cultivos	Fitopatógeno aislados			
	<i>Fusarium</i>	<i>Phytophthora</i>	<i>Pythium</i>	<i>Rhizoctonia</i>
Ají	28	19	19	18
Tomate	15	2	12	4
Pepino	6	2	4	1
Fresa	2	0	0	1
Cebolla	2	0	0	0
Flores	1	0	1	0
Esparrago virgato	1	0	1	0
Albahaca verde	1	0	0	0
Total general	56	23	37	24

## CONCLUSIONES

En las muestras de material vegetal provenientes de invernaderos de las provincias La Vega, San José de Ocoa y Espaillat, fueron aislados los géneros de hongos fitopatógenos *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* y *Phytophthora*.

*Fusarium* estuvo presente en el 77.8 % de los invernaderos muestreados, *Pythium* en el 51.4 %, *Rhizoctonia* en el 33.3 % y *Phytophthora* en el 31.9 %.

Los cuatro géneros aislados estuvieron presentes en al menos uno de los invernaderos de los municipios considerados, excepto *Pythium* que no se encontró en Villa Trina ni en Concepción de La Vega y *Phytophthora* que no apareció en Sabana Larga.

De los géneros de fitopatógenos aislados en los 72 invernaderos muestreados, *Fusarium* fue el que presentó la mayor incidencia en los diferentes cultivos.

El cultivo de mayor prevalencia en los invernaderos fue el ají, siendo el más afectado por los géneros *Fusarium* y *Pythium*.

## LITERATURA CITADA

Dhingra, O.; Sinclair, J. 1994. Basic plant pathology methods. Second edition. 2<sup>nd</sup>. ed. 434 p.

French, E.; Herbert, T. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. 1era impresión. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, IICA. Serie de libros y materiales educativos No. 43. San José, CR. 289 p.

Gilchrist, L.; Fuentes, G.; Martínez, C.; López, R.; Duveille, R.; Singh, M.; García, A. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. 2 ed. Centro Internacional para el Mejoramiento del Maíz y el Trigo (Cimmyt). Texcoco, MX. 68 p. (En línea). Revisado el 12 de septiembre 2012. Disponible en:

<https://repository.cimmyt.org/bitstream/handle/10883/3217/60420.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

González, L. 1989. Introducción a la Fitopatología 1. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). San José, CR. 148 p. González, L. 1989. Introducción a la Fitopatología 1. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). San José, CR. 148 p. (En línea). Revisado el 12 de septiembre 2012. Disponible en:

<http://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/16538/BVE21058448e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Hernández, R.; Fernández, C.; Baptista, M.; 1998. Metodología de la Investigación Científica. 2da. Edición. McGraw-Hill Interamericana. Editores. S. A. México, MX. Pp. 58, 59, 226.

Hubert, R. 2008. Diagnóstico de manejo e identificación de microorganismos patógenos presentes en el cultivo de ají (*Capsicum annuum* L.) bajo invernadero en San José de Ocoa, República Dominicana. Tesis para optar por el título de Máster en Ciencias Manejo Integrado de Plagas. Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD). 70 p.

Ramírez, J.; Pérez, Q. 2017. Calidad fitosanitaria del agua de riego en producción de ají (*Capsicum annuum* L) en invernaderos de Jarabacoa, provincia La Vega, Republica Dominicana. En: Socialización de resultados de investigación en cultivos bajo ambiente controlado. UNISA/IDIAF. (Universidad ISA), (Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. Consejo Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (CONIAF). Santo Domingo, R. D. 6: 33-50.

Valdez, F.; Matos, L.; Álvarez, P. 2016. Índice de plagas y enfermedades de importancia económica en la República Dominicana. Ministerio de Agricultura. Oficina de ejecución de Proyectos. Viceministerio de Extensión y Capacitación Agropecuarias. Departamento de Sanidad Vegetal. Programa "Sanidad e Inocuidad Agroalimentaria". Banco Interamericano de Desarrollo (BID). Santo Domingo, DO. p. 152

Watanabe, T. 2002. Pictorial atlas of soil and seed fungi. Morphologies of cultured fungi and key to species. 2<sup>nd</sup>. ed. CRC press, Lewis Publishers. USA. 486 p.



## Aislamiento y selección de hongos endófitos nativos con potencial antagonístico a nematodos fitoparásitos en banano en las provincias Valverde y Montecristi

**Marisol Morel<sup>1\*</sup>, Socorro García<sup>1\*\*</sup>, Yency Castillo<sup>1</sup>, Juan de Dios Moya<sup>2</sup>, Domingo Rengifo<sup>3</sup>, Teófila Reinoso<sup>4</sup> y Nélsida Martínez<sup>2</sup>**

Investigadores del Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF). 1\*\* Investigador líder, investigadores y asistente del proyecto "Exploración y selección de microorganismos antagonísticos nativos para el control de nematodos fitoparásitos en plantaciones de banano" Idiaf/Mescyt <sup>1 y 2</sup> Estación Experimental Cacaotera Mata Larga del Idiaf en San Francisco de Macorís, <sup>3</sup>Centro Norte del idiaf en La Vega. \*Autor para correspondencia: [marisolmorel25@hotmail.com/](mailto:marisolmorel25@hotmail.com/)

### RESUMEN

En la República Dominicana, la producción de banano (*Musa AAA*) se ha convertido en una actividad agrícola importante para la generación de divisas y empleos, con incremento significativo desde los años 1990. El cultivo de banano es afectado por nematodos fitoparásitos que destruyen el sistema radicular de las plantas. El objetivo de esta investigación fue aislar e identificar hongos nativos con potencial antagonístico a nematodos fitoparásitos en plantaciones de banano. Se muestrearon 20 fincas de bananos, 10 en la provincia Valverde y 10 en la provincia Montecristi. Las muestras se procesaron en el laboratorio de la Estación Experimental Mata Larga del Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (Idiaf), San Francisco de Macorís. Fueron seleccionadas raíces aparentemente sanas, se lavaron y cortaron en trozos de 3 a 4 cm de largo y se desinfectaron en cloro comercial al 2 % durante tres minutos, se pasaron tres veces por agua destilada estéril. Posteriormente, se sembraron en platos Petri con PDA 10 %. Se utilizaron cuatro platos por muestra, en cada plato se colocó cinco trocitos de raíces. Luego se incubaron de 5 a 7 días a  $28 \pm 2$  °C, y se identificaron las colonias desarrolladas en base a sus características morfológicas. En las muestras provenientes de la provincia Valverde, se aislaron 214 colonias de hongos endófitos, 13 corresponden al género *Trichoderma* y 201 a *Fusarium*. De las provenientes de Montecristi, se aislaron 209 colonias, de las cuales 53 corresponden al género *Trichoderma* y 156 a *Fusarium*. Del género *Trichoderma* se conservaron 19 cepas y del género *Fusarium* 18 cepas no patogénicas.

**Palabras claves:** Palabras claves: *Trichoderma*, *Fusarium*, colonias, muestreos, musáceas

### ABSTRACT

In the Dominican Republic, banana production (*Musa AAA*) has become an important agricultural activity for the generation of foreign exchange and jobs, with a significant increase since the 1990s. Banana cultivation is affected by phytoparasitic nematodes that destroy the system root of plants. The objective of this research was to isolate and identify native fungi with antagonistic potential to phytoparasitic nematodes in banana plantations. 20 banana farms were sampled, 10 in the Valverde province and 10 in the Montecristi province. The samples were processed in the laboratory of the Mata Larga Experimental Station of the Dominican Institute of Agricultural and Forestry Research (Idiaf), San Francisco de Macorís. Apparently healthy roots were selected, washed and cut into 3 to 4 cm long pieces and disinfected in 2% commercial chlorine for three minutes, passed three times through sterile distilled water. Subsequently, they were seeded in Petri dishes with 10% PDA. Four plates were used per sample, in each plate five pieces of roots were placed. Then they were incubated for 5 to 7 days at  $28 \pm 2$  °C, and the developed colonies were identified based on their

morphological characteristics. In the samples from the Valverde province, 214 colonies of endophytic fungi were isolated, 13 corresponding to the genus *Trichoderma* and 201 to *Fusarium*. Of those from Montecristi, 209 colonies were isolated, of which 53 correspond to the genus *Trichoderma* and 156 to *Fusarium*. Of the genus *Trichoderma*, 19 strains were conserved and of the genus *Fusarium* 18 non-pathogenic strains.

*Keywords:* *Trichoderma*, *Fusarium*, colonies, samples, musaceae

## INTRODUCCIÓN

En la República Dominicana, la producción de banano (*Musa* AAA) se incrementó a partir de la renovación en la década de 1990, del puerto de Manzanillo, esto permitió que el país realice exportaciones de banano hacia Europa, Álvarez (2018). Las exportaciones de banano se han incrementado en los últimos años, pasando de 11,000 tm en 1990 a 334,000 tm en 2010 y para el 2019, a unas 394,448 tm, siendo la Unión Europea y los Estados Unidos de América los principales importadores, FAO (2012), MA (2020). El banano orgánico representa más del 55 % de la producción mundial; siendo, además, el de mayor demanda en los mercados internacionales, principalmente en la Unión Europea, FAO (2017). El banano, al igual que las demás musáceas, es afectado por nematodos fitoparásitos que destruyen el sistema radicular, debilitando el anclaje de las plantas, Gowen *et. al* (2005). También, al producir heridas en el sistema radicular, los nematodos facilitan la entrada de patógenos como son los hongos y las bacterias; esto genera pérdidas importantes en la producción. Las pérdidas económicas debidas a los nematodos ocurren principalmente por el volcamiento de las plantas, Román (1978). En la región noroeste de la República Dominicana, en un diagnóstico de laboratorio realizado entre los años 2010 al 2015 se observó que el nematodo *Helicotylenchus* sp fue el predominante en muestras de raíces de banano (69 %) y suelos bananeros (entre 49 y 58 %).

Los métodos de control de estos nematodos, por lo general, se basan en el uso de productos químicos sintéticos, Castillo *et al.* (2003) y Araya (2003). El manejo biológico con el uso de microorganismos antagonistas es una alternativa para reducir el daño producido por estos patógenos en este cultivo. Entre los microorganismos antagonistas se encuentran los hongos endófitos, Dubois *et al.* (2006). Los hongos endófitos son organismos que establecen una asociación específica con su hospedero para mutuo beneficio, Abello y Kelemu (2006). Estos hongos pueden ser encontrados colonizando las hojas, tallos y raíces de las plantas, Paris (2016).

En la rizosfera del banano han sido aislados microorganismos que pueden servir como controladores biológicos de enfermedades en el cultivo. Carr *et al.* (2012) aislaron hongos con gran potencial para controlar la enfermedad Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet). De igual forma, Medina (2016) aisló del suelo de la rizosfera de la especie silvestre del género *Polianthes*, el hongo *Trichoderma*, el cual, en pruebas de antagonismo *in vitro* contra *Fusarium oxysporum*, mostró capacidad antagónica contra el fitopatógeno. Marcano (2014) realizó aislamiento, caracterización y selección de cepas de bacterias de la rizosfera del banano en República Dominicana para el desarrollo de biofertilizantes. Condemarin *et al.* (2018) aislaron y caracterizaron bacterias, de suelos sin cultivar, cultivados y de rizosfera de raíces sanas del cultivo de uva (*Vitis vinifera*), y evaluaron *in vitro* su capacidad nematocida contra *Meloidogyne javanica*, logrando la mayor mortalidad con cepas

de *Pseudomonas putida* y *Bacillus subtilis*. La obtención de microorganismos nativos antagónicos en los sistemas de producción de banano permitirá probar la eficacia como agentes de biocontrol sobre nematodos fitoparásitos, con lo cual se puede contribuir a la seguridad alimentaria y a la disminución de la contaminación ambiental. Además, se puede favorecer la creación y desarrollo de industrias locales para el procesamiento de productos biológicos y contribuir a la generación de empleos. Esta investigación se desarrolló con el objetivo de aislar e identificar microorganismos nativos con potencial antagónico a nematodos fitoparásitos en plantaciones de banano en las provincias de Valverde y Montecristi.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Este estudio se realizó desde abril del 2019 hasta agosto del 2020, dentro del proyecto "Exploración y selección de microorganismos antagónicos nativos para el control de nematodos fitoparásitos en plantaciones de banano", teniendo dos escenarios: a nivel de campo, mediante muestreos de raíces en plantaciones de banano en zonas productoras de las provincias de Valverde y Montecristi, localizada en el nordeste de la República Dominicana y en laboratorio, mediante el aislamiento de microorganismos de las muestras, en los laboratorios de protección vegetal de la Estación Experimental Cacaotera Mata Larga del Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (Idiaf) en San Francisco de Macorís, provincia Duarte, en el nordeste de la República Dominicana.

### **Selección de las muestras**

Se realizó un muestreo exploratorio no probabilístico (Hernández *et al.* 1998), se tomaron muestras de raíces (Figura 1) en 20 fincas cultivadas de bananos, 10 fincas en la provincia Valverde y 10 en la provincia de Montecristi. Se tomó por cada hectárea una muestra compuesta por cinco submuestras, colectadas frente al hijo sucesor de plantas de banano recién paridas, a una profundidad de 20 cm. Para la toma de las muestras, se utilizó palín y tijeras. La cantidad de muestras tomadas por finca dependió del tamaño de la misma. Entre ambas provincias se tomaron 83 submuestras, de las cuales 44 correspondieron a Valverde y 39 a Montecristi, para conformar las 10 muestras de cada provincia. De las 10 fincas muestreadas en Valverde, ocho realizan manejo orgánico y dos, convencional. De igual manera, en Montecristi, ocho realizan manejo orgánico y dos convencional (Tabla 1). El número de fincas muestreadas se determinó por los resultados de un diagnóstico, realizado previo a esta actividad, mediante encuestas a los productores y de las cuales se determinó que los mismos no aplican productos a base de *Trichoderma*.



Figura 1. Muestreo de raíces en plantación de banano. Foto: Socorro García

Tabla 1. Cantidad de muestras recolectadas por provincia, municipio, finca y manejo realizado.

Provincia	Municipio	Finca	Manejo	Muestra
Valverde	Boca de Mao	Darío Bueno	Orgánico	8
	El Junquito, Mao	Franklin Ferreira	Orgánico	9
	El Juncalito, Mao	Miguel Isaías	Orgánico	8
	Laguna Salada	Rumaldo Rodríguez	Convencional	2
		Francisco Chávez	Orgánico	5
		Ramón Cabrera	Convencional	1
	El Charco	Rubén Darío	Orgánico	6
		Salustina Campos	Orgánico	2
	Tierra fría, Amina	Carolina Fermín	Orgánico	2
		Luis Payero	Orgánico	1
				44
Montecristi	Las Aguas	Miky Shigetome	Orgánico	6
	Palo Verde	Librado Torres	Convencional	1
	Piloto	Richard Núñez	Convencional	3
	Jaramillo	Carlos Salcedo	Orgánico	3
		Leonardo Toribio	Orgánico	5
		Héctor de Jesús Quintero	Orgánico	4
	Hatillo Palma	Roberto Sánchez	Orgánico	3
		Ana Mercedes Morel	Orgánico	2
		José Padilla	Orgánico	6
		Sonia Cruz	Orgánico	6
				39

## Procesamiento de las muestras

Para el aislamiento de hongos endófitos se utilizó la metodología descrita por Pocasangre *et al.* (2000). Se seleccionaron raíces aparentemente sanas, que fueron lavadas y cortadas en trozos entre 3 y 4 cm de largo, se colocaron en frasco de vidrio, previamente esterilizado. La desinfección se realizó por inmersión en cloro (hipoclorito de sodio al 2%) durante tres minutos, luego se enjuagó mediante el pase de tres veces por agua destilada estéril (Figura 2). Para eliminar humedad de los trozos de raíces, se colocaron en papel servilleta estéril y se cortaron en segmentos de aproximadamente 1.0 cm.

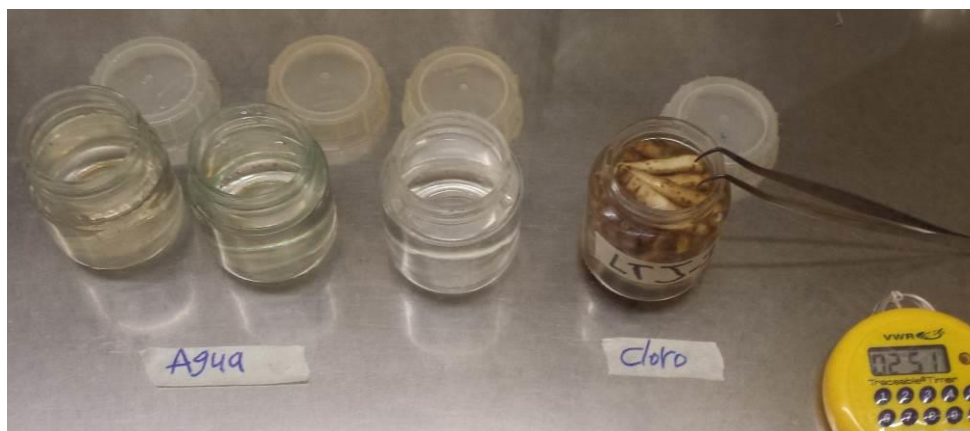


Figura 2. Desinfección de raíces recolectadas. Foto Marisol Morel

Los segmentos de las raíces fueron cortados longitudinalmente y sembrados en placa de Petri con medio de cultivo a base de papa dextrosa agar (PDA) al 10 %, al que se agregó 2 ml/l de amoxicilina y 20 gotas de ácido láctico 85 %. Se utilizó cuatro platos Petri por muestra y en cada plato se colocó cinco trocitos de raíz, para un total de 20 trocitos por muestra, Figura 3. Los platos se incubaron durante 5 a 7 días a  $28 \pm 2$  °C., hasta que se observó crecimiento de micelios y se identificó a las colonias desarrolladas en base a sus características morfológicas. Las colonias se purificaron mediante nuevos cultivos con puntas de hifa. Aproximadamente después de 8 días de incubados se conservaron en microtubos de 2 ml con glicerol al 30 % y que fueron colocados en una nevera a temperatura de - 4 °C.

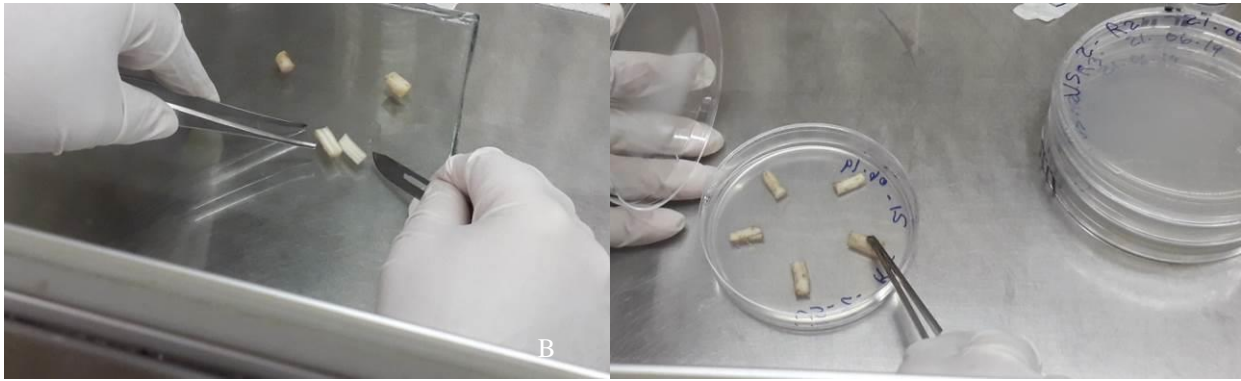


Figura 3. Procesamiento de las muestras, A) corte longitudinal, B) siembra en PDA en placas de Petri.  
Foto Nélsida Martínez

Después de 7 a 8 días de incubación de los segmentos de raíces, se evaluó por finca y municipio la cantidad de colonias de hongos endófitos *Trichoderma* spp. y *Fusarium* spp. que crecieron o desarrollaron en platos Petri.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

En las muestras de raíces de bananos de las provincias Valverde y Montecristi se aisló un total de 423 colonias de hongos endófitos nativos de los géneros *Trichoderma* y *Fusarium*. Del género *Trichoderma* se aislaron 66 colonias y de *Fusarium* 357. Según Beltrán-García *et al.* (2016), las raíces son el órgano principal de las plantas en donde ocurre la colonización de hongos y bacterias endófitas. Paris (2016), estudiando la diversidad y distribución de hongos endófitos en hojas, tallos y raíces, reportó que la raíz es el órgano donde se encuentra la mayor riqueza de colonización endófitas. Igualmente, Barrios-Murillo (2006), evaluando hongos endófitos para el manejo de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en plátano, determinó que en la raíz y en el cormo es donde ocurre la mayor presencia de los endófitos.

En las muestras de colectadas en la provincia de Valverde, se aislaron 13 colonias de *Trichoderma* y 201 de *Fusarium*, para un total de 214 colonias, y en las muestras colectadas en la provincia de Montecristi, se aislaron 53 colonias de *Trichoderma* y 156 de *Fusarium*, para un total de 209 colonias, Figura 4.

Estos resultados superan a los obtenidos por Meneses (2003) en diferentes sistemas de producción de banano orgánico. García *et al.* (2017) reportaron 300 colonias de los hongos endófitos *Trichoderma* y *Fusarium* aislados en plantaciones de plátano.

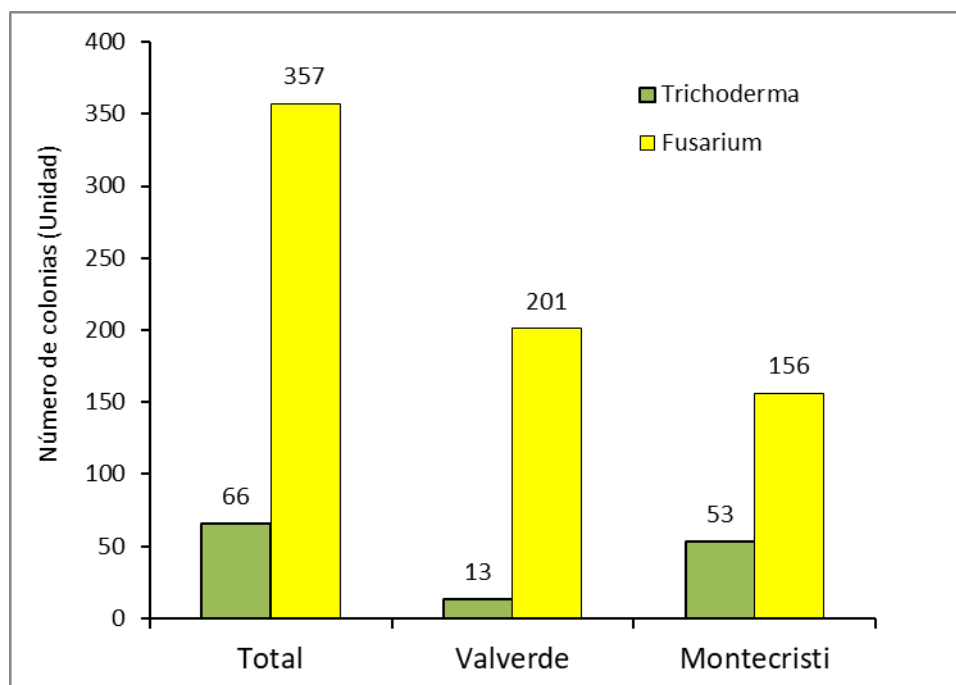


Figura 4. Colonias de hongos endófitos *Trichoderma* y *Fusarium* aislados de raíces de banano de Valverde y Montecristi

En la provincia de Valverde, se aislaron colonias del género *Trichoderma* en cuatro fincas, y del género *Fusarium* en las 10 fincas muestreadas, *Trichoderma* fue encontrado en mayor cantidad en la finca Miguel Isaías, en El Juncalito, Mao, con cinco colonias, seguido por la finca Darío Bueno en Boca de Mao, con cuatro colonias. Riera-Villalba (2015) reportó mayor cantidad, 11 aislados de *Trichoderma* spp en plantaciones de banano; la mayor presencia del género *Fusarium* se encontró en las fincas Darío Bueno y Miguel Isaías, con 52 colonias, respectivamente, Figura 5.

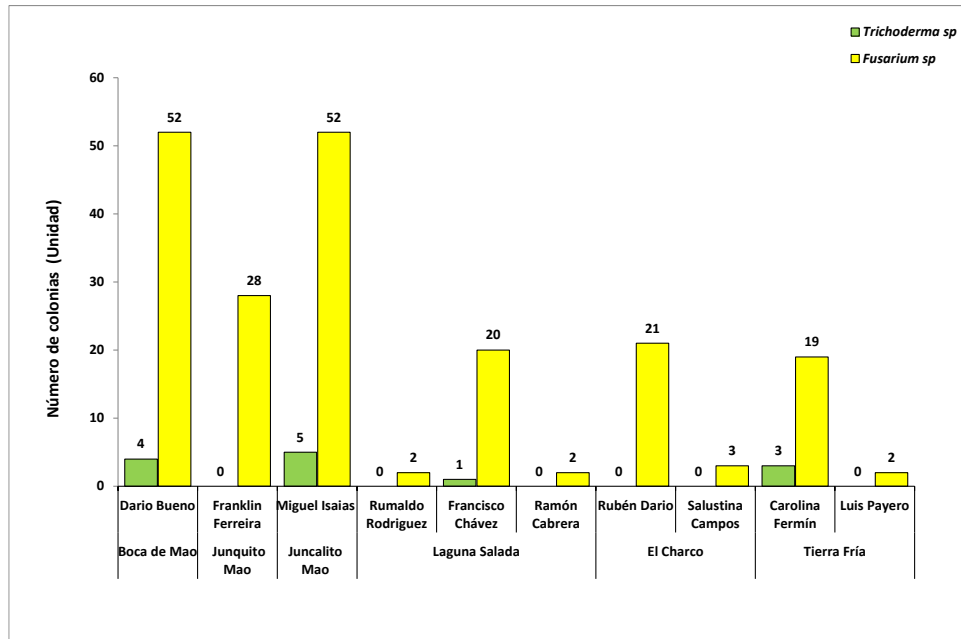


Figura 5. Número de colonias de *Trichoderma* y *Fusarium* aisladas de raíces de banano de fincas de Valverde

En la provincia de Montecristi, el género *Trichoderma* fue aislado en 6 fincas y *Fusarium* en todas las fincas muestreadas. La mayor presencia de *Trichoderma* (44 colonias) fue encontrada en la finca Roberto Sánchez en Hatillo Palma, mientras que la presencia de *Fusarium* fue la mayor en la finca José Padilla, con 43 colonias, Figura 6. Resultados similares fueron reportado por García *et al.* (2017), quienes encontraron 31 aislados de *Trichoderma* spp en raíces de plantas de plátano, aparentemente sanas.



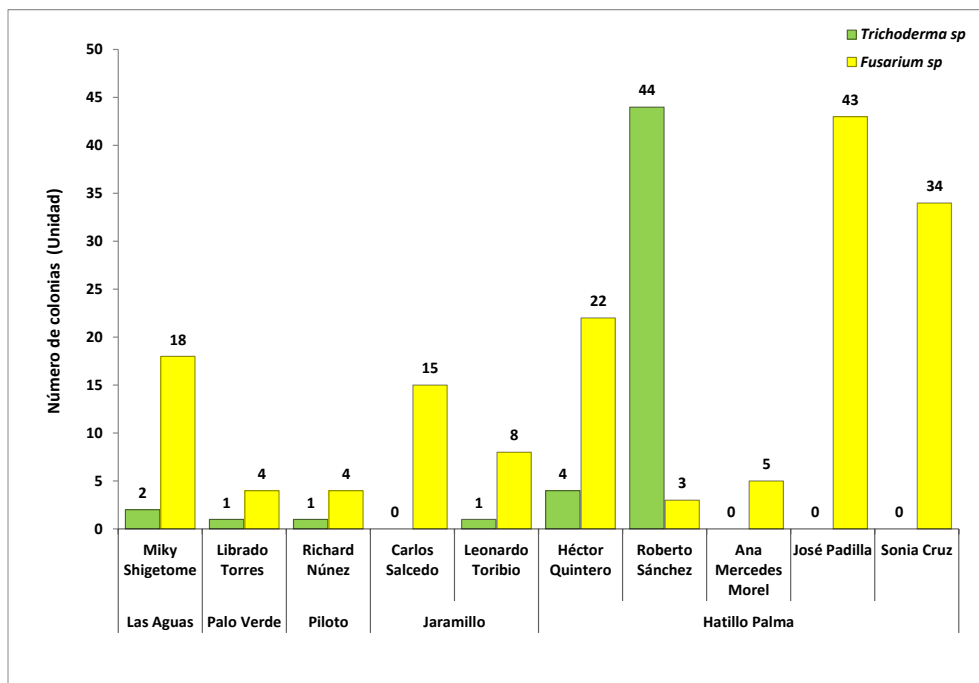


Figura 6. Número de colonias de *Trichoderma* y *Fusarium* aisladas de raíces de banana de fincas de Montecristi

En la Figura 7, se muestra el crecimiento de colonias de los hongos endófitos *Trichoderma* y *Fusarium* desde los segmentos de raíces de banana en platos Petri.

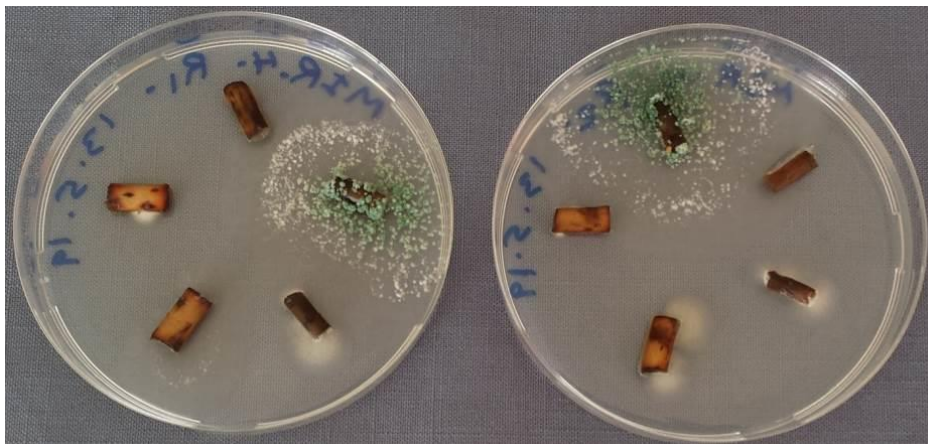


Figura 7. Colonias de hongos endófitos desarrollados en PDA. En color verde *Trichoderma* y con crecimiento mayor, y en color blanco *Fusarium* y menor crecimiento. Foto Marisol Morel

De los hongos endófitos del género *Trichoderma* aislados en Valverde y Montecristi, se conservaron 19 cepas y de *Fusarium* 18 cepas. De las colonias de *Trichoderma* spp. aisladas de Valverde se conservaron 9 cepas y de las colonias de *Fusarium* (no patogénico) se conservaron 11 cepas, Figura 8.

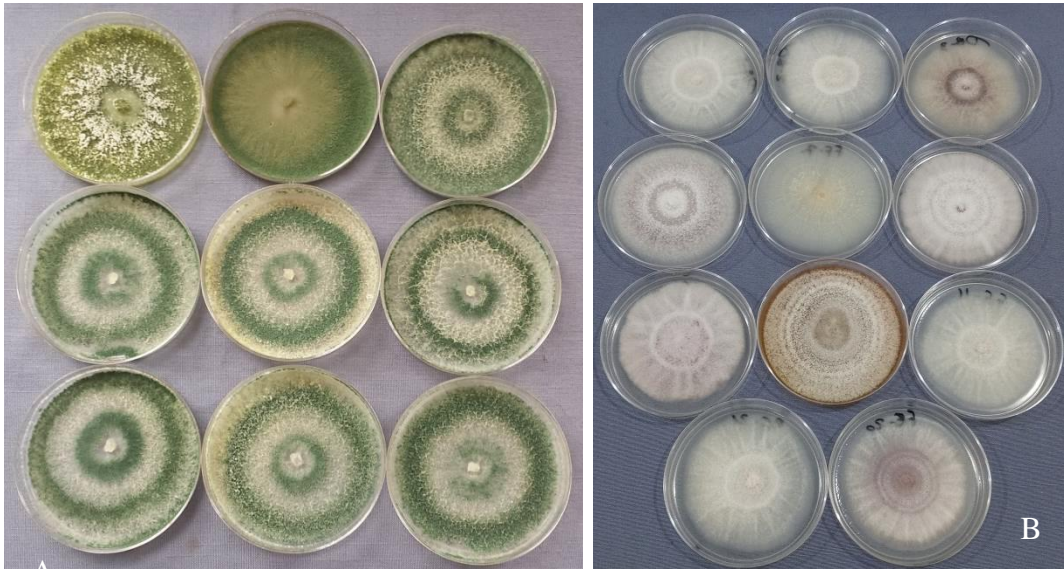


Figura 8. Cepas endófitas aisladas en plantaciones de Valverde: A) *Trichoderma* spp. B) *Fusarium* spp.  
Foto Marisol Morel

De las colonias de *Trichoderma* aisladas de Montecristi, se conservaron 10 cepas (Figura 9), y de *Fusarium* (no patogénico) se conservaron 8 cepas.

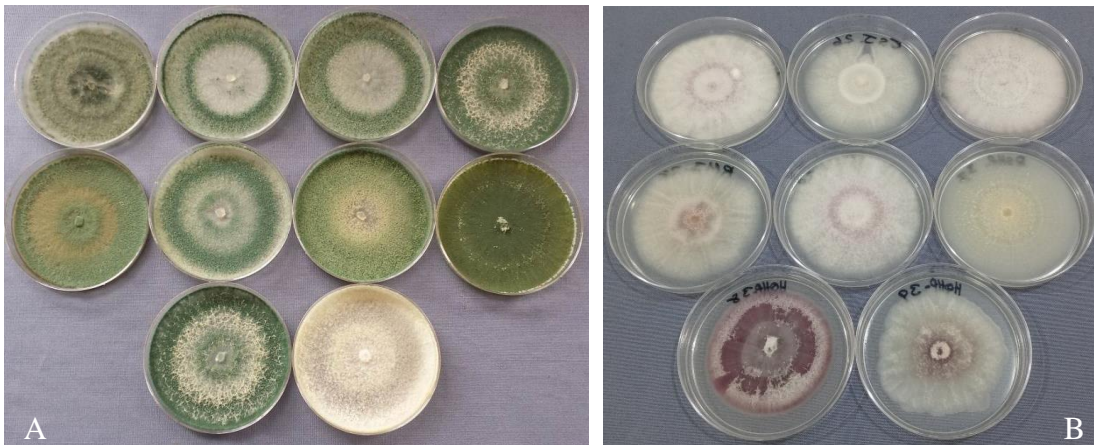


Figura 9. Cepas endófitas aisladas en plantaciones de Montecristi: A) *Trichoderma* spp., B) *Fusarium* spp.  
Foto Marisol Morel

Las 19 cepas de *Trichoderma* aisladas del sistema radicular de plantas de banano de las provincias Valverde y Montecristi se encuentran conservadas en glicerol al 30%, las mismas están identificadas molecularmente, Tabla 2.

Tabla 2. Especies nativas de *Trichoderma* aisladas en Valverde y Montecristi identificadas molecularmente.

Código de las cepas	Especie identificada
DB-4-E	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
DB-5-E	<i>Trichoderma harzianum</i>
MI-13-E	<i>Trichoderma asperellum</i>
MI-14-E	<i>Trichoderma asperellum</i>
MI-15-E	<i>Trichoderma</i> sp.
FC-16-E	<i>Trichoderma asperellum</i>
VS-17-E	<i>Trichoderma asperellum</i>
VS-18-E	<i>Trichoderma</i> sp.
VS-19-E	<i>Trichoderma asperellum</i>
MSLA-22-E	<i>Trichoderma asperellum</i>
LTPV-23-E	<i>Trichoderma viride</i>
LTPV-24-E	<i>Trichoderma</i> sp.
RNP-30-E	<i>Trichoderma asperelloides</i>
LTJ-31-E	<i>Trichoderma asperellum</i>
HQHP-32-E	<i>Trichoderma</i> sp.
RSHP-33-E	<i>Trichoderma</i> sp.
RSHP-34-E	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
RSHP-35-E	<i>Trichoderma asperellum</i>
RSHP-36-E	<i>Trichoderma asperellum</i>

## CONCLUSIONES

- En plantaciones (fincas) de bananos de las provincias Valverde y Montecristi fueron aislados e identificados hongos endófitos de los géneros *Trichoderma* y *Fusarium* con potencial antagónico a nematodos fitoparásitos.
- El número de fincas con presencia de hongos *Trichoderma* fue mayor en la provincia Montecristi que en la provincia Valverde.
- El género *Fusarium* fue encontrado en todas las fincas muestreadas.

## AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Educación Superior Ciencia y Tecnología (Mescyt), a través del Fondo Nacional de Innovación y Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondocyt) por el financiamiento del proyecto “Exploración y selección de microorganismos antagonistas nativos para el control de nematodos fitoparásitos en plantaciones de banano”.

A Juan Carlos Torres, por su colaboración en la coordinación con los productores de bananos para el muestreo en las fincas en las provincias de Valverde y Montecristi. Y a Elsa Sánchez, por la colaboración en el procesamiento de las muestras.

## LITERATURA CITADA

- Araya, M. 2003. Situación actual de nematodos en banano (*Musa AAA*) y plátano (*Musa AAB*) en el trópico americano. En: Actas del Taller Manejo convencional y alternativo de la sigatoka negra, nematodos y otra plaga asociada al cultivo de Musáceas, Guayaquil, Ecuador. Pp 79-102. (En línea). Revisado el 9 de abril 2021. Disponible en:  
[https://www.bioversityinternational.org/fileadmin/\\_migrated/uploads/tx\\_news/Manejo\\_convencional\\_y\\_alternativo\\_de\\_la\\_Sigatoka\\_negra\\_nematodos\\_y\\_otras\\_plagas\\_asociadas\\_al\\_cultivo\\_de\\_Mus%C3%A1ceas\\_en\\_los\\_tr%C3%B3picos\\_1242.pdf](https://www.bioversityinternational.org/fileadmin/_migrated/uploads/tx_news/Manejo_convencional_y_alternativo_de_la_Sigatoka_negra_nematodos_y_otras_plagas_asociadas_al_cultivo_de_Mus%C3%A1ceas_en_los_tr%C3%B3picos_1242.pdf)
- Álvarez 2018. República Dominicana produce más de un 60% de Banano Orgánico. (En línea). Revisado el 9 de abril 2021. Disponible en: <https://eldinero.com.do/56756/república-dominicana-produce-mas-de-un-60-de-banano-organico/>
- Abello, F.; Kelemu, S. 2006. Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 7(2): 55-57
- Barrios-Murillo, M. 2006. Estudio de hongos endófitos como inductores de resistencia para el control de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en Plátano. Tesis en: Magister Scientiae en agricultura ecológica. Turrialba, CR. (En línea). Revisado el 9 de abril 2021. Disponible en:  
[http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/5565/Study\\_of\\_fungal\\_endophytes\\_as\\_resistance\\_inductors\\_for\\_black\\_Sigatoka.pdf;jsessionid=6D1F26840BE39767962EF2AF79C21DF1?sequence=1](http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/5565/Study_of_fungal_endophytes_as_resistance_inductors_for_black_Sigatoka.pdf;jsessionid=6D1F26840BE39767962EF2AF79C21DF1?sequence=1)
- Beltrán-García, M.; Ortiz, M.; Nogueira, L.; Macedo, R.; Tinajero, C.; Padilla, A. 2016. Microorganismos endófitos, su mundo secreto y las aplicaciones en la agricultura. *La ciencia desde Jalisco*. Academia Jalisciense de Ciencias. Pp 5-25. (En línea). Revisado el 9 de abril 2021. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Miguel-Beltran-Garcia/publication/306378279\\_Microorganismos\\_endofitos\\_su\\_mundo\\_secreto\\_y\\_aplicaciones\\_en\\_la\\_agricultura/links/57bbc8ff08ae9fd82ef0edb/Microorganismos-endofitos-su-mundo-secreto-y-aplicaciones-en-la-agricultura.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Miguel-Beltran-Garcia/publication/306378279_Microorganismos_endofitos_su_mundo_secreto_y_aplicaciones_en_la_agricultura/links/57bbc8ff08ae9fd82ef0edb/Microorganismos-endofitos-su-mundo-secreto-y-aplicaciones-en-la-agricultura.pdf)
- Carr, C. 2012. Aislamiento y selección de hongos antagonistas en plantaciones de banano (*Musa AAA*) para el combate biológico de la Sigatoka Negra. (En línea). Revisado el 9 de abril 2021. Disponible en:  
<https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/2779/Aislamiento%20y%20selecci%C3%B3n%20de%20hongos%20antagonistas%20en%20plantaciones%20de%20banano%20%28Musa%20AAA%29%20para%20el%20combate%20biol%C3%B3gico%20de%20la%20Sigatoka%20Negra.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Castillo, P.; Vovlas, N.; Subbotin, S.; Troccoli, A. 2003. A new root-knot nematode, *Meloidogyne baetica* n. sp. (Nematoda: Heteroderidae), parasitizing wild olive in Southern Spain. *Phytopathology* 93:1093-110.

- Condemarín, M.; Oyola, M.; Mialhe, E.; Quimi, M.; Astudillo, U.; Gutiérrez, C.; Barreto, C.; Túllume, P.; Duarte, P.; León, T. 2018. Efecto de bacterias nativas del suelo cultivado y prístino sobre el control del nematodo agallador radicular *Meloidogyne javanica*, en condiciones in vitro y producción de biomasa. *Arnaldoa* 25 (2): 515-528
- Dubois, T.; Coyne, D.; Kahangi, E.; Turoop, L.; Nsubuga, E. 2006. Endophyte enhanced banana tissue culture: technology transfer through public-private partnerships in Kenya and Uganda. *African Technology Development Forum Journal* 3: 18–24.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, IT). 2017. Foro Mundial Bananero, colección de buenas prácticas agrícolas. Producción de Banano Orgánicos en la República Dominicana. (En línea). Revisado el 9 de abril 2021. Disponible en: <http://www.fao.org/world-banana-forum/projects/good-practices/organic-production-dominican-republic/es/#.YPnyfehKjb0>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, IT). 2012. Los Mercados del Banano orgánico y de comercio justo de la República Dominicana: Evolución reciente y perspectivas. Programa Conjunto para el Fortalecimiento de la cadena de valor del Banano Mediante el Crecimiento de Mercados Inclusivos. Roma, Italia. 132p. (En línea). Revisado el 9 de abril 2021. Disponible en: [http://190.167.99.25/digital/mercados\\_banano.pdf](http://190.167.99.25/digital/mercados_banano.pdf)
- García, S.; Jiménez, R.; Rengifo, D.; Morel, M.; Moya, J. 2017. Aislamiento de hongos endofíticos (*Trichoderma* spp. y *Fusarium* spp.) de raíces en buen estado de plantas de plátanos (*Musa* AAB) en la Región Norcentral. *Revista APF. (SODIAF)*. Santo Domingo, DO. Volumen 6(2): 1-6. (En línea). Revisado el 9 de abril 2021. Disponible en: [http://www.sodiaf.org.do/revista/sodiaf/vol6\\_n2\\_2017/articulo/01%20articulo.pdf](http://www.sodiaf.org.do/revista/sodiaf/vol6_n2_2017/articulo/01%20articulo.pdf)
- Gowen, S.; Quénéhervé, P.; Fogain, R. 2005. Nematode parasites of bananas and plantains. En: *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. 2 ed. Edts. Luc, M., Sikora, R.A. y Bridge, J. CABI Publishing. Pp. 611-643
- Hunts Point Economic Development Corporation. 2009. Producto III: Estudio de mercado de productos agrícolas y agroindustriales en la Ciudad de Nueva York, E.U.A. En el marco del DRCAFTA. Pp. 83. (En línea). Revisado el 9 de abril 2021. Disponible en: <http://www.competitividad.org.do/wp-content/uploads/2009/04/estudio-demanda-en-nueva-york-y-oferta-dominicana.pdf>
- Marcano, I. 2014. Aislamiento y caracterización de bacterias de la rizosfera de banano (*Musa* sp.) en la República Dominicana y selección de cepas para el desarrollo de biofertilizantes (Doctoral dissertation, Universidad de León). (En línea). Revisado el 9 de abril 2021. Disponible en: [https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/4157/tesis\\_df447c.PDF?sequence=1&isAllowed=y](https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/4157/tesis_df447c.PDF?sequence=1&isAllowed=y)
- MA (Ministerio de Agricultura). 2020. Departamento de Economía Agropecuaria y Estadísticas. (En línea). Revisado el 9 de abril 2021. Disponible en: <http://agricultura.gob.do/category/estadisticas-agropecuarias/exportaciones-agropecuarias-2-exportaciones-agropecuarias-totales-y-por-producto/>
- Medina, F. 2016. Mecanismos de protección de *Trichoderma* sp. y patogenesis de *Fusarium oxysporum* en el Nardo (*Polianthes tuberosa*). Tesis: Maestro en Ciencias de la Floricultura. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco a. C. Guadalajara, Jalisco. 112 p. (En línea). Revisado el 9 de abril 2021. Disponible en: <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/373/1/Samuel%20Medina%20Fuentes.pdf>
- Meneses, A. 2003. Utilización de Hongos Endofíticos Provenientes de Banano Orgánico para el Control Biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* Cobb, Thorne. Tesis para optar por el título de Master en ciencias. CATIE. Turrialba, CR. 89 p. (En línea). Revisado el 9 de abril 2021. Disponible en: <http://orton.catie.ac.cr/REPDOC/A0119E/A0119E.PDF>

Paris, M. 2016. Diversidad y distribución de hongos endófitos en endemismos canarios. Trabajo de fin de grado. Universidad de la Laguna. Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias, sección Biología e Instituto de Productos Naturales (ipna csic). 36 p. (En línea). Revisado el 9 de abril 2021. Disponible en:

<https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/6750/Diversidad%20y%20distribucion%20de%20hongos%20endofitos%20en%20endemismos%20canarios.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Pocasangre, L.; Sikora, R.; Vilich, V.; Schuster, R. 2000. Encuesta sobre los hongos endofíticos del banano de América Central y el cribado para el control biológico del nematodo barrenador (*Radopholus similis*). La Revista Internacional sobre Banano y Plátano. Infomusa 1 (9): 3-5.

Riera, V. 2015. Caracterización molecular y de patogenicidad de *Colletotrichum spp.*, en bananas var Cavendish y pruebas de antagonismo con *Trichoderma spp.*, recolectadas en fincas bananeras de la región costa del Ecuador. Tesis: Ingeniería en Agroempresa. Universidad San Francisco de Quito, EC. 98 p. En línea). Revisado el 9 de abril 2021. Disponible en:

<https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/4461/1/121550.pdf>

Román, J. 1978. Fitonematología Tropical. Estación Experimental Agrícola, Universidad de Puerto Rico - Mayagüez. Río Piedras, PR. 256 p.

## Evaluación de la capacidad endófitica de cepas nativas de *Trichoderma* en plantas de tomate en casa malla

Marisol Morel<sup>1\*</sup>, Yency Castillo<sup>1</sup>, Socorro García<sup>1</sup>, Marianela Conce<sup>1</sup>, Juan de Dios Moya<sup>2</sup>, Teófila Reinoso<sup>3</sup>, Pedro Núñez<sup>4</sup> y Katherine Alonzo<sup>5</sup>

Investigadores del Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (Idiaf). <sup>1\*</sup> Investigador Líder, Coinvestigadores y <sup>5</sup> Asistente del proyecto "Evaluación de cepas nativas del hongo endófito *Trichoderma* spp. en el control de *Meloidogyne* spp. en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo ambiente protegido". <sup>1 y 2</sup> Estación Experimental Cacaotera Mata Larga, <sup>4</sup> Investigador Titular Idiaf, <sup>5</sup> Estudiante de término de Ingeniería Agronómica, Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD), \*Autor para correspondencia: [marisolmorel25@hotmail.com](mailto:marisolmorel25@hotmail.com)

### RESUMEN

Los hongos del género *Trichoderma* se consideran antagonistas de fitopatógenos, son utilizados en la agricultura por poseer potencial de biocontrol de plagas y enfermedades. Este género puede colonizar las plantas y crecer dentro de los tejidos sin ocasionarles daño. El objetivo de este estudio fue conocer la capacidad endófitica de 25 cepas nativas de *Trichoderma* en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*, L.). Se instalaron tres ensayos en casa malla en la Estación Experimental Cacaotera Mata Larga del Idiaf en San Francisco de Macorís, en el nordeste de la República Dominicana. Se utilizaron 25 cepas de *Trichoderma* (endófitas en plátano) y tomate de la variedad 'Floradade'. Las plántulas fueron trasplantadas en vasos foam en sustrato esterilizado de fibra de coco, enmienda orgánica y suelo, en proporción 1:1:1 v/v. El diseño experimental utilizado fue un completamente al azar, con cuatro repeticiones, la unidad experimental consistió en dos plántulas. A los 10 días del trasplante, las plantas se inocularon con las cepas de *Trichoderma* con  $1 \times 10^7$  esporas/planta. A los 30 días de aplicados los tratamientos, se extrajeron las plantas y se realizaron aislamientos de las raíces y diluciones seriadas del sustrato en PDA. A los 16 días del cultivo, se evaluó el porcentaje de colonización de las raíces y a los ocho días, la presencia de las cepas en el sustrato. Se realizó análisis de varianzas con un nivel de significancia del 5 %. El porcentaje de raíz colonizada presentó diferencias estadísticas y estuvo entre 0.0 y 80 %. De las 25 cepas de *Trichoderma*, 20 cepas resultaron endófitas en plántulas de tomate y las 25 estuvieron viables en el sustrato.

*Palabras claves:* Antagonistas, aislamientos, colonización, raíces, sustratos.

### ABSTRACT

The fungi of the genus *Trichoderma* are considered antagonists of phytopathogens, they are used in agriculture because they have potential for biocontrol of pests and diseases. This genus can colonize plants and grow within tissues without causing damage. The objective of this study was to know the endophytic capacity of 25 native strains of *Trichoderma* in the tomato crop (*Solanum lycopersicum*, L.). Three mesh house trials were installed at Idiaf's Mata Larga Cacaotera Experimental Station in San Francisco de Macorís, in the northeast of the Dominican Republic. 25 strains of *Trichoderma* (endophytes in banana) and tomato of the 'Floradade' variety will be used. The seedlings were transplanted into foam cups in sterilized coconut fiber substrate, organic amendment and soil, in a 1: 1: 1 v / v ratio. The experimental design used was a completely randomized one, with four repetitions, the experimental unit consisted of two seedlings. 10 days after transplantation, the plants were inoculated with the *Trichoderma* strains with  $1 \times 10^7$  spores / plant. 30 days after the treatments were applied, the plants were extracted and root isolates and serial dilutions of the

substrate were made in PDA. At 16 days of cultivation, the percentage of colonization of the roots was evaluated and at eight days, the presence of the strains in the substrate. An analysis of variances was performed with a significance level of 5%. The percentage of colonized root presented statistical differences and was between 0.0 and 80%. Of the 25 *Trichoderma* strains, 20 strains were endophytes in tomato seedlings and 25 were viable in the substrate.

*Keywords: Antagonists, isolates, colonization, roots, substrates*

## INTRODUCCIÓN

Los hongos del género *Trichoderma* se consideran antagonistas naturales de fitopatógenos, son ampliamente utilizados en la agricultura por su potencial de biocontrol de plagas y enfermedades, León-Ttacca *et al.* (2018). Diferentes estudios han demostrado la efectividad de cepas de *Trichoderma* endófitas controlando patógenos y promoviendo el desarrollo en el cultivo de tomate, Sundaramoorthy y Balabaskar (2013), Barari (2016) y You *et al.* (2016). Los hongos endófitos pueden colonizar la planta y crecer dentro de los tejidos sin ocasionarles daño, Corredor-Perilla *et al.* (2007). Esta colonización puede ocurrir en las hojas, tallos, ramas y raíces, y envuelve intercambios metabólicos entre el endófito y el hospedero, Gómez-Vidal *et al.* (2006). Según Paris (2016) la raíz es el órgano donde se encuentra la mayor presencia de colonización endófitas.

Los hongos endófitos ayudan a reducir los efectos de los patógenos mediante la inducción de resistencia a la planta, la estimulación de producción de metabolitos secundarios e incremento del crecimiento, Flores-Pacheco (2017). *Trichoderma* spp. es uno de los más estudiados, debido a que está ampliamente distribuido y se encuentra de manera natural en diferentes ambientes, especialmente en presencia de materia orgánica o residuos vegetales en descomposición. Además, es capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas, Martínez *et al.* (2013). Muchas especies de este género pueden parasitar e inhibir otros hongos mediante la producción de micotoxinas y enzimas como la glucanasa y quitinasa, Howel (2003). Por lo que, estas acciones y mecanismos de *Trichoderma* pueden favorecer el proceso de adaptación de las plantas a diversas condiciones ambientales y sustratos, Martínez *et al.* (2013).

A pesar de que los hongos endófitos se pueden aislar con facilidad, muchos son específicos de un cultivo. Para asegurar que un hongo sea endófito de un cultivo, este debe crecer en el interior de la planta sin causar daño, Corredor-Perilla *et al.* (2007). Entre las técnicas utilizadas para comprobarlo, se encuentra el reaislamiento del hongo desde la planta luego de su inoculación, Russo *et al.* (2015) y Russo *et al.* (2018,).

En la República Dominicana, se han aislados hongos del género *Trichoderma* de tejido sanos de plátano (*Musa* AAB y *Musa* AAAB) (García *et al.* 2016) y de suelos, sustratos y raíces de plantas cultivadas en invernaderos de las provincias La Vega, San José de Ocoa y Espaillat (Moya *et al.* 2014). Las cepas de *Trichoderma* utilizadas en este estudio fueron aisladas de tejido sano de plantas de plátano y son consideradas endófitas de este cultivo; sin embargo, se desconocía si eran endófitas en plantas de tomate, por esta razón, este estudio tuvo como objetivo evaluar a nivel de



casa malla la capacidad endófito en plantas de tomate de 25 cepas nativas de *Trichoderma* spp. aisladas de raíces de plátano, García *et al.* (2016).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización de los experimentos

Los experimentos fueron realizados desde enero hasta agosto del 2020, dentro del proyecto “Evaluación de cepas nativas del hongo endófito *Trichoderma* spp. en el control de *Meloidogyne* spp. en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo ambiente protegido”. Se instalaron tres ensayos en casa malla en la Estación Experimental Cacaotera Mata Larga del Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (Idiaf), en San Francisco de Macorís, provincia Duarte, en el nordeste de la República Dominicana.

### Cepas de *Trichoderma* spp

Se utilizaron 25 cepas endófitas nativas de *Trichoderma* spp. aisladas de raíces de plátano, de las variedades Macho por Hembra Intermedio (MxHI) (AAB) y FHIA-21 (AAAB), Tabla 1. Las cepas fueron obtenidas del proyecto internacional “Mejoramiento de la Calidad de Vida de Comunidades Rurales en Cuatro Países de América Latina y el Caribe, a través de Innovaciones Tecnológicas en Producción, Procesamiento Agroindustrial y Mercadeo del Plátano (FTG-7010/07)”, con financiamiento del Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria (Fontagro). Estas cepas se encuentran conservadas en el Laboratorio de Protección Vegetal de la Estación Experimental Cacaotera Mata Larga.

Tabla1. Cepas nativas de *Trichoderma*, endófitas en plátano, utilizadas en los experimentos.

Cepa	Procedencia	
	Productor	Localidad
PJ-1	Porfirio Jiménez	Sabana, Los Jiménez, Moca.
PJ-2		
PJ-3		
PJ-4		
PJ-5		
PJ-6		
PJ-7		
VA-8	Víctor Abreu	Las Uvas, Moca
VA-9		
VA-10		
VA-11		
VA-12		
VA-13		
VA-14		
VA-15		

NT-16		
NT-17	Nando Tejada	Salcedo
NT-18		
AL-19		
AL-20	Antonio López,	El Aguacate, Moca
AL-21		
MH-22	Mario Hidalgo	Benguete, La Vega
MH-23		
IV-24	Ideli Veras	Villa Tapia
FV-25	Freddy Veras	Villa Tapia

Las cepas de *Trichoderma* fueron reactivadas mediante enfrentamiento dual con el hongo fitopatógeno virulento, *Fusarium* sp, en medio de cultivo PDA (papa-dextrosa agar) en plato Petri. Se incubaron por 7 días a  $28 \pm 2$  °C. Luego se multiplicaron en platos de Petri desechables con 10 ml de medio de cultivo PDA. Se incubaron a  $28 \pm 2$  °C por un periodo de 8 a 10 días. Transcurrido este tiempo, a cada plato se le aplicó 25 ml de agua esterilizada y se realizó un raspado para la obtención de conidios.

### Plantas de tomate

Se utilizaron semillas de tomate de mesa de la variedad 'Floradade'. Estas fueron sembradas en bandejas de germinación en sustrato a base de fibra de coco, enmienda orgánica y suelo, mezclados en proporción 1:1:1 (v/v) siguiendo la metodología de Russo *et al.* (2015) modificada. El sustrato fue esterilizado dos veces en autoclave durante 20 minutos a 121 °C., y se dejó transcurrir 24 horas entre la primera y segunda esterilización. Entre 28 y 30 días después de la germinación, las plántulas fueron trasplantadas en vasos foam de 500 ml de capacidad con el mismo sustrato esterilizado utilizado en la germinación de las semillas. Las plántulas trasplantadas fueron colocadas sobre mesas metálicas en casa malla, Figura 1.



**Figura 1.** Plántulas de tomate sobre mesas metálica. Foto Marisol Morel

## Diseño experimental y tratamientos

En cada experimento se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DCA), con cuatro repeticiones y la unidad experimental consistió en dos plantas. Los tratamientos estuvieron conformados por cada una de las cepas de *Trichoderma*, más un testigo absoluto, sin inoculación.

## Establecimiento de los experimentos

En el primer experimento se evaluaron diez cepas de *Trichoderma* (Tabla 2) y en el segundo, siete (Tabla 3) y en el tercero, ocho (Tabla 4). Cada uno de los experimentos tuvo una duración de cuatro semanas (un mes) a partir de la aplicación de los tratamientos. El primer experimento se instaló el 13 de enero, el segundo el 4 de marzo y el tercero el 4 de Junio del 2020.

Tabla.2. Cepas de *Trichoderma* evaluadas en los tratamientos del primer experimento en casa malla

Tratamiento	Descripción
T0	Testigo absoluto, sin inoculante
T1	<i>Trichoderma</i> cepa PJ-1
T2	<i>Trichoderma</i> cepa PJ-2
T3	<i>Trichoderma</i> cepa PJ-3
T4	<i>Trichoderma</i> cepa PJ-4
T5	<i>Trichoderma</i> cepa PJ-5
T6	<i>Trichoderma</i> cepa PJ-6
T7	<i>Trichoderma</i> cepa PJ-7
T8	<i>Trichoderma</i> cepa VA-8
T9	<i>Trichoderma</i> cepa VA-9
T10	<i>Trichoderma</i> cepa VA-10

Tabla.3. Cepas de *Trichoderma* evaluadas en los tratamientos del segundo experimento en casa malla

Tratamiento	Descripción
T0	Testigo absoluto, sin inoculante
T1	<i>Trichoderma</i> cepa VA-11
T2	<i>Trichoderma</i> cepa VA-12
T3	<i>Trichoderma</i> cepa VA-13
T4	<i>Trichoderma</i> cepa VA-14
T5	<i>Trichoderma</i> cepa VA-15
T6	<i>Trichoderma</i> cepa NT-16
T7	<i>Trichoderma</i> cepa NT-17

Tabla.4. Cepas de *Trichoderma* evaluadas en los tratamientos del tercer experimento en casa malla

Tratamiento	Descripción
T0	Testigo absoluto, sin inoculante
T1	<i>Trichoderma</i> cepa NT-18
T2	<i>Trichoderma</i> cepa AL-19
T3	<i>Trichoderma</i> cepa AL-20
T4	<i>Trichoderma</i> cepa AL-21
T5	<i>Trichoderma</i> cepa MH-22
T6	<i>Trichoderma</i> cepa MH-23
T7	<i>Trichoderma</i> cepa IV-24
T8	<i>Trichoderma</i> cepa FV-25

A los 10 días después del trasplante, las plántulas se inocularon en el sistema radicular (Figura 2) con la cepa de *Trichoderma* correspondiente, en una concentración de  $1 \times 10^7$  esporas/planta.



**Figura 2.** Inoculación de *Trichoderma* en el sistema radicular de plántulas de tomate.  
Foto Marisol Morel

Durante el desarrollo del primer experimento, dentro de la casa malla se registraron temperaturas ambientales de 26 a 38 °C, en el segundo ensayo se registraron temperaturas de 24.3 a 36 °C., y en el tercero 26.6 a 38.4 °C.

## Manejo de los experimentos

En los primeros días de instalados los experimentos, se aplicó riego tipo drench, 50 ml interdiario y luego según requerimiento del cultivo. Se realizó una aplicación de fertilizantes Plamtar Nitrógeno 26-6-14 + 6 (S) y Plamtar Fósforo 14-37-10 + 4 (S) en forma de drench. También, se realizaron aplicaciones del insecticida sistémico Engeo® 24.7 SC para el control de mosca blanca. A los 30 días de aplicados los tratamientos, se hizo la extracción de las plantas de los vasos foam y se realizaron aislamientos de las raíces y diluciones seriadas del sustrato en medio de cultivo PDA.

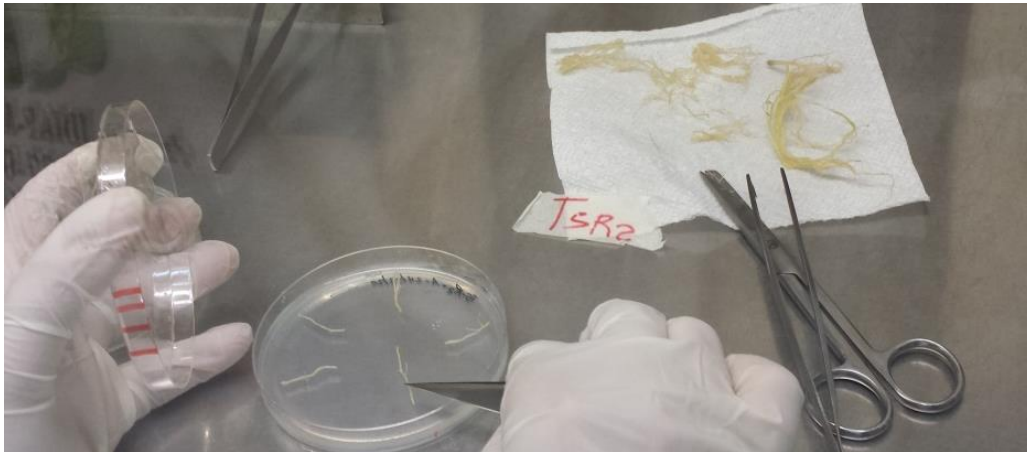
## Procesamiento de las muestras de raíces y del sustrato

Para determinar la presencia de las cepas de *Trichoderma* inoculadas en los experimentos, se realizaron siembras del tejido radicular de las plantas y diluciones seriadas del sustrato. Para el procesamiento de las raíces se utilizó la metodología de Russo *et al.* (2018) modificada. Las raíces se desinfectaron en etanol al 70 % por 15 segundos, luego en hipoclorito de sodio al 1.5 % durante 3 minutos y nuevamente en etanol 70 % por 15 segundos, seguido de tres lavados en agua destilada estéril, Figura 3. Posteriormente, para su secado se colocaron en papel absorbente estéril. En los tres experimentos se utilizó la misma metodología de procesamientos de las muestras.



**Figura 3.** Desinfección de raíces de tomate para aislamiento de *Trichoderma* endófito  
Foto Nélsida Martínez

Las raíces fueron cortadas en trozos de aproximadamente 5 a 10 mm de largo, los cuales se cultivaron en placas Petri conteniendo medio de cultivo PDA sintético, 3.9 g/l más cloranfenicol. Se colocaron cinco trozos del tejido radical (raíces) por placa. y se utilizaron dos placas por tratamiento (cepa de *Trichoderma*). Las placas Petri se incubaron a 25 °C. durante 16 días.



**Figura 4.** Siembras de raíces de tomates en medio de cultivo PDA en placas de Petri.  
Foto Nélsida Martínez

Para determinar la presencia de *Trichoderma* en el sustrato, se utilizaron las metodologías descritas por Castillo (2016) y Acuña y Peña (2005). Se utilizó medio de cultivo PDA sintético, 39 g/l más amoxicilina. Las muestras se homogeneizaron y se pesaron 10 g/muestra, las cuales se diluyeron en frasco conteniendo 90 ml de agua esterilizada. De esta dilución, se prepararon diluciones seriadas hasta  $10^{-3}$ , las muestras se incubaron a 25 °C. durante ocho días.

### **Variables evaluadas**

Se evaluó el porcentaje de colonización o frecuencia de colonización (FC) de las raíces de tomate por las cepas de *Trichoderma* spp., a los 16 días de las raíces ser sembradas en medio de cultivo PDA. Se utilizó la fórmula de Petrini y Fisher (1986), donde:  $FC = (\text{Número de piezas de planta colonizadas} / \text{total de piezas examinadas}) * 100$ . Adicionalmente, se evaluó la presencia de las cepas en el sustrato a los 8 días del cultivo en PDA.

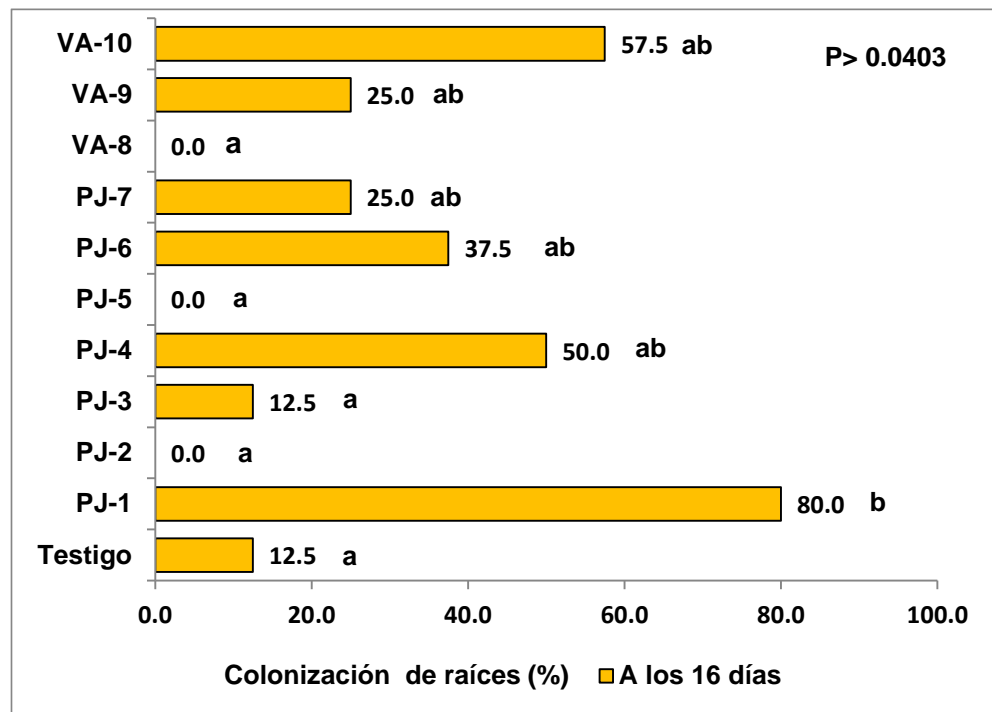
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Análisis de datos**

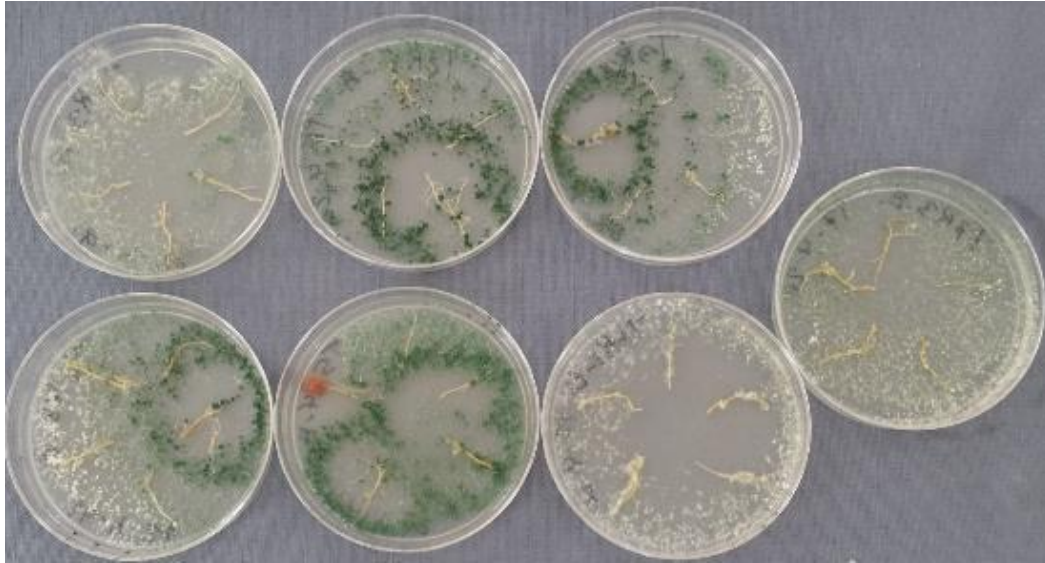
Los datos del primer experimento fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis, debido a que estos no cumplieron con el supuesto de homogeneidad de varianza. Mientras que en el segundo y tercero, los datos cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, por tanto fueron sometidos a análisis de varianza y a la prueba de separación de media de Tukey al 5%, cuando el análisis de varianza mostró diferencias significativas. Estos análisis se realizaron con el programa estadístico InfoStat® (versión 2011, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

## Porcentaje de raíces colonizadas en el primer experimento

En el primer experimento, de las diez cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas, siete resultaron endófitas en tomate: PJ-1, PJ-3, PJ-4, PJ-6, PJ-7, VA-9 y VA-10. El porcentaje de raíces colonizadas por las cepas de *Trichoderma* presentó diferencias estadísticas significativas, y estuvo entre 0.0 y 80 %, Figura 5. La cepa PJ-1 (T1) presentó el porcentaje más alto de raíces colonizadas, con un 80 %. Li *et al.* (2012) obtuvo resultados superiores en tallos de seis especies de plantas, en donde el nivel de colonización de los hongos endófitos fue del 82 % en promedio. En el tratamiento testigo se presentó un porcentaje de colonización de 12.5 %; éste probablemente se contaminó con alguna de las cepas de *Trichoderma* durante el manejo del experimento. Mujica *et al* (2010) también reportan colonización radical en el tratamiento testigo, en un ensayo aplicando dos cepas de hongos micorrícicos en el cultivo de tomate; a los 30 y 55 días después del trasplante, en el testigo se observaron valores de 30-40 % de colonización radical. En la Figura 6, se muestran raíces de tomate colonizadas por *Trichoderma*



**Figura 5.** Promedio de colonización de raíces de tomate por las cepas de *Trichoderma* en el primer experimento

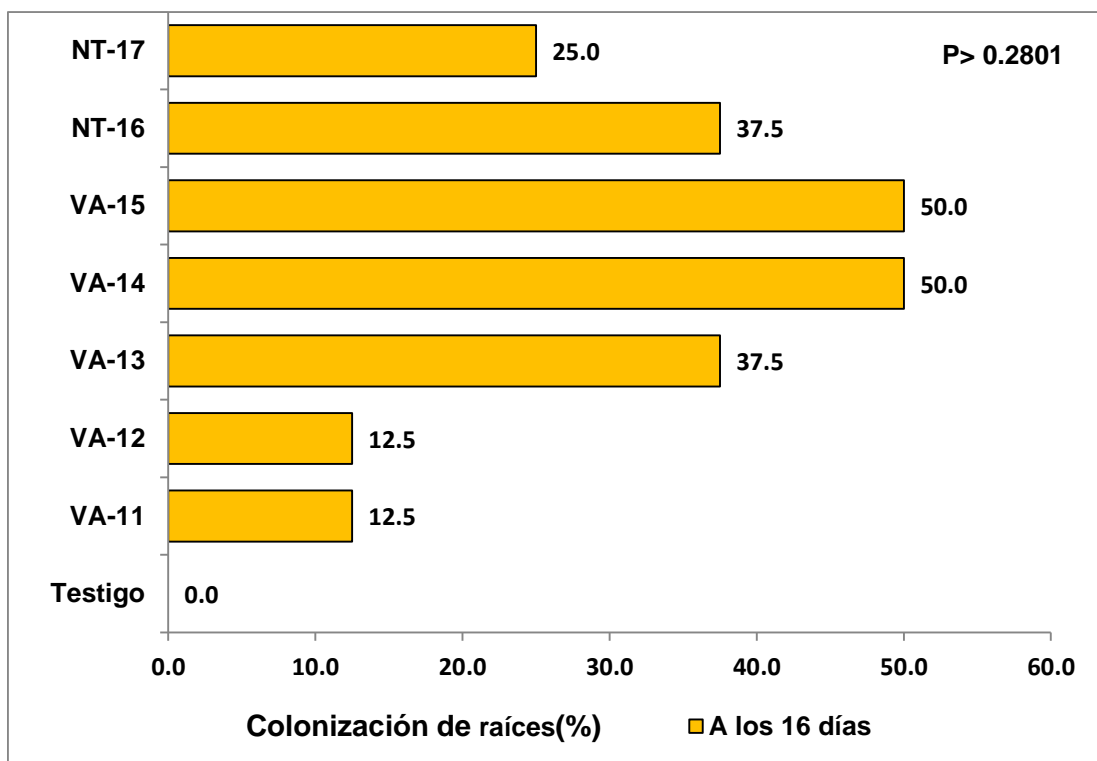


**Figura 6.** Raíces de tomate colonizadas por *Trichoderma* spp. en platos Petri.  
Foto Marisol Morel

### Porcentaje de raíces colonizadas en el segundo experimento

El porcentaje de raíces colonizadas por las cepas de *Trichoderma*) no mostró diferencias estadísticas significativas, Figura 7. En este ensayo las siete cepas de *Trichoderma* colonizaron las raíces de las plántulas de tomates. González (2018), evaluando a los 28 y 45 días el efecto de *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* y hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), reportó que la aplicación de los microorganismos a la semilla y al sustrato favorece la colonización de las raíces de las plántulas. Por otro lado, Medina (2016) reportó la colonización de 10 aislamientos de *Trichoderma* en plantas de nardo (*Polianthes tuberosa*). De igual forma, León-Ttacca *et al.* (2018), evaluando el porcentaje de colonización endófitas de 10 cepas de *Trichoderma* en el cultivo de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.), reportaron que las diez cepas colonizaron las plantas de quinua.

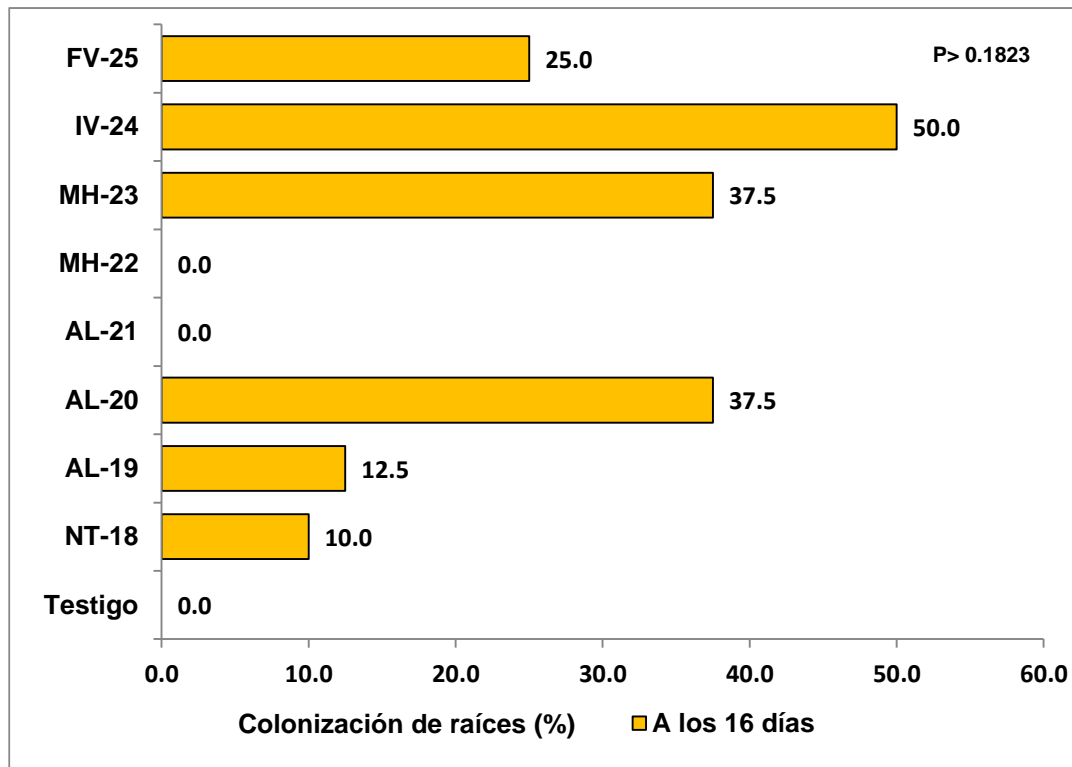




**Figura 7.** Promedio de colonización de raíces de tomate por las cepas de *Trichoderma* en el segundo experimento

### Porcentaje de raíces colonizadas en el tercer experimento

El porcentaje de raíces colonizadas por las cepas de *Trichoderma* en este experimento no presentó diferencias estadísticas significativas. De las ocho cepas de *Trichoderma* spp. evaluadas, se determinó que seis colonizaron las raíces de tomate: NT-18, AL-19, AL-20, MH-23, IV-24 y FV-25 (Figura 8). Las cepas MH-22 y AI-21 no colonizaron las raíces del tomate.



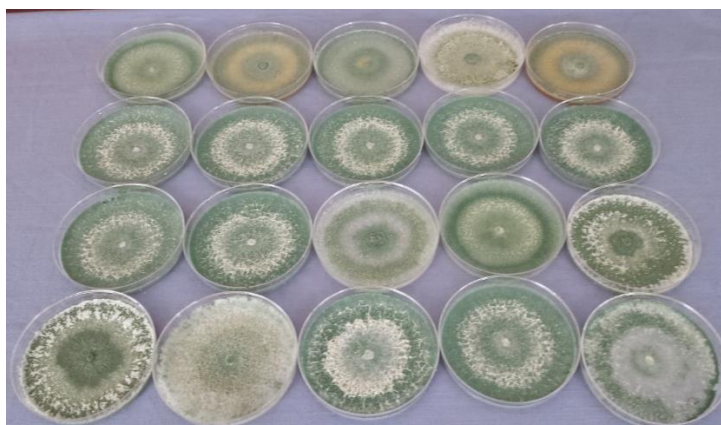
**Figura 8.** Promedio de colonización de raíces de tomate por las cepas de *Trichoderma* en el tercer experimento

En los tratamientos con las cepas AL-21 y MH-22, que resultaron no endófitas, se presentaron síntomas de marchitez, estrangulamientos en la base del tallo y mortalidad de algunas plántulas, siendo identificado como agente causal el hongo *Fusarium* sp. Aunque este patógeno fue aislado en otros tratamientos, aparentemente al estar esos tratamientos colonizados por las cepas de *Trichoderma* spp., no presentaron los síntomas de la enfermedad. Esto confirma lo planteado por Companioni-Gonzalez *et al.* (2019) sobre los múltiples beneficios que aporta el uso de *Trichoderma* como controlador biológico en los cultivos. También, confirma lo reportado por Martínez-Scott (2016), evaluando aislados nativos de *Trichoderma* sp en el control de hongos fitopatógenos del suelo en tomate, en donde plantas inoculadas con los aislados de *Trichoderma* no presentaron síntomas de enfermedad.

De las 25 cepas de *Trichoderma* evaluadas en los tres experimentos, se determinó que 20 cepas resultaron ser endófitas en plántulas de tomate a los 30 días de haber sido inoculadas en el sistema radicular. Estas cepas se encuentran conservadas en glicerol al 30 % y están identificadas molecularmente, Tabla 5, Figura 9.

Tabla 5. Capacidad endófitas de 20 cepas nativas de *Trichoderma* spp. en el sistema radicular del cultivo de tomate

Códigos de experimentos	Cepa identificadas	Capacidad endófitas (%)
PJ-1	<i>Trichoderma afroharzianum</i>	80
PJ-3	<i>Trichoderma harzianum</i>	12.5
PJ-4	<i>Trichoderma harzianum</i>	50
PJ-6	<i>Trichoderma cf. harzianum</i>	37.5
PJ-7	<i>Trichoderma harzianum</i>	25
VA-9	<i>Trichoderma asperellum</i>	25
VA-10	<i>Trichoderma asperellum</i>	57.5
VA-11	<i>Trichoderma</i> sp.	12.5
VA-12	<i>Trichoderma asperellum</i>	12.5
VA-13	<i>Trichoderma asperellum</i>	37.5
VA-14	<i>Trichoderma</i> sp.	50
VA-15	<i>Trichoderma</i> sp.	50
NT-16	<i>Trichoderma</i> sp.	37.5
NT-17	<i>Trichoderma</i> sp.	25
NT-18	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	10
AL-19	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	12.5
AL-20	<i>Trichoderma harzianum</i>	37.5
MH-23	<i>Trichoderma asperellum</i>	37.5
IV-24	<i>Trichoderma</i> sp.	50
FV-25	<i>Trichoderma</i> sp.	25



**Figura 9.** Cepas de *Trichoderma* spp endófitas en tomate, de izquierda a derecha: A) PJ-1, PJ-3, PJ-4, PJ-6 y PJ-7: B) VA-9, VA-10, VA-11, VA-12 y VA-13: C) VA-14, VA-15, NT-16, NT-17 y NT-18: D) AL-19, AL-20, MH-23, IV-24 y FV-25.

Foto: Marisol Morel

## Presencia de las cepas de *Trichoderma* en el sustrato

En los tres ensayos las 25 las cepas de *Trichoderma* estuvieron viables en el sustrato a los 30 días de inoculadas. Resultados similares obtuvo Morel (2016) evaluando cepas nativas de *Trichoderma* spp., en el control de *Fusarium solani* en tomate bajo ambiente protegido, recuperando tres cepas de *Trichoderma*, de cuatro inoculadas a los 40 días.

## CONCLUSIONES

El 80 % (20 de 25) de las cepas de *Trichoderma* evaluadas, aisladas del sistema radicular de plátano, presentó capacidad endófitas en plantas de tomate al colonizar el interior de sus raíces.

La capacidad endófitas de las cepas de *Trichoderma* estuvo entre 12.5 y 80 % de las raíces de tomate.

Cepas de *Trichoderma* aisladas de los tejidos internos de un cultivo pueden colonizar y establecerse en los tejidos internos de otro cultivo.

Las cepas de *Trichoderma* que resultaron endófitas en tomate podrían ser utilizadas para el control biológico de enfermedades en el cultivo de tomate.

## AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Educación Superior Ciencia y Tecnología ([Mescyt](#)), a través del Fondo Nacional de Innovación y Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondocyt) por el financiamiento del proyecto “Evaluación de cepas nativas del hongo endófito *Trichoderma* spp. en el control de *Meloidogyne* spp. en tomate (*Solanum lycopersicum*, L.) bajo ambiente protegido”

Al señor Welinton Antonio Cuello, por su colaboración en todo el proceso de los experimentos y en los trabajos de evaluación final, y también, a la ingeniero agrónomo Nelsida Martínez por su colaboración en los trabajos de evaluación final de los experimentos.

## LITERATURA CITADA

Acuña, O.; Peña, W. 2005. Determinación de poblaciones de microorganismos en el suelo mediante técnicas de recuento directo. En: Protocolos de metodologías para análisis de indicadores microbiológicos. Proyecto Innovaciones tecnológicas para el manejo y mejoramiento de la calidad y salud de suelos bananeros en América Latina y el Caribe. Eds. Imbap, Universidad de Costa Rica. San José, CR. Pp 4-7.

Barari, H. 2016. Biocontrol of tomato *Fusarium* wilt by *Trichoderma* species under *in vitro* and *in vivo* conditions. *Cercetari Agronomice in Moldova*, 49(1): 91-98.

- Castillo, Y. 2016. Prácticas Alternas para el Manejo de Nematodos Fitoparásitos en Plátano (*Musa acuminata* X *Musa balbisiana*, AAB): Efecto sobre la Actividad Microbiológica del Suelo. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico. Mayagüez, PR. 125 pp. (En línea). Revisado el 27 de marzo 2021. Disponible en: [https://scholar.uprm.edu/bitstream/handle/20.500.11801/1207/PROC\\_ConceConceM\\_2016.pdf?sequence=1&isAllowed=n](https://scholar.uprm.edu/bitstream/handle/20.500.11801/1207/PROC_ConceConceM_2016.pdf?sequence=1&isAllowed=n)
- Campanioni-González, B.; Domínguez, A.; García, V. 2019. *Trichoderma*: su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura. *Biotecnología Vegetal* 19(4): 237–248. (En línea). Revisado el 27 de marzo 2021. Disponible en: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/639/html>
- Corredor-Perilla, I.; Cepero, M.; Restrepo, S. 2007. Evaluación de la susceptibilidad de hongos endófitos aislados de rosa (*Rosa híbrida*) a fungicidas comerciales. *Revista Colombiana de Biotecnología* 9(1): 59-71.
- Flores-Pacheco, J. 2017. Antagonismo *in vitro* de hongos endófitos para su uso en el biocontrol de enfermedades forestales. *Revista Científica de FAREM-Estelí*, (23): 58-71.
- García, S.; Jiménez, R.; Rengifo, D.; Morel, M.; Moya, J. 2017. Aislamiento de hongos endofíticos (*Trichoderma* spp. y *Fusarium* spp.) de raíces en buen estado de plantas de plátanos (*Musa* AAB) en la Región Norcentral. *Revista APF*. (SODIAF). Santo Domingo, DO. Volumen 6(2): 1-6. (En línea). Revisado el 27 de marzo 2021. Disponible en: [http://www.sodiaf.org.do/revista/sodiaf/vol6\\_n2\\_2017/articulo/01%20articulo.pdf](http://www.sodiaf.org.do/revista/sodiaf/vol6_n2_2017/articulo/01%20articulo.pdf)
- Gómez-Vidal, S.; Lopez-Llorca, L.; Jansson, H.; Salinas, J. 2006. Endophytic colonization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) leaves by entomopathogenic fungi. *Micron*, 37(7): 624-632. (En línea). Revisado el 27 de marzo 2021. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Hans-Boerje-Jansson/publication/7198844\\_Endophytic\\_colonization\\_of\\_date\\_palm\\_Phoenix\\_dactylifera\\_L\\_leaves\\_by\\_entomopathogenic\\_fungi/link/s/5a6891a8a6fdcc03e0787d9c/Endophytic-colonization-of-date-palm-Phoenix-dactylifera-L-leaves-by-entomopathogenic-fungi.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Hans-Boerje-Jansson/publication/7198844_Endophytic_colonization_of_date_palm_Phoenix_dactylifera_L_leaves_by_entomopathogenic_fungi/link/s/5a6891a8a6fdcc03e0787d9c/Endophytic-colonization-of-date-palm-Phoenix-dactylifera-L-leaves-by-entomopathogenic-fungi.pdf)
- González, W. 2018. Efecto de la aplicación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en la producción de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Tesis: Maestra en Ciencias en Horticultura Tropical. Conkal, Yucatán, MX. 60 p. (En línea). Revisado el 27 de marzo 2021. Disponible en: [http://www.itconkal.edu.mx/images/POSGRADO\\_NEW/GEN\\_2016-2018/Ligia%20Paola%20Gonz%C3%A1lez%20Wilches.pdf](http://www.itconkal.edu.mx/images/POSGRADO_NEW/GEN_2016-2018/Ligia%20Paola%20Gonz%C3%A1lez%20Wilches.pdf)
- Howell, C. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant disease*, 87(1): 4-10. (En línea). Revisado el 27 de marzo 2021. Disponible en: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.2003.87.1.4>
- Landa, B.; López-Díaz, C.; Jiménez-Fernández, D.; Montes-Borrego, M.; Muñoz-Ledesma, F.; Ortiz-Urquiza, A.; Quesada-Moraga, E. 2013. In-plant detection and monitorization of endophytic colonization by a *Beauveria bassiana* strain using a new-developed nested and quantitative PCR-based assay and confocal laser scanning microscopy. *Journal of invertebrate pathology* 114(2):128-138.
- Leon-Ttacca, B.; Ortiz, N.; Condori, N.; Chura, E. 2018. Cepas de *Trichoderma* con capacidad endofítica sobre el control del mildiu (*Peronospora variabilis* Gäum.) y mejora del rendimiento de quinua. *Revista de Investigaciones Altoandinas* 20(1): 19-30.
- Li, H.; Li, D.; He, C.; Zhou, Z.; Mei, T.; Xu, H. 2012. Diversidad y tolerancia a metales pesados de hongos endofíticos de seis especies de plantas dominantes en un terreno baldío de una mina de Pb-Zn en China. *Fungal Ecology* 5 (3): 309-315.
- Martínez, B.; Infante, D.; Reyes, Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal* 28(1): 1-11.

- Martínez-Scott, M. 2016. Evaluación de aislados nativos de *Trichoderma* sp para el control de hongos fitopatógenos del suelo en tomate. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*. 3(6): 32-42.
- Medina, F. 2016. Mecanismos de protección de *Trichoderma* sp. y patogénesis de *Fusarium oxysporum* en el Nardo (*Polianthes tuberosa*). Tesis: Maestro en Ciencias de la Floricultura. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco a. C. Guadalajara, Jalisco. MX. 97 p.
- Morel, M. 2016. Adaptación de cepas nativas de *Trichoderma* spp. a sustratos orgánicos para el control de *Fusarium solani* (Mart.) en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo ambiente protegido. Tesis de cuarto nivel para optar por el título en Ciencias en Manejo Integrado de Plagas. Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD). 99 p.
- Moya, J.; García, S.; Avilés, E.; Andújar, F.; Núñez, P. 2014. Aislamiento de cepas de *Trichoderma* de suelos, sustratos y raíces de plantas en invernaderos en la República Dominicana. *Revista APF* 3(2): 11-16.
- Mujica, P.; Noval, B.; Dell, A. 2010. Respuesta del cultivo de tomate a la aplicación de dos inoculantes de hongos micorrízicos arbusculares por vías diferentes de inoculación. *Agronomía Tropical*, 60(4): 381-388. (En línea). Revisado el 27 de marzo 2021. Disponible en: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0002-192X2010000400008&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2010000400008&lng=es&tlng=es).
- Petrini, O.; Fisher, P. 1986. Fungal endophytes in *Salicornia perennis*. *Transactions of the British Mycological Society*, 87(4): 647-651.
- Paris, M. 2016. Diversidad y distribución de hongos endófitos en endemismos canarios. Trabajo de fin de grado. Universidad de la Laguna. Departamento de botánica, ecología y fisiología vegetal de la facultad de ciencias sección biología e instituto de productos naturales (ipna csic). 36 p.
- Russo, M.; Pelizza, S.; Cabello, M.; Stenglein, S.; Scorsetti, A. 2015. Endophytic colonisation of tobacco, corn, wheat and soybeans by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* (Ascomycota, Hypocreales). *Biocontrol Science and Technology*, 25(4): 475-480, DOI: 10.1080/09583157.2014.
- Russo, M.; Pelizza, S.; Vianna, M.; Allegrucci, N.; Cabello, M.; Toledo, A.; Scorsetti, A. 2018. Effect of endophytic entomopathogenic fungi on soybean *Glycine max* (L.) Merr. growth and yield. *Journal of King Saud University-Science*. Article in press.
- Sundaramoorthy, S.; Balabaskar, P. 2013. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* spp. against wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Journal of Applied Biology and Biotechnology* 1(3): 36-40.
- You, J.; Zhang, J.; Wu, M.; Yang, L.; Chen, W.; Li, G. 2016. Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato. *Biological Control*, 101: 31-38.

## Caracterización de micorrizas autóctonas en suelos y raíces provenientes de pasturas en Santiago Rodríguez, República Dominicana

Birmania Wagner<sup>1\*</sup>, Elfrida Pimentel<sup>2a</sup>, Iris Marcano<sup>2b</sup>, Adriana Bueno<sup>2a</sup>, Abigail Salazar<sup>3</sup>, Chery Merari<sup>3</sup> y Pedro Núñez<sup>4</sup>

<sup>1\*</sup>Coinvestigadora del proyecto del Fondo Nacional de Innovación y Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondocyt). "Producción de un biofertilizante con cepas autóctonas de micorrizas como alternativa para mejorar las pasturas en la ganadería de la línea noroeste". Docente Facultad de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD). <sup>2</sup>Coinvestigadores. Docentes de la aFacultad de Ciencias Escuela de Microbiología y de la bFacultad de Ciencias Agronómicas y Veterinarias. Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD). <sup>3</sup>Graduados de ingenieros agrónomos de la Escuela de Ingeniería Agronómica de la Facultad de Ciencias Agronómicas y Veterinarias. Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD). <sup>4</sup>Investigador y líder del proyecto del Fondocyt. "Producción de un biofertilizante con cepas autóctonas de micorrizas como alternativa para mejorar las pasturas en la ganadería de la Línea Noroeste". Docente cátedra de suelos en la Facultad de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD) e investigador Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA-UASD). Investigador titular del Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (Idiaf).

\*Autor para correspondencia: birmanawagner@yahoo.com

### RESUMEN

En este estudio se determinó el potencial de las micorrizas presentes en pasturas de suelos provenientes de diferentes localidades de la provincia de Santiago Rodríguez, en el noroeste de la República Dominicana, donde se encontró la presencia de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en plantas. Se reporta un promedio de esporas más alto en las muestras de suelo 4, 10 y 6 con 23, 15 y 13 %, respectivamente, y en las muestras 7 y 3 un porcentaje menor correspondiente a un 4%, respectivamente. Se determinó las tinciones de raíces y se visualizaron estructuras fúngicas de los diferentes tipos de hongos observados de HMA, donde se observaron células corticales con arbusculos, hifas y esporas germinadas dentro de la raíz. Mediante los estudios fenotípicos, se identificaron tres especies pertenecientes al género *Glomus* específicamente. *G. fasciculatum*, *G. geosporum* y *G. deserticola* en las localidades evaluadas. En la técnica molecular de PCR y ADNr 18S se encontró resultados positivos de PCR obtenidos muestras de esporas del suelo para *phyllum Glomeromycota* en la amplificación de una región del gen 18S ribosomal de espóra procedentes de las muestras 4, 5 y 6. En la muestra 11, se observó en raíces una zona de amplificación para el género *Glomus* sp., entre 150-100 bp. La información generada permitirá el uso de estas micorrizas autóctonas en la formulación de un fertilizante para aumentar la sustentabilidad de los sistemas ganaderos de la línea noroeste.

*Palabras claves:* Hongos, esporas, micorrizas, arbusculares.

### ABSTRACT

In this study, was determined the potential of mycorrhizae present in soil pastures from different localities of the Santiago Rodríguez province, in the northwest of the Dominican Republic, where the presence of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) was found in plants. A higher average of spores is reported in soil samples 4, 10 and 6 with 23, 15 and 13%, respectively, and in samples 7 and 3 a lower percentage corresponding to 4%, respectively. Root staining was determined and fungal structures of the different types of fungi observed from AMF were

visualized, where cortical cells with arbuscules, hyphae and germinated spores within the root were observed. Through phenotypic studies, three species belonging to the genus *Glomus* were specifically identified. *G. fasciculatum*, *G. geosporum* and *G. deserticola* in the evaluated localities. In the molecular technique of PCR and 18S rDNA, positive results of PCR obtained from soil spore samples for phylum Glomeromycota were found in the amplification of a region of the spore ribosomal 18S gene from samples 4, 5 and 6. In sample 11, an amplification zone for the genus *Glomus* sp., between 150-100 bp, was observed in roots. The information generated will allow the use of these autochthonous mycorrhizae in the formulation of a fertilizer to increase the sustainability of the cattle systems of the northwest line.

*Keywords: Fungi, spores, mycorrhizae, arbuscule.*

## INTRODUCCIÓN

La mayoría de los pastos tropicales poseen una alta dependencia micorrízica (Howeler *et al.* 1987), sin embargo, muchos factores relacionados con la especie de plantas al cual se asocian y su régimen de explotación, la eficiencia de las cepas de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) ya sean nativas o inoculadas y las condiciones del suelo, pueden incidir en el funcionamiento de la simbiosis y de hecho en la productividad del pasto, Ojeda *et al.* (1994) y González *et al.* (2008).

Históricamente, los hongos han desempeñado una función importante en el establecimiento y mantenimiento de los ecosistemas. Cerca del 80 % de las especies vegetales y el 92 % de las familias de plantas terrestres son micorrízicas, mientras que el tipo arbuscular es el más común y ancestral de estas asociaciones, Wang y Qiu (2006) y Ojeda *et al.* (2014).

La planta micorrizada, también llamada “planta trampa”, debe tener características especiales como: ser micotrófica obligada y no selectiva a las diferentes especies de HMA; adaptarse a un rango amplio de condiciones de suelo y clima, fácil de mantener en cultivo, con semillas de alto porcentaje de germinación en lo que no hay necesidad de utilizar procesos de escarificación complicados y que no debe ser muy susceptible a enfermedades de hábito radical, De La Rosa *et al.* (2012).

Los hongos son organismos valiosos que juegan un papel importante en la naturaleza, porque participan en diversos procesos de reciclaje de materia orgánica, en la formación y conservación del suelo, y en el equilibrio de los ecosistemas naturales, a través de sus relaciones con otros organismos, Hyde *et al.* (1997). Las micorrizas son asociaciones anatómicas íntimas entre las raíces de las plantas y algunos hongos del suelo, denominados hongos micorrízicos (HM), Domínguez *et al.* (2013). La diversificación de origen de las endomicorrizas ha sido tratada por Simon *et al.* (1993), resaltando su importancia en el suelo.

El tipo de asociación hongo-raíz más extendido en la naturaleza es la llamada endomicorriza o micorriza arbuscular, formada por ciertos zigomicetos, los cuales no desarrollan red de “Hartig” y colonizan intracelularmente la corteza de la raíz por medio de estructuras especializadas denominadas arbusculos, actúan como estructuras de intercambio de nutrientes entre la célula vegetal y el huésped. Algunos géneros de estos hongos forman también otro tipo de estructuras llamadas vesículas, compuestas principalmente por lípidos; estas vesículas están presentes intercelularmente en la corteza de la raíz y se consideran reservorios de nutrientes para el hongo, Aguilera *et al.* (2007).



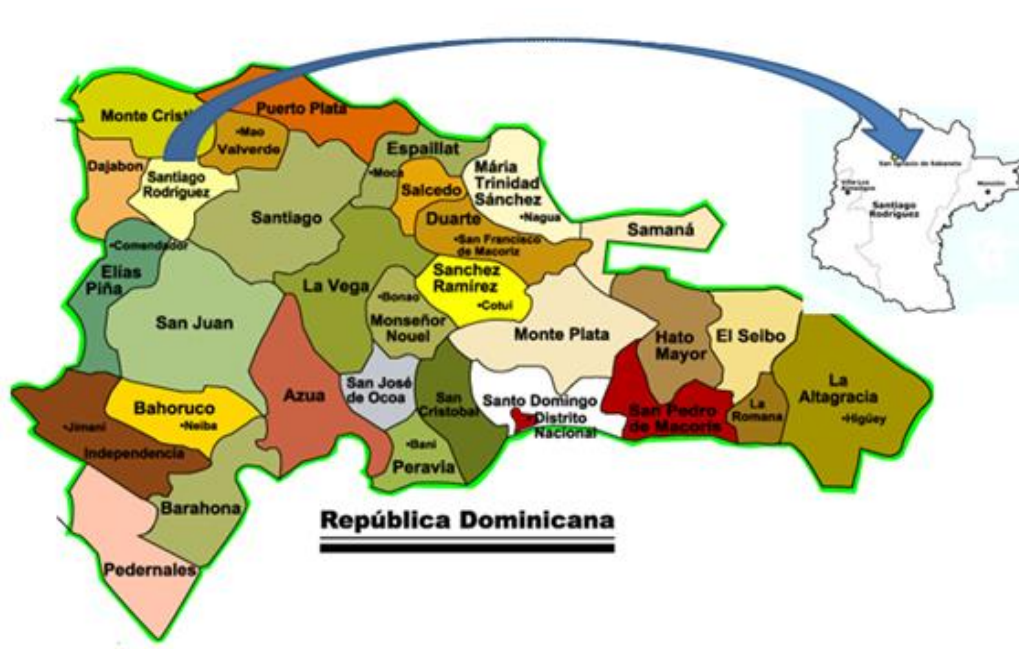
La diversidad de los hongos micorrízicos arbusculares en la República Dominicana, ha sido poco estudiada, Reyes y Soto (2017). Las micorrizas arbusculares son un factor biológico importante dentro de la estructura y funcionamiento de los suelos e inciden sobre el comportamiento ecológico, productividad y composición de comunidades vegetales naturales, así como también en cultivos agrícolas y plantaciones forestales. Los hongos formadores de micorrizas arbusculares son considerados importantes en la diversidad biológica de los suelos.

La finalidad de este estudio es contribuir a generar información sobre los aportes de las micorrizas en la región ganadera de la línea noroeste, específicamente en la provincia de Santiago Rodríguez, sobre el efecto de los hongos versículo arbuscular sobre plantas gramíneas y leguminosas, las cuales son utilizadas para la alimentación del ganado y recomendar nuevas tecnologías, que permitan garantizar un alimento sano con una biomasa vegetal y que asegure una buena producción de leche y carne. El objetivo fue caracterizar de manera fenológica y genética cepas autóctonas de micorrizas encontradas en suelo y raíces provenientes de pasturas bajo pastoreo en Santiago Rodríguez. Además, se plantea un modelo de predicción del evento de esporulación de hongos formadores de micorrizas arbusculares físico - químico y biológico del suelo, a nivel de fincas ganaderas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio

El estudio se realizó en la región ganadera de la línea noroeste de la República Dominicana, específicamente el área correspondiente a la provincia de Santiago Rodríguez en las localidades de Monción, Sabaneta y Villa de los Almácigos, Figura 1.



**Figura 1.** Ubicación del experimento en Santiago Rodríguez

## **MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS**

Pastos (suelo y biomasa), equipos de laboratorio, reactivos, equipos e implementos agrícolas, material gastable de laboratorio.

Para el muestreo de suelo y pasto se aplicó la metodología descrita por Sieverding (1983), la misma

## **Manejo del experimento y muestreo de las fincas**

se realizó en zigzag, tomando entre 6-8 submuestras a través de puntos georreferenciados. Las muestras fueron colocadas en bolsas plásticas, rotuladas de acuerdo al tipo de pasto y suelo, con fecha y datos de recolección. Posteriormente, se colocaron en una nevera tipo playera para ser transportada al laboratorio y conservadas a una temperatura de 4°C. Las muestras fueron tomadas a una profundidad entre 20 a 30 cm y en el caso del suelo, se tomó aproximadamente 2 kg de suelo por muestras por finca.

Las muestras de suelo se dejaron a temperatura ambiente hasta obtener el mínimo de humedad,

## **Manejo muestras en el laboratorio**

variando con las condiciones climáticas, para luego tamizarlas con malla 0.38-0.40 centímetros para separar las porciones de suelo más grandes y eliminarlas. Las raíces separadas del suelo rizosférico fueron analizadas de manera independiente.

Para el aislamiento y conteo de las esporas presente en el suelo, se utilizó el método descrito por Gerdemann y Nicolson (1963), este método se basa en suspender una muestra de suelo en agua corriente y pasarla por tamices de diámetro descendente. En ese caso, se utilizaron tamices de 100, 250 y 500 micras, con la finalidad de aislar las esporas más limpias y hacer posible el conteo y aislamiento.

## **Tinción de las raíces micorrizadas**

Se empleó la técnica de Phillips y Hayman (1970), que incluye la tinción de raicillas que permiten identificar la presencia de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) dentro de las mismas.

## **Metodología para identificación mediante extracción de ADN en raíces**

Para la extracción de ADN, se utilizó el protocolo de Doyle y Doyle (1990) con CTAB, detallado a continuación: precalentar Buffer CTAB (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 0.2% 2-Mercaptoetanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0). Luego, se trituraron 500 mg de raíces y se transfirieron a un tubo eppendorf de 2 ml agregando 1ml de la solución de extracción CTAB. La mezcla se incubó durante 30 min a 60 ° C con mezclas ocasionales por inversión. Se recuperaron 500 µl del sobrenadante y se le agregó un volumen igual de (cloroformo / alcohol isoamílico 24:1) y se homogenizó por inversión. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min, se extrajeron 300 µl de la fase acuosa y se colocó a un nuevo tubo. La

muestra se le agregó el doble del volumen de isopropanol frío y se dejó de un día al otro a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante, el precipitado se lavó dos veces con etanol frío al 70%. Luego, se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasa y se almacenó a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### Técnica de identificación de Reacción en Cadena de la Polimersa

Se usó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimersa (PCR) recurriendo a los “primers” universales para eucariotes (NS1-ITS4) que amplifican del gen de la subunidad ribosomal 18S (ADNr 18S). Estos primer fueron utilizados por otros investigadores los cuales buscaron los hongos micorrizas “específico” de los *Glomerales*, capaces de amplificar ADN fúngico en raíces colonizadas por este tipo de hongos. El gen ribosomal 18S es la región del genoma de los *Glomeromycota* (hongos formadores de MA) más secuenciada para estudios de filogenia, Simón *et al.* (1993).

Este proceso se realizó en dos fases: en la primera se utilizó una combinación del cebador universal específico de eucariota LR1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGA-3') (24) y el cebador específico de *Glomeromycota* /MVA, FLR4 (5'-TACGTCAACATCCTTAACGAA-3'; y en la segunda se utilizaron 5  $\mu\text{l}$  del producto de la primera reacción (dilución 1/1000) siguiendo el mismo programa. En este caso, se usó uno de los cebadores anteriores (FLR4) en combinación con un cebador taxón-específico discriminante para *Glomus* 5.25 (5'-ATCAACCTTTTGAGCTCG-3'). También, se utilizaron primers elaborados con una herramienta de la web denominada Hosted tolos, que es un software para hacer iniciadores de ADN. Los primers para *Glomus* subunidad ribosomal de RNA. La secuencia Left Primer GCATTTGCCAAGGATGTTTT. Right Primer CATCATCCGATCCCTAGTCG. *Gigaspora* sp. región 28S ribosomal. Left primer TTGGGAATGCTCAAAT. Right primer ACGCTAACCTGCCAAAGAAA. *Acaulospora* sp. región subunidad ribosomal de RNA. Left primer. CCGTGAGGGAAAGATGAAAA. Right primer ACCTGCCAAGCAAGGAAGTA. *Scutellospora* sp. Región 28S ribosomal de RNA. Left primer TTGCGAACAAGTACCGTGAG. Right primer GCTGGCATGACTGACTTCAA. *Paraglomus* sp. región de la subunidad ribosomal de RNA. Left primer CCTAGTAACGGCGAGC. Right primer GCCTCGTTCCAGAAGACTTG.

### Programación del termociclador

El termociclador se programó de la siguiente forma: ciclo de desnaturalización inicial a  $95^{\circ}\text{C}$  (tres minutos), a continuación 30 ciclos de desnaturalización a  $93^{\circ}\text{C}$  (un minuto), la unión de los cebadores a las cadenas simples de ADN a  $60^{\circ}\text{C}$  (un minuto) y extensión a  $72^{\circ}\text{C}$  (un minuto); el último ciclo es una extensión final de  $72^{\circ}\text{C}$  durante cinco minutos.

## **Corrida por electroforesis y visualización del ADN**

Se corrió un gel de agarosa al 1%. Las muestras obtenidas del ADN de las raíces, se colocaron en los pocillos del gel y de inmediato se corrieron en un sistema de electroforesis (Thermo Scientific, OWL), el cual se rellenoó con Buffer TBE 1X. Se mezclaron 5 µl de ADN con 4µl de "Loading buffer". El voltaje fue de 70 voltios por 20 minutos, para la cuantificación y 40 minutos para el producto PCR. La fuente de poder fue: La EC-105. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en un trans iluminador de luz ultravioleta (UVP Trans iluminator).

Se tomaron 50 esporas de micorrizas, se colocaron en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml. Se realizó

## **Extracción de ADN en espora**

una limpieza con agua (H<sub>2</sub>O) libre de DNasa. Posteriormente, se centrifugó por 5 minutos a 14,000 rpm. Se llevó a un horno por 20 minutos, a 37 °C. Luego se le agrego 50 µl H<sub>2</sub>O libre de DNasa. Se colocó en baño maría a 100 °C. Luego se le aplicó choque térmico en hielo por 5 minutos. Este paso se repitió 2 veces. Luego se guardó a -20 °C.

Se usó la técnica de PCR utilizando los primers universales para eucariontes (NS1-ITS4) que permitan

## **Cóctel de PCR para especificar el ADN de las esporas**

inicialmente la amplificación del gen de la subunidad ribosomal 18S (ADNr 18S). El cóctel de reacción fue de: 6 µl de ADN, 1 µl de primer F, 1 µl de primer R, 13 µl de mezcla Green Taq Mix 2X de (Promega), 8µl de H<sub>2</sub>O free Dnase y el volumen total fue de 29 µl. Los primers utilizados fueron: ITS4: GTCGCGTTCATCGATGC y NS5: AACTTAAAGGAATTGACGGAAG. Estos primers se diseñaron y son específico de los *Glomeromycota* y amplificaron el ADN fúngico en raíces colonizadas. La compañía que elaboró los oligonucleótidos fue: Bioanalytical con sede en San Juan, Puerto Rico.

## **Condiciones del equipo para amplificación por PCR**

Se hizo una desnaturalización de 95 °C por 3 minutos, luego 95 °C por 30 segundos, 52 °C por 30 segundo, 72 °C por 1 minuto, a estas condiciones se le dieron 25 ciclos y una extensión final de 10 minutos a 72 °C. El equipo utilizado fue un termociclador: PCRSG-500.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Identificación de especies de micorrizas**

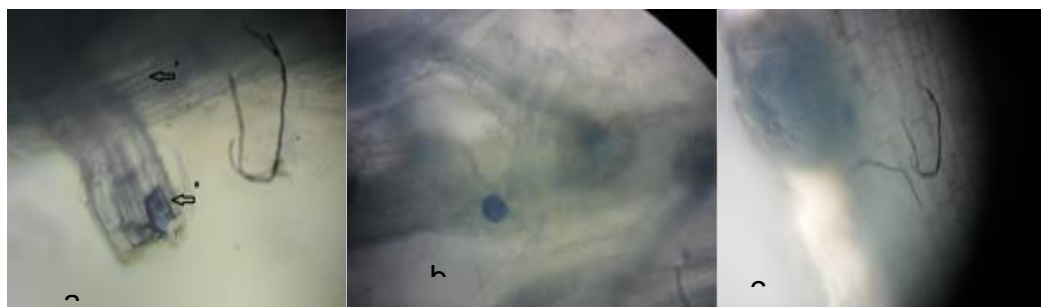
Mediante el reconocimiento fenotípico se identificaron tres especies de HMA correspondiente al género *Glomus*: *G. fasciculatun*, *G. geosporum*, *G. desertícola*, correspondientes a las diferentes localidades evaluadas en la provincia de Santiago Rodríguez, República Dominicana, Figura 2.



**Figura 2.** a) *Glomus deserticola*; b) *Glomus fasciculatum* .c) *Glomus geosporum*.

### Resultados obtenidos de la tinción de raíces

En todas las tinciones se visualizaron estructuras fúngicas de los diferentes tipos de hongos observados de HMA, Figura 3.

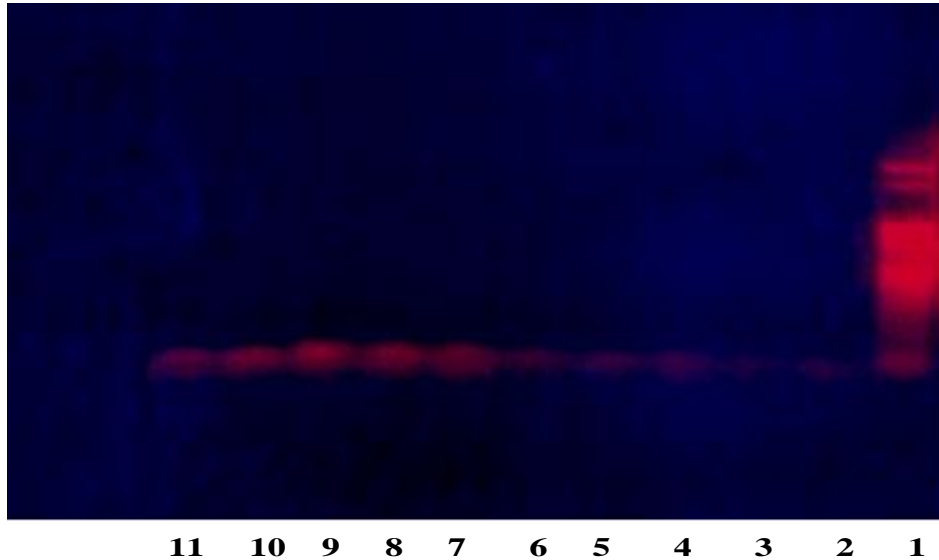


**Figura 3.** a) células corticales con un arbúsculo; b) espora germinada dentro de la raíz y c) hifas de micorrizas.

Figura 3. Se muestra desde derecha a izquierda, donde 1 es el marcador molecular de 50 bp. Las muestras 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, y 10 no se observó amplificación. La primera banda del marcador es de 3,000 bp, las demás son 2,000 bp y 1000 bp. La zona de amplificación de la muestra está entre 150-100 bp. Análisis realizado en Laboratorio Biología Molecular del Centro de Tecnologías Agrícolas (Centa), Idiaf 2016.

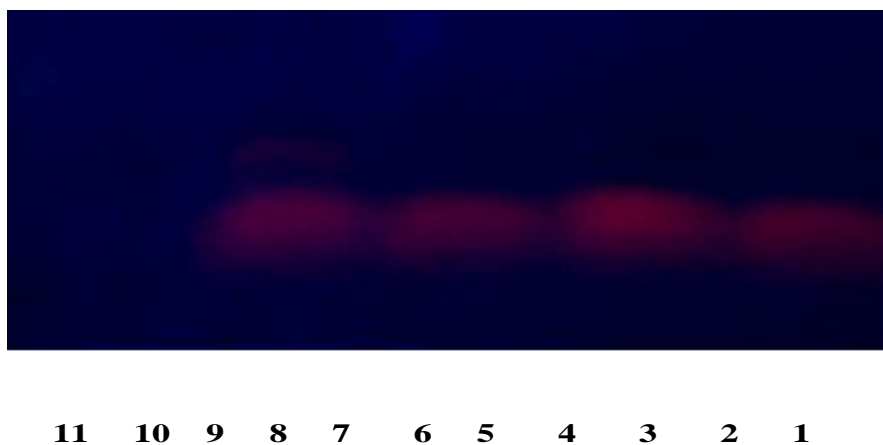
## Resultados PCR en raíces

El resultado correspondiente al PCR en raíces se presenta y se describen en las figuras 4 y 5.



**Figura 4.** Amplificación más detallada y amplificada. Análisis realizado en Laboratorio Biología Molecular del Centro de Tecnologías Agrícolas (Centa), Idiaf.

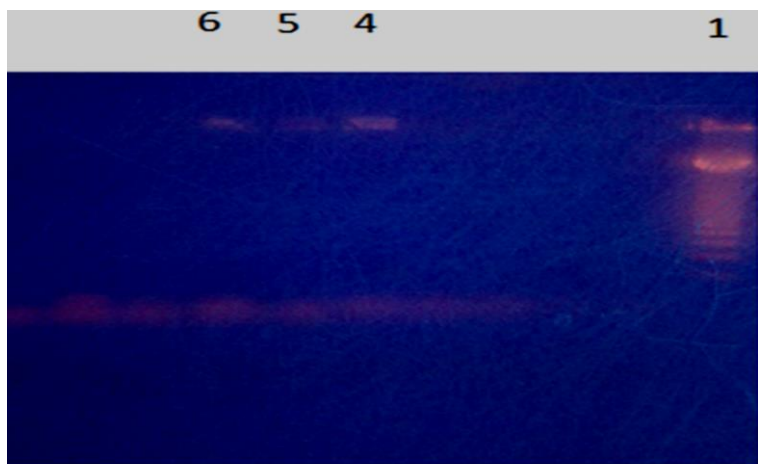
La Figura 4, se muestra desde derecha a izquierda, donde 1 es el marcador molecular de 50 bp. Las muestras 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 no se observó amplificación. La primera banda del marcador es de 3,000bp, las demás son 2,000bp y 1000bp. La zona de amplificación de la muestra está entre 150-100bp.



**Figura 5.** Amplificación más detallada y amplificada. Análisis realizado en Laboratorio Biología Molecular del Centro de Tecnologías Agrícolas (Centa), Idiaf.

## Resultados del PCR para la identificación de *phylum Glomeromycota* en muestras de esporas

La amplificación de una región del gen 18S ribosomal de espora procedentes de las muestras 4, 5 y 6, se presenta en la Figura 6, con una banda de ADN de 1,500 pares de base.



**Figura 6.** PCR muestras 4, 5 y 6, Santiago Rodríguez.

En la Figura 6, se nota a la derecha de la imagen la muestra 1, el marcador molecular de 100 bp. La primera banda del marcador es de 1500 bp. Las muestras 4, 5 y 6 amplificaron, se observan 3 bandas muy fina que están entre los 1500 bp perteneciente al gen ribosomal 18S que es la región del genoma de los *Glomeromycota*. Análisis realizado en Laboratorio Biología Molecular del Centro de Tecnologías Agrícolas (Centa), Idiaf 2018.

### CONCLUSIONES

Las tinciones raíces se visualizaron estructuras fúngicas de los diferentes tipos de hongos observados de HMA, donde se observaron células corticales con arbusculos e hifas; y esporas germinadas dentro de la raíz. Mediante los estudios fenotípicos, se identificaron tres especies pertenecientes al género *Glomus* específicamente. *G. fasciculatum*, *G. geosporum* y *G. deserticola*, en las localidades evaluadas.

En la técnica molecular de PCR y ADNr 18S se encontró resultados positivos de PCR obtenidos muestras de esporas del suelo para *phylum Glomeromycota* en la amplificación de una región del gen 18S ribosomal de espora procedentes de las muestras 4, 5 y 6. En la caracterización de la segunda y la tercera de PCR en esporas para identificar género *Glomus*. Debido a que no se amplificó no se obtuvieron resultado. Se observó que el resultado de PCR de las raíces la muestra número 11, se tiene una zona de amplificación para el género *Glomus* sp., que se encuentra entre 150-100 bp.

## AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Educación Superior Ciencia y Tecnología (Mescyt) que a través del Fondo Nacional de Innovación y Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondocyt) financió la ejecución del proyecto “Producción de un biofertilizante con cepas autóctonas de micorrizas como alternativa para mejorar las pasturas en la ganadería de la línea noroeste”, así como a los productores de ganado de la provincia Santiago Rodríguez, que permitieron los muestreos en sus sistemas de producción.

## LITERATURA CITADA

Aguilera-Gómez, L.; Olalde-Portugal, V.; Arriaga, M.; Contreras, A. 2007. Micorrizas arbusculares. *Ciencia ergo sum* (14):300-306. (En línea). Revisado el 19 de enero 2021. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/104/10414307.pdf>

De la Rosa, C.; Ferrera, R.; Alarcón, A. 2012. Aislamiento de consorcios de hongos micorrícicos arbusculares de plantas medicinales y su efecto en el crecimiento de finca (*Catharanthus roseus*). *Revista Chilena de historia natural*, 85(2): 187-198. (En línea). Revisado el 19 de enero 2021. Disponible en: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-078X2012000200005](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-078X2012000200005)

Domínguez, D.; Vásquez, H.; Reyes, B. 2013. Aislamiento y purificación del hongo ectomicorrízico *Helvella lacunosa* en diferentes medios de cultivo. *Sistema de información científica. Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. Agroecosistema Tropical y Sub tropical* 16: 51-59. (En línea). Revisado el 19 de enero 2021. Disponible en: <https://www.redalyc.org/html/939/93927469006/>

Doyle, J.; Doyle, J. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.

Gerdemann, J.; Nicolson, T. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46: 235-244. *Global Change. Eds. CAB international and IUBS. 1992. In: Chapter 6: 41-56. VAL.*

González, P.; Plana, R.; Rivera, R.; Fernández, F.; Arbola, J. 2008. Efectos de la inoculación de hongos micorrícicos arbusculares en pastos del género *Brachiaria*, cultivados en suelo pardo mullido. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 42: 101.

Hyde, K.; Hawksworth, D. 1997. Measuring and monitoring the biodiversity of microfungi. *In Biodiversity of tropical microfungi*, K. D. Hyde (ed.). Hong Kong. Pp. 11-28.

Howeler, R.; Sieverding, E.; Saif, S. 1987. Practical aspects of mycorrhizal technology in some tropical crops and pastures. *Plant and Soil* 10: 77

Ojeda, L.; Furrázola, E.; Hernández, C. 2014. Micorrizas arbusculares en leguminosas de la empresa pecuaria El Tablón, Cuba. *Pastos y Forrajes*, 37(4): 392-398. (En línea). Revisado el 19 de enero 2021. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03942014000400002&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942014000400002&lng=es&tlng=es).

Ojeda, L.; Furrázola, E.; Herrera, R.; Hernández, C.; Castellón, A. 1994. Especies micorrízicas cubanas en pasturas de gramíneas sobre suelo pardo grisáceo del Escambray. *Resultado para la Investigación (18-IR-119)*. La Habana, CU.

Phillips J.; Hayman, D. 1970. Improved procedures for clearing roots and vesicular-arbuscular fungi for rapid assessment of the infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-161.



Reyes, E.; Soto, H. 2017. Caracterización de micorrizas autóctonas en suelo y raíces provenientes de fincas ganaderas en Montecristi, República dominicana. Tesis de grado Escuela de Ingeniería Agronómica, Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD), Santo Domingo, DO.

Sieverding, E. 1983. Manual de métodos para la investigación de las M.V.A. en el laboratorio. CIAT. Cali. Colombia. 121 p. (En línea). Revisado el 19 de enero 2021. Disponible en: [http://ciat-library.ciat.cgiar.org/ciat\\_digital/CIAT/books/historical/198.pdf](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/ciat_digital/CIAT/books/historical/198.pdf)

Simon, L.; Bousquet, J.; Lévesque, R. C.; Lalonde, M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincident with vascular plants. *Nature* 363 (6424): 67-69.

Wang, B.; Qiu, Y. L. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16: 299-363.



## Identificación de micorrizas asociadas con el cultivo de cacao en la Estación Experimental Engombe de la UASD

Birmania Wagner<sup>1\*</sup>, Elfrida Pimentel<sup>2a</sup>, Iris Marcano<sup>2b</sup>, Chery Kabe<sup>3</sup>, Benitho Colin<sup>3</sup> y Pedro Núñez<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Coinvestigadora del proyecto del Fondo Nacional de Innovación y Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondocyt). "Producción de un biofertilizante con cepas autóctonas de micorrizas como alternativa para mejorar las pasturas en la ganadería de la línea noroeste". Docente Facultad de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD). <sup>2</sup>Coinvestigadores. Docentes de la <sup>a</sup>Facultad de Ciencias Escuela de Microbiología y de la <sup>b</sup>Facultad de Ciencias Agronómicas y Veterinarias. Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD). <sup>3</sup>Graduados de ingenieros agrónomos de la Escuela de Ingeniería Agronómica de la Facultad de Ciencias Agronómicas y Veterinarias. Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD). <sup>4</sup>Investigador y líder del proyecto del Fondocyt. "Producción de un biofertilizante con cepas autóctonas de micorrizas como alternativa para mejorar las pasturas en la ganadería de la Línea Noroeste". Docente cátedra de suelos en la Facultad de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD) e investigador Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA-UASD). Investigador titular del Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (Idiaf).

\*Autor para correspondencia: birmaniawagner@yahoo.com

### RESUMEN

Las plantaciones de cacao de la República Dominicana son fertilizadas mínimamente (5%) y por lo tanto, podría considerarse como natural, desde ese punto de vista. El objetivo de este estudio es identificar la población de micorrizas nativas asociada al cultivo de cacao en la Estación Experimental Engombe de la Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD), localizada en Santo Domingo Oeste, República Dominicana. Se realizó un estudio en tres fases: a) toma de muestra de suelo y raíz en plantas de cacao con una profundidad de 0-20 cm para un total de 13 muestras, b) análisis de la muestra en el laboratorio que incluyó, la extracción de esporas, observación de la infección en las raíces, por medio de tinción y c) identificación molecular con extracción de ADN (ácido desoxirribonucleico) y amplificación por medio de reacción cadena polimerasa (PCR). En la extracción de esporas en húmedo se pudo evidenciar la presencia de micorrizas dominando el género de *Glomus* sp. con un 77% de las muestras analizadas y un 23% por los géneros *Acaulospora* sp. y *Gigaspora* con presentación mínima, lo que evidencia la presencia de micorrizas nativas asociado al cultivo de cacao. Posteriormente, mediante la prueba de PCR se identificó el género *Glomus* en las muestras de suelo. Este tipo de información es importante para apoyar los esfuerzos para incrementar la exportación de cacao orgánico, es decir reducir el uso de fertilizantes químicos en la producción de este cultivo y, por lo tanto, mejorar las características del producto en términos de calidad y productividad.

*Palabras claves:* PCR, Género, *Acaulospora*, *Glomus*, *Gigaspora*.

### ABSTRACT

The cocoa plantations of the Dominican Republic are minimally fertilized (5%) and therefore could be considered as natural, from that point of view. The objective of this study is to identify the native mycorrhizal population associated with cocoa cultivation at the Engombe Experimental Station of the Autonomous University of Santo Domingo (UASD), located in Santo Domingo Oeste, Dominican Republic. A study was carried out in three phases: a) taking a soil and root sample in cocoa plants with a depth of 0-20 cm for a total of 13 samples, b) analysis of the sample in the laboratory that included, the extraction of spores, observation of the infection in the

roots, by means of staining and c) molecular identification with DNA extraction (deoxyribonucleic acid) and amplification by means of polymerase chain reaction (PCR). In the wet spore extraction, the presence of mycorrhizae dominating the genus of *Glomus* sp. with 77% of the samples analyzed and 23% by the *Acaulospora* sp. and *Gigaspora* with minimal presentation, which shows the presence of native mycorrhizae associated with cocoa cultivation. Subsequently, by means of the PCR test, the genus *Glomus* was identified in the soil samples. This type of information is important to support efforts to increase the export of organic cocoa, that is, to reduce the use of chemical fertilizers in the production of this crop and, therefore, to improve the characteristics of the product in terms of quality and productivity.

*Keywords: PCR, Genus, Acaulospora, Glomus, Gigaspora.*

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) es originario del continente americano y se difundió a otros continentes durante la era colonial entre los siglos XVIII y XIX. En el siglo XX, el 80% de la producción se realizó en el continente americano, sin embargo, en el siglo XXI, América disminuye solo con un 70%, contrastando con el continente africano donde actualmente se encuentra el 78% de la producción mundial, Ploetz (2007), Cedaf (2009), FAO (2010).

En la República Dominicana, se siembran 150 mil hectáreas distribuidas en 28 municipios de las direcciones regiones agropecuarias nordeste, este, central, norte y norcentral del Ministerio de Agricultura. En el país, se reportan 30,000 fincas dedicadas al cultivo del cacao que involucra una población laboral económicamente activa de 200,000 a 300,000 personas. En la región nordeste se tiene 92,605 ha sembradas, un 60.82% del área; en la región este 18,500 ha, correspondiente a un 12.15%; la región central 15,516 ha, representando un 10.20%; en la región norte 14,500 ha que representa un 9.52% y en la región norcentral, se cultivan 6,375 ha, un 6.25% del total, Ministerio de Agricultura (2020).

Las micorrizas forman una asociación simbiótica con las raíces de la mayoría de las plantas. Se reporta que los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) benefician a las plantas porque facilitan la toma de nutrientes del suelo, Cornwell *et al.* (2001); la resistencia al estrés hídrico, Augé (2001), resistencia a patógenos de suelos, García y Ocampo (2002) e inmovilización de metales pesados en sitios con moderada contaminación.

El grado de dependencia de las plantas hacia los HMA, muestra que la simbiosis micorrízica puede influir en la composición y diversidad de las especies vegetales (Marcel y Van der 2003) y como consecuencia, una alteración en la comunidad HMA afectará la productividad y la diversidad del ecosistema.

Camargo-Ricalde *et al.* (2012) plantean que la simbiosis hongo-planta se encuentran muy extendido en todo el ecosistema terrestre, del 90-95% de las plantas superiores se encuentran micorrizadas. En la actualidad, se encuentran entre el microorganismo más estudiado y empleados, por su diversidad de especies, cepas y forma de actuar en la planta y en el suelo, sin embargo, no hay estudios en la República Dominicana donde se conozca la asociación de micorriza asociada al cultivo de cacao.

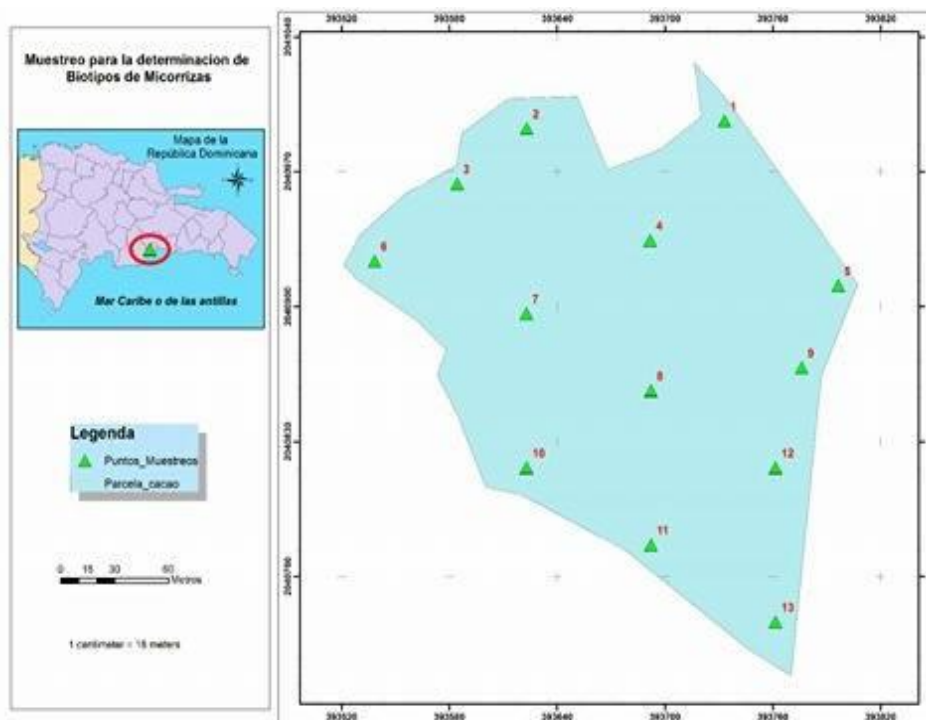
La presencia de una comunidad de micorriza asociada a las condiciones locales representa una alternativa a incrementar esta asociación entre la micorriza y la planta reduciendo la fertilización química, Klironomos (2003).

Mediante el uso de los biofertilizantes para el cultivo del cacao, Guigón-López (2007) plantea que el proceso de las interacciones que ocurre entre los cultivos y la micorriza lleva a romper el equilibrio de esta simbiosis. Sin embargo, en la República Dominicana no se han realizados trabajo al respecto. Este estudio tiene como objetivo el identificar morfológicamente y por prueba de PCR la asociación de micorriza nativas asociadas a una colección de clones de *Theobroma cacao* L. (cacao) en la Estación Experimental Engombe de la Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD), en Santo Domingo Oeste, República Dominicana.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización del estudio

El estudio se realizó en la terraza baja de la Estación Experimental Engombe, de la Facultad de Ciencias Agronómicas y Veterinarias de la Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD), localizada en Santo Domingo Oeste, República Dominicana, en las coordenadas 18° 27' 27" latitud norte y 70° 00' 25" longitud oeste, República Dominicana, Figura 1.



**Figura 1.** Ubicación de la Estación Experimental Engombe detallando los puntos de muestreo. Elaborado por el autor.

## **Georreferenciación y muestreo**

La investigación incluyó la toma de muestra de suelos y de raíces y georreferenciación de los puntos para la elaboración de los mapas. La delimitación del área se realizó con un GPS marca Garmin modelo MAP60CSx, luego, se generó un modelo de muestreo con el uso del programa "Repeating Shapes for ArcGIS" de la Empresa "Jeness Enterprises", donde a partir del polígono del área de estudio, especificando la distancia entre puntos de muestreo (80 m, angulados a 45°), se generaron 13 puntos de muestreos con sus coordenadas, Figura 1. Las coordenadas fueron enviadas del ordenador al receptor GPS Garmin MAP 60CSx, para su replanteo en el campo.

Las muestras de suelos se tomaron a una profundidad de 0 a 20 cm, dos por punto de muestreo (suelo y rizósfera), usando un barreno de metal, estas fueron identificadas para su posterior análisis en el laboratorio. Estas muestras se colocaron en fundas plásticas previamente identificadas y colocadas en nevera a temperatura de 6°C.

Se empleó la metodología de extracción de esporas con tamizado en húmedo y centrifugación en gradiente de sacarosa de Sieverding (1983) y Gerdemann y Nicolson (1963). Para este procedimiento se tomaron las 13 muestras y pesaron de cada una 10 g de suelo y se colocó en un Erlenmeyer, al cual se le agregaron 100 ml de agua y se llevó a un agitador por 15 minutos. Se agregó agua y se procedió a su tamizado, utilizando tamices de 250 $\mu$  38 $\mu$ . Este procedimiento se repitió dos veces a fin de asegurar la mayor recolección de esporas en la muestra de suelo.

## **Extracción de esporas**

Luego del lavado y tamizado el suelo, se recogió del tamiz inferior de 38 $\mu$ , el material que quedó depositado en éste y se agregó agua para lavar el material. Esa misma agua de lavado, se vertió en un tubo de centrifuga de 50 ml con volumen de agua entre 20 a 25 ml y luego se le añadió, con ayuda de una jeringuilla o con una manguerilla rígida adaptada, 20 ml de sacarosa al 72 % con Tween 80 al 2 %.

Para identificar los morfotipos de las esporas aisladas, se utilizó una lupa Bunsen STA-933 y un microscopio OMAX y una caja de Petri cuadrada. El proceso de identificación de los morfotipos se realizó recorriendo cada uno de los cuadrantes de dicha caja e identificando cada una de las esporas por su color, forma, accesorios presentes y número de paredes.

## **Técnica de tinción de muestra de raíces**

La técnica empleada para la tinción de raíces fue la de Phillips y Hayman (1970), con la utilización de diferentes reactivos para el blanqueamiento de las raíces y su posterior tinción con el azul de tripán al 0.05 %.

Para la identificación de los HMA, se tomó en cuenta las características morfológicas como son: color, forma, estructura citoplasmática, estructura superficial, número de paredes y tipo de hifas.

## **Extracción de ADN**

Para la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) se utilizó el protocolo de Doyle & Doyle (1990) con CTAB, detallado a continuación:

Precalentar Buffer CTAB (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 0.2% 2-Mercaptoetanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0). Luego se trituraron 500 mg de raíces y se transfirieron a un tubo eppendorf de 2 ml agregando 1ml de la solución de extracción CTAB. La mezcla se incubó durante 30 min a 60 ° C con mezclas ocasionales por inversión. Se recuperaron 500 µl del sobrenadante y se le agregó un volumen igual de (cloroformo / alcohol isoamílico 24:1) y se homogenizó por inversión. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min, se extrajeron 300 µl de la fase acuosa y se colocó a un nuevo tubo. La muestra se le agregó el doble del volumen de isopropanol frío y se dejó de un día al otro a -20 ° C Se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante, el precipitado se lavó dos veces con etanol frío al 70%. Luego, se re-suspendió en 50 µl de agua libre de nucleasa y se almacenó a 4° C hasta su uso.

## **Determinación de micorrizas por PCR**

### **Elaboración de un primer PCR**

Se usó la técnica de PCR recurriendo a los “primers” universales para eucariontes (NS1-ITS4) que amplifica del gen de la subunidad ribosomal 18S (ADNr 18S). Estos primer fueron utilizados por otros investigadores los cuales buscaron los hongos micorrizas “específico” de los Glomerales, capaz de amplificar ADN fúngico en raíces colonizadas por este tipo de hongos. El gen ribosomal 18S es la región del genoma de los Glomeromycota (hongos formadores de MA) más secuenciada para estudios de filogenia.

Previamente la preparación de la mezcla del cóctel de reacción fue de: 2 µl de ADN, 1 µl de Primer F, 1 µl de primer R, 13 µl de mezcla Green Taq Mix 2X de (Promega), 8 µl de H<sub>2</sub>O free Dnase y el volumen total fue de 25 µl. Los primer utilizados fueron: ITS4: GTCGCGTTCATCGATGC y NS5: AACTTAAAGGAATTGACGGAAG. Estos primer se diseñaron ya que son específico” de los

*Glomeromycota* y amplificaron el ADN fúngico en raíces colonizadas. La compañía que los elaboró los oligonucleotidos fue: Bioanalytical Instruments con sede en: San Juan, Puerto Rico.

Para las condiciones del termociclador se hizo una desnaturalización de 95 °C por 3 minutos, luego 95 °C por 30 seg, 52 °C por 30 seg, 72 °C por 1 minuto, a estas condiciones se le dieron 25 ciclos y una extensión final de 10 minutos a 72 °C. El equipo utilizado fue un termociclador: PCRSG-500.

### **Elaboración de un segundo primer PCR**

Esta se hizo para discriminar y llegar a otros géneros en este caso *Glomus sp.* Las secuencias de los Primer fueron: Agrovet- *Glomus* Left GCATTTGCCAAGGATGTTTT. Agrovet- *Glomus* Right CATCATCCGATCCCTAGTCG. Estos oligonucleótidos se elaboraron tomando secuencias del Gene Bank y elaborados utilizando el programa Primer 3. La fabricación de los oligonucleótidos fue en Bioanalytical con sede en San Juan, Puerto Rico.

El cóctel de reacción fue de: 4 µl de ADN de la primera PCR, 1 µl de Primer F, 1 µl de primer R, 13 µl de mezcla Green Taq Mix 2X de (Promega), 8 µl de H<sub>2</sub>O free Dnase y el volumen total fue de 27 µl.

Las condiciones del equipo para amplificación para segunda PCR fue una desnaturalización de 95 o C por 3 minutos, luego 95 o C por 30 seg, 55 o C por 30 seg, 72 o C por 1 minuto, a estas condiciones se le dieron 25 ciclos y una extensión final de 10 minutos a 72 o C. El equipo utilizado fue un Termociclador: PCRSG-500.

### **Corrida por electroforesis y separación de productos de PCR**

Se hizo un gel de agarosa al 1%. Las muestras obtenidas de la amplificación del ADN de las raíces, se colocaron en los pocillos del gel y de inmediato se corrieron en un sistema de electroforesis (Thermo Scientific, OWL), el cual se rellenó con Buffer TBE 1X. Se mezclaron 5 µl de ADN con 4µl de "Loading buffer". El voltaje fue de 70 V por 20 minutos, para la cuantificación y 40 minutos para el producto PCR. La fuente de poder fue: La EC-105. Los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (UVP Transiluminator).

### **Análisis de datos**

Los datos fueron analizados usada estadística descriptiva para conteo de esporas y porcentajes de infestación y prueba de T para el número de esporas. Así como la generación de mapas para la ubicación de esporas por color, forma y género, usando Repeating Shapes for ArcGIS, según se describe en la sección de georreferenciación y muestreo.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Morfotipos de esporas

Las características morfológicas de las esporas encontradas en suelos, presentan diversas formas:

**Morfotipo 1:** espora de forma sub-globosa, de color marrón oscuro, presenta *peridium*, no se aprecian las paredes. Si se compara esta espora coincide en su forma y color con la descrita por Monroy *et al.* (2013), como *Acaulospora* sp., Figura. 2.



Figura. 2. Espora de forma sub-globosa parecida a una del género *Acaulospora*.

**Morfotipo 2:** Espora de forma globosa amarillo oscuro, presenta dos paredes, similar al género *Glomus* sp., Figura 3, este morfotipo se corresponde a los hallados en el municipio de Tolú en las especies de pasto colosoana (*Bothriochloa pertusa* (L) A. Camus) y angletón (*Dichanthium aristatum*, Benth), mencionados en el trabajo de Pérez *et al.* (2012).

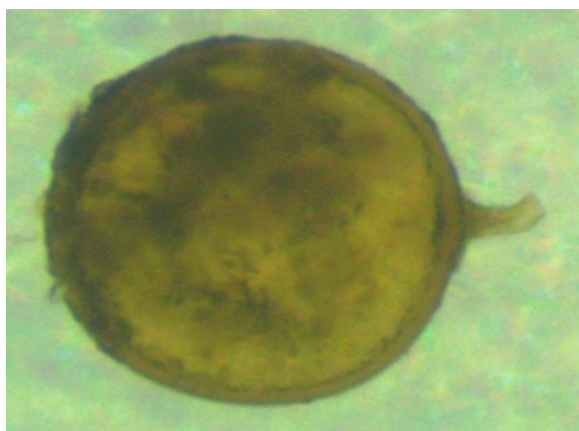


Figura. 3. Espora de forma globosa amarillo oscuro, presenta dos paredes similares al género *Glomus* sp.

**Morfotipo 3:** En la Figura 4, se observan espora de forma globosa, amarillo oscuro, no se aprecian paredes, tiene similitud con el género *Glomus* sp., Irrazabal *et al.* (2005); Pérez *et al.* (2012).



Figura 4. Espora de forma globosa, amarillo oscuro similitud con el género *Glomus* sp.

**Morfotipo 4:** En la Figura 5, se observan espora de forma sub-globosa de color amarillo pardo, pudiendo coincidir con el género *Gigaspora*, Pérez *et al.* (2012).



Fig. 5. Espora de forma sub-globosa pudiendo coincidir con el género *Gigaspora*.

En la Figura 6, se observa la ubicación de las esporas en el terreno dedicado a la producción de cacao, donde se muestra la distribución según la descripción del color, Figura 6. Mientras que la Figura 7, muestra la ubicación de las dos formas estructurales globosas y sub-globosas de esporas de micorrizas observadas en el trabajo, estos dos morfotipos fueron encontrados en esta investigación.

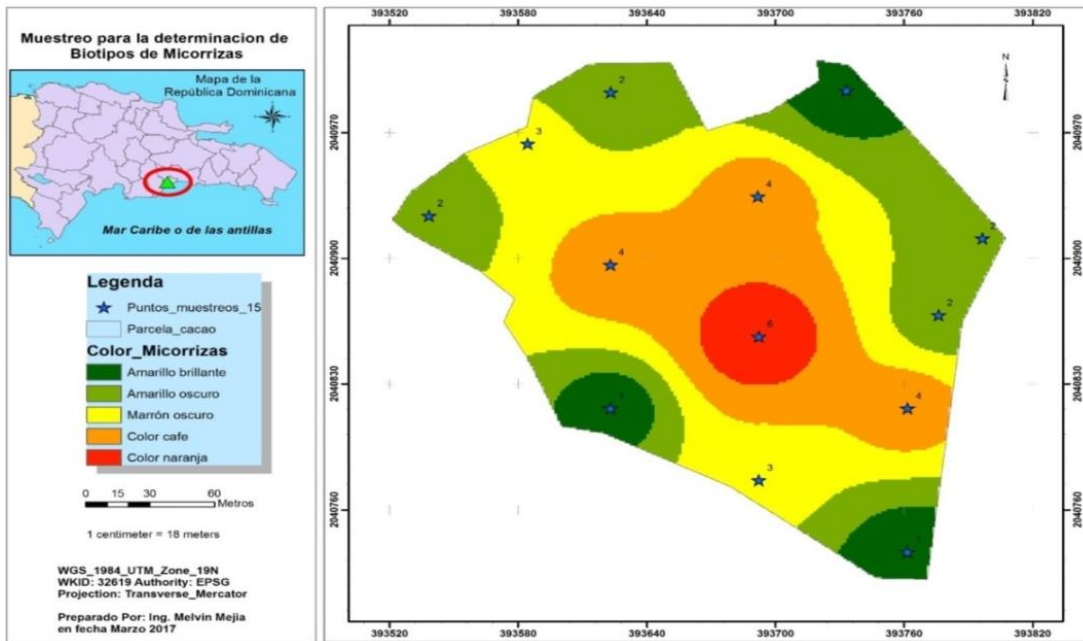


Figura 6. Ubicación de las esporas en el suelo según su color.

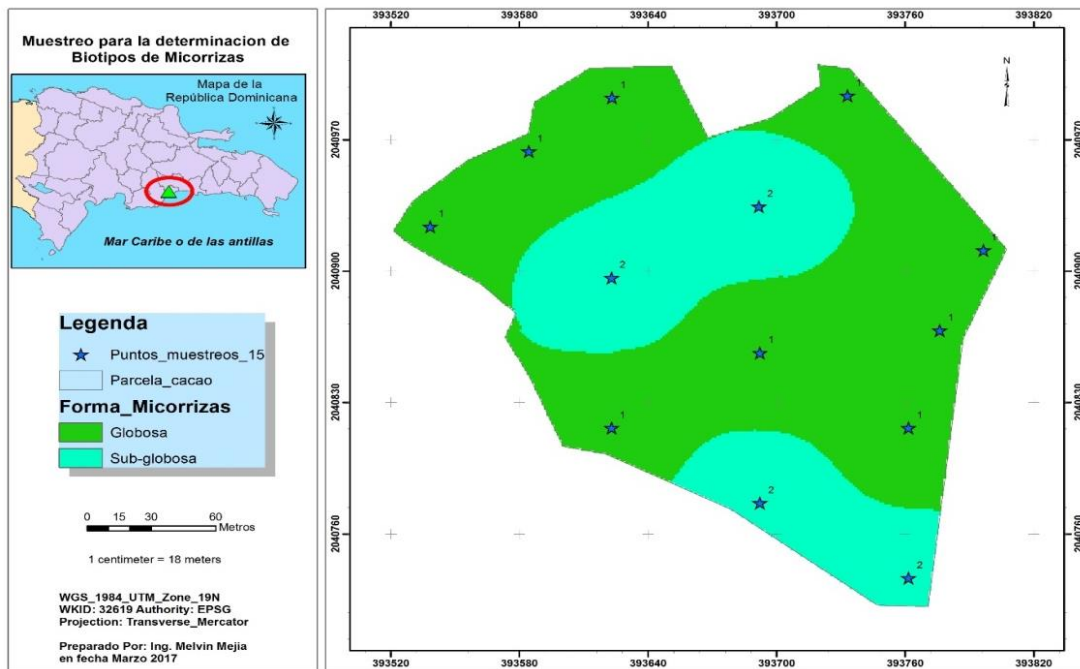


Figura 7. Ubicación de las esporas del hongo micorrízico según su forma.

La Figura 8, describe la ubicación de los géneros *Acaulospora* y *Glomus*, ambos descritos. Según la distribución de colores en el mapa el género *Acaulospora* está más ampliamente distribuido en el área de estudio.

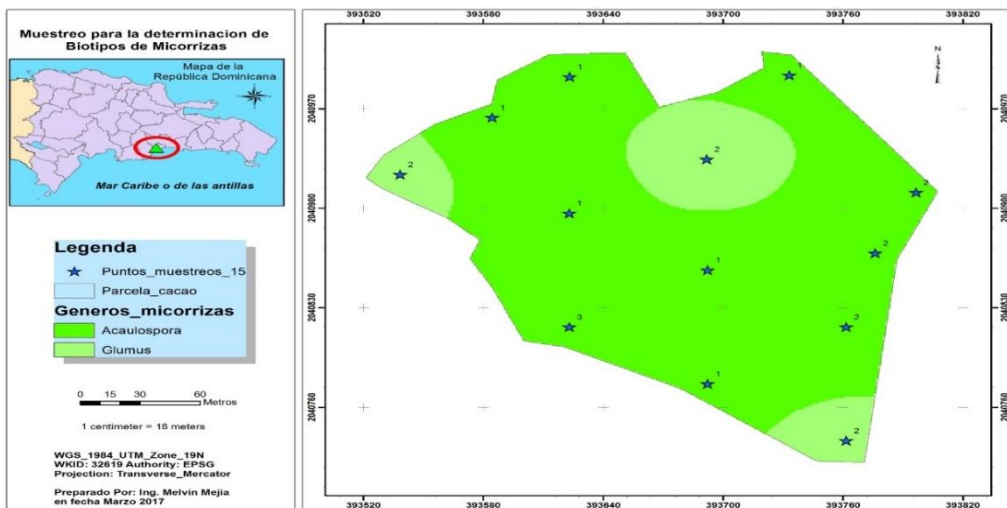


Figura 8. Ubicación de dos géneros de los tres descritos en este documento.

### Colonización de micorrízica en la tinción de raíces de cacao

Al evaluar la colonización de los hongos formadores de micorrizas arbusculares en las raíces del cultivo de cacao, se visualizaron varias estructuras similares a vesículas. Se puede observar formación de vesículas en el interior de las raíces de cacao (9a y 9b), pudiendo estas ser comparadas con la de Barrer (2009), en su revisión sobre los hongos HMA donde muestra vesículas observadas en raíces de palma de aceite y también coincide con los trabajos de Monroy *et al.* (2013), en coberturas de gramíneas y leguminosas, establecidas en suelos oxisoles. Las vesículas son estructuras de reserva que se forman en la parte terminal de las hifas y es característica de algunos géneros como *Glomus* y *Paraglomus*.

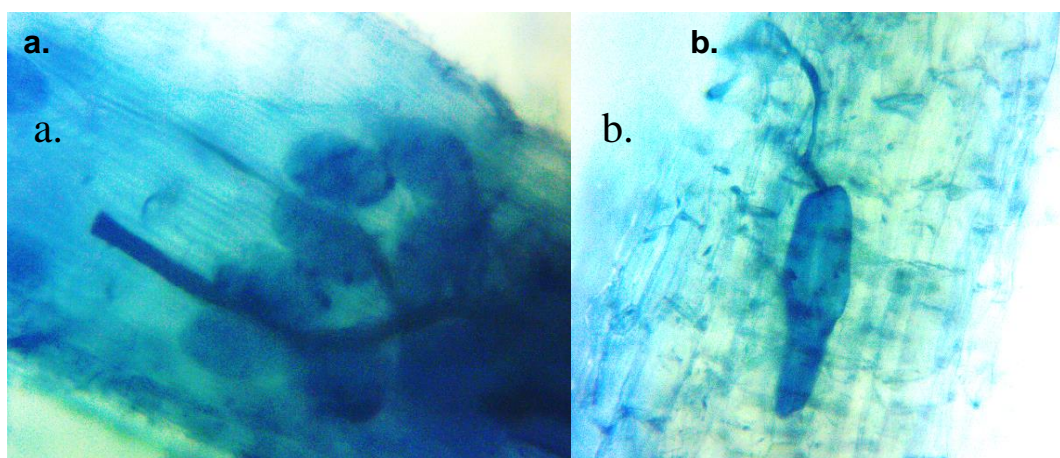


Figura 9. Estructura de vesículas en raíces de *Theobroma cacao* L. en: a. vesículas alargadas y b. vesículas más engrosada.

Además de vesículas en las raíces se observaron algunas estructuras las cuales se identifican como hifas intrarradicales,

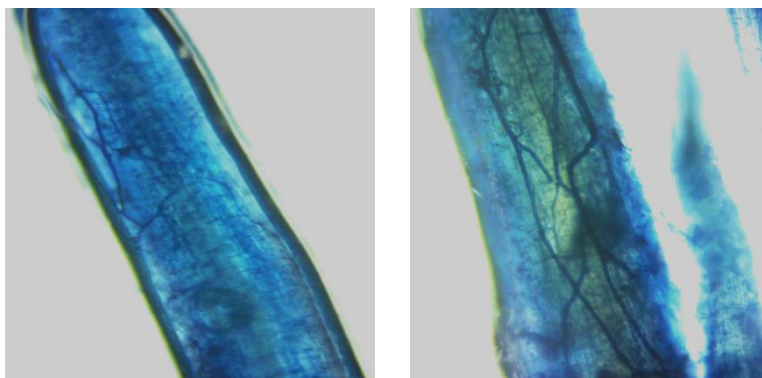


Figura 10, Monroy *et al.* (2013). Estas vesículas confirman los hallazgos mostrados anteriormente sobre las esporas del género *Glomus*

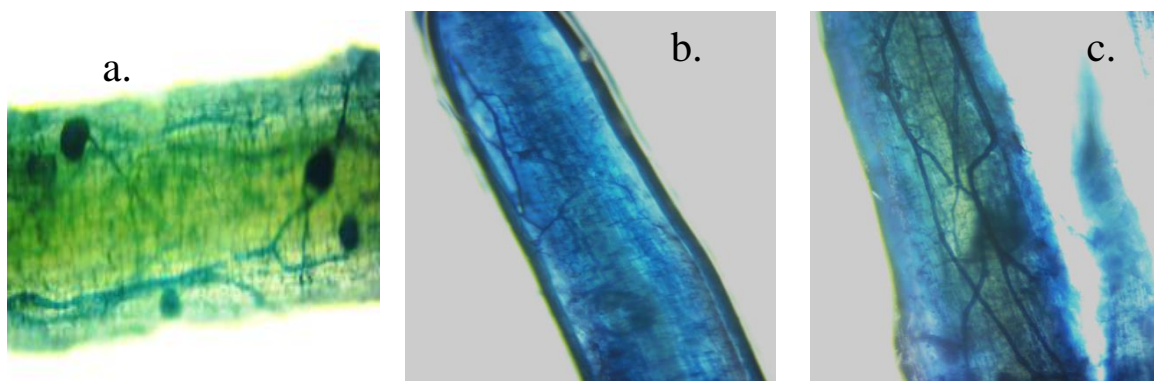


Figura 10. Estructuras similares a vesículas e hifas: a. vesículas, b. hifas, y c. vesículas e hifas.

### Localización geográfica de las vesículas e hifas en raíces

Conforme a las estructuras intrarradicales encontradas de los hongos micorrícicos arbusculares se observa en la Figura 111, que los colores representan los diferentes tipos de estructuras. El color verde representa las hifas intrarradicales y color amarillo, formación de vesícula, se observa en la distribución de los colores que las estructuras están más o menos de forma equitativa en el área de estudio.

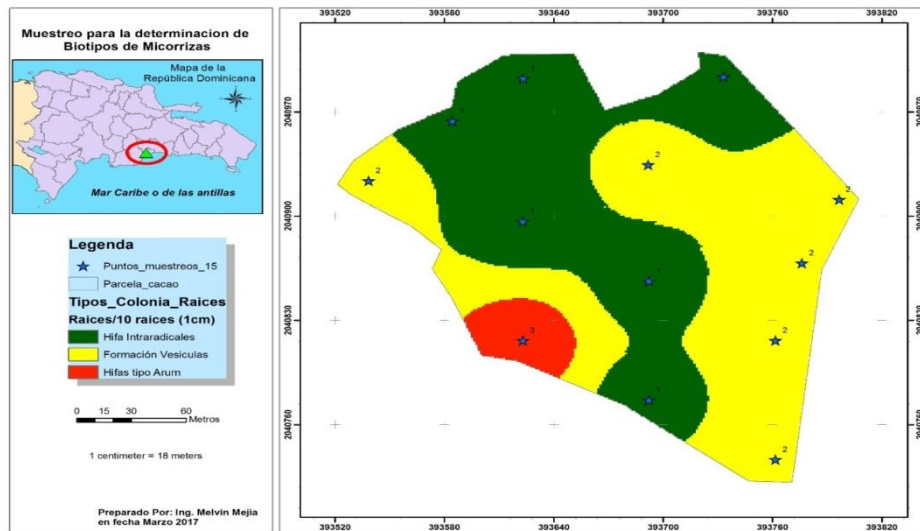


Figura 11. Localización de las estructuras observadas en raíces.

## Caracterización molecular de los hongos micorrícicos

Se observó en la Figura 12, que la muestra número 1 tiene una zona de amplificación para el género *Glomus* sp. El peso en pares de base fue de entre 150-100 bp. Esto coincide con reportes de Serralde y Ramírez (2004), quienes encontraron un producto de amplificación de aproximadamente 190 pb para el género *Glomus*, obtuvieron fragmentos de 188 pb. Para tres especies de *Glomus*. Esto indico que el ADN extraído de las muestras estaba también asociado al ADN fúngico de las micorrizas.

Pérez *et al.* (2012), en un estudio sobre diversidad de micorrizas arbusculares en pasto colosuana (*Bothriochloa pertusa* L.) A. Camus de fincas ganaderas del municipio de Corozal, Sucre en Colombia; hicieron aislamiento de micorrizas y todos los aislamientos el 96.9% correspondieron al género *Glomus* y 3.1% a *Gigaspora*.

Los resultados para la primera PCR para amplificar una región del ADNr 18S para determinar los glomerales no se observó amplificación. Es posible que esto se deba a que se debe mejorar y validar los métodos de extracción y colección de muestra ya que estas raíces al llegar al laboratorio estaban un poco necróticas impidiendo una mejor calidad del ADN. Además de cambiar el protocolo para raíces de pastos no mostraba una buena calidad del ADN, Figura 12.



Figura 12. Gel de agarosa al 1% donde se observa la banda encerrada en el círculo.

### Estimación cualitativa y cuantitativa mediante el conteo de esporas presentes en el suelo

En el conteo de esporas presentes en 10 gramos de suelo, que nos presenta la presencia o ausencia de las esporas por género, en el mismo cabe destacar que cuando el género *Glomus* está presente no se manifiesta presencia del género *Acaulospora*. En el conteo de las esporas para el género *Glomus* se observó un total de 51 esporas y para el género *Acaulospora* 24. La presencia de esporas se registró en todas las muestras de suelo. La prueba T evidenció un efecto significativo de la cantidad de esporas en el género *Acaulospora* comparados con la cantidad de esporas que aparecieron en el género *Glomus* en muestras de suelos, datos no mostrados.

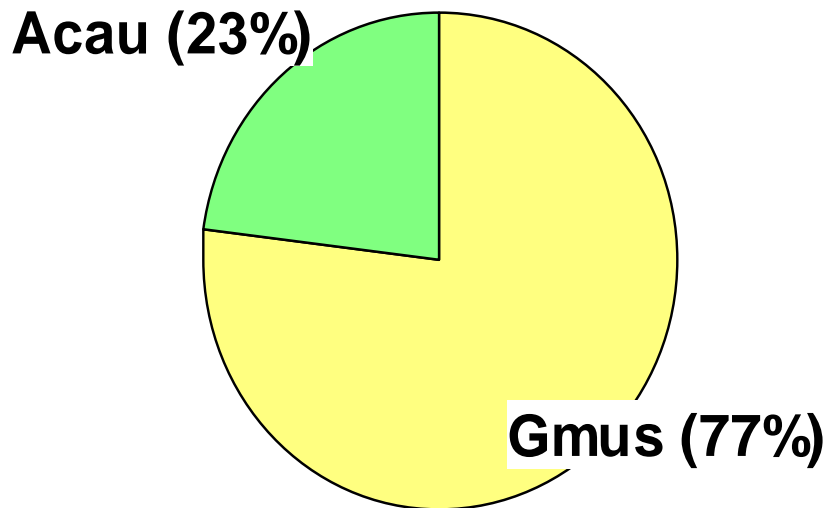
Tabla 1. Conteo de esporas en 10 g de suelo.

Muestras de suelo	P_esporas	<i>Glomus</i>	<i>Acaulospora</i>	Cantidad de esporas	Género
1	P	P	A	9	Gmus
2	P	P	A	5	Gmus
3	P	P	A	6	Gmus
4	P	A	P	6	Acau
5	P	P	A	4	Gmus
6	P	A	P	10	Acau
7	P	P	A	4	Gmus
8	P	P	A	7	Gmus
9	P	P	A	6	Gmus
10	P	P	A	4	Gmus
11	P	P	A	2	Glomus
12	P	P	A	4	Gmus
13	P	A	P	8	Acau

Acau = *Acaulospora*; Gmus = *Glomus*; P = presencia; A = ausencia.

La Figura 13, presenta un porcentaje de aparición de esporas por muestra de suelo en el género *Glomus* (77%) comparado al porcentaje obtenido en *Acaulospora* (23%). El valor promedio y la

mediana del porcentaje de infestación en raíces de plantas resultaron de 58.46 y 60 %, respectivamente. El valor mínimo y máximo fueron de 20 y 90 el máximo con una mediana de 60, una con una desviación estándar de 23.75 %.



**Figura 13.** Porcentaje de aparición esporas por muestra de suelo Gmus = *Glomus*; Acau = *Acaulospora*).

Se puede observar en la Figura 14, la muestra con mayor aparición de infestación por hongos micorrícicos arbusculares en raíces. En las muestras 8, 4 y 10 se presenta un nivel muy baja de infestación de HMA, mientras que el mayor nivel de infestación se registró en las muestras 3, 13, 1 y 6, respectivamente.

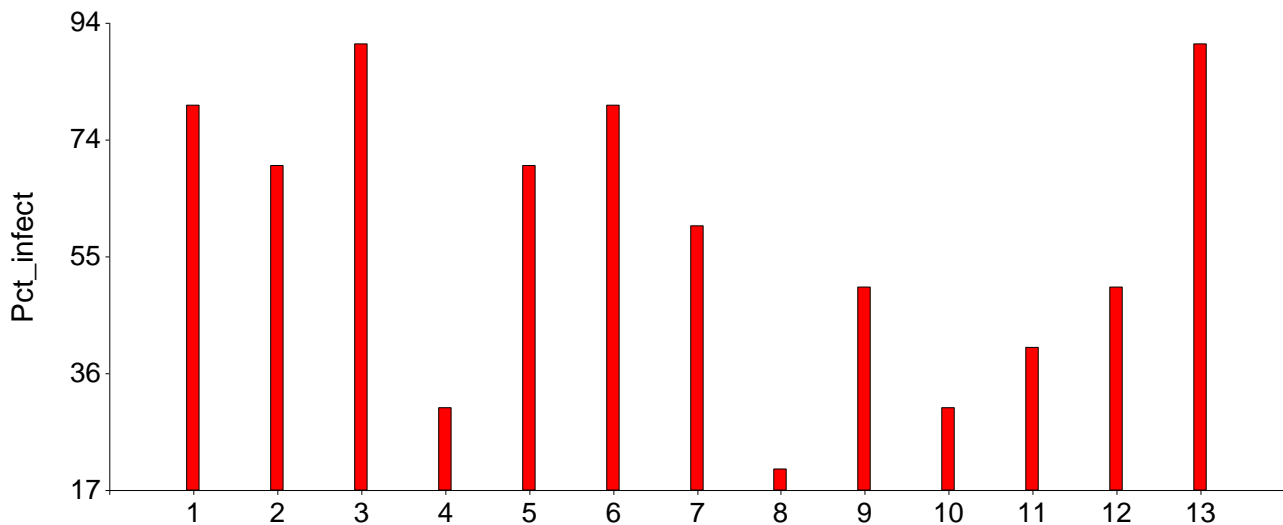




Figura 14. Porcentaje de infestación por hongos micorrícicos en muestras de raíz de 13 sitios de la colección de clones de cacao de la Estación Experimental Engombe.

## CONCLUSIONES

Se observó en base a la morfología realizada en espora la presencia de tres géneros diferentes *Glomus*, *Acaulospora* y *Gigaspora* de la colección de clones de cacao de la Estación Experimental Engombe. La presencia de hongos micorrícicos vesícula arbusculares son evidentes en la plantación de cacao de la finca experimental agrícola Engombe. En la prueba de PCR se observó la presencia del género *Glomus*.

Es necesario un estudio más a fondo en el análisis de la biodiversidad del suelo, para tener una idea más clara de las especies existentes en los suelos de cacao de la Estación Experimental Engombe. Se deben hacer estudios tomando en cuenta sobre el efecto de la sombra, llegar hasta especies de hongo micorrizicos arbuscular las diferentes asociaciones de las micorrizas en raíces de *Theobroma cacao*. Cada asociación tiene efectos distintos sobre el crecimiento de las plantas. Se recomienda utilizar diferentes oligonucleótidos para identificar otros géneros de HMA. Se recomienda secuenciar el producto de PCR, para observar un resultado más confiable sobre los géneros de hongos micorrícicos arbusculares presente en el cultivo de cacao en la República Dominicana.

## AGRADECIMIENTOS

Al Ministerio de Educación Superior Ciencia y Tecnología (Mescyt), por el financiamiento del proyecto “Producción de un biofertilizante con cepas autóctonas de micorrizas como alternativa para mejorar las pasturas en la ganadería de la Línea Noroeste”, a través del Fondo Nacional de Innovación y Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondocyt).

## LITERATURA CITADA

Augé, R. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11:3-42.

Barrer, S. 2009. El Uso De Hongos Micorrizicos Arbusculares Como Una Alternativa para la Agricultura. Bióloga, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, CO.

Camargo-Ricalde, S.; Montaña, N.; De la Rosa-Mera, C.; Montaña-Arias, S. 2012. Micorrizas: Una gran unión debajo del suelo.

Revista Digital Universitaria volumen 13 número 7. (En línea). Revisado el 20 de enero 2021. Disponible en:

<http://www.revista.unam.mx/vol.13/num7/art72/#up>

Cedaf (Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc., DO). 2009. Guía Técnica El Cultivo de Cacao. (En línea). Revisado el 20 de enero 2021. Disponible en: <http://www.cedaf.org.do/publicaciones/guias/download/cacao.pdf>

Doyle, J.; Doyle, J. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.

García-G., J.; Ocampo, J. 2002. Regulation of the Plant Defense Response in Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, 53(373): 1377-1386.

Gerdeman, J.; Nicolson, T. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 46: 235-244.

Guigón-López, C. 2007. Identificación molecular de cepas nativas de (*Trichoderma* spp.) su tasa de crecimiento in vitro y antagonismo contra hongos fitopatógenos. (En línea). Revisado el 20 de enero 2021. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/114404477/Tipos-de-PCR>

Klironomos J. 2003. Variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi. (En línea). Revisado el 20 de enero 2021. Disponible en: <https://esajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1890/02-0413>

Marcel, G.; Van der, H. 2003. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity (En línea). Revisado el 20 de enero 2021. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/32025105\\_Mycorrhizal\\_fungal\\_diversity\\_determines\\_plant\\_biodiversity\\_ecosystem\\_variability\\_and\\_productivity](https://www.researchgate.net/publication/32025105_Mycorrhizal_fungal_diversity_determines_plant_biodiversity_ecosystem_variability_and_productivity)

MARD (Ministerio de Agricultura, DO). 2020. Estadísticas. Página oficial MARD. (En línea). Revisado el 20 de enero 2021. Disponible en: <https://agricultura.gob.do/category/estadisticas-agropecuarias/>

Monroy, H.; Salamanca, C.; Cano, C.; Moreno-Conn, L.; Orduz-Rodríguez, J. 2013. Influencia de las coberturas en cultivos de cítricos sobre los hongos formadores de micorrizas arbusculares en Oxisoles del piedemonte llanero colombiano. *Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 14(1): 53-65. (En línea). Revisado el 20 de enero 2021. Disponible en: <http://revista.corpoica.org.co/index.php/revista/article/view/343>

Pérez, A.; Botero, C.; Cepero, M. 2012. Diversidad de micorrizas arbusculares en pasto colosuana (*Bothriochloa pertusa* (L) A. Camus de fincas ganaderas del municipio de Corozal-Sucre. Universidad de Sucre, Facultad de Ciencias Agropecuarias. *Rev. MVZ Córdoba* 17(2):3024-3032.

Phillips, J.; Hayman, D. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55 (1):158-161

Sieverding, E. 1983. Manual de métodos para la investigación de las M.V.A. en el laboratorio. CIAT. Cali. CO. (En línea). Revisado el 20 de enero 2021. Disponible en: [http://ciat-library.ciat.cgiar.org/ciat\\_digital/CIAT/books/historical/198.pdf](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/ciat_digital/CIAT/books/historical/198.pdf)

## Presencia de residuos de organofosforados y carbamatos en vegetales orientales en La Vega, República Dominicana

Pedro Núñez<sup>1,2\*</sup>, Maira Santana<sup>3</sup>, Ana Mejía<sup>3</sup>, Cecilio Cabral<sup>3</sup>, Juan Arias<sup>3,4</sup>, Glenny López-Rodríguez<sup>1</sup> y Leocadia Sánchez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Investigadores del Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (Idiaf), <sup>2</sup>Docente Cátedra de Suelos, Facultad de Ciencias Agronómicas y Veterinarias. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA) en la Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD) <sup>3</sup>Egresados Escuela de Ingeniería Agronómica, Facultad de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, UASD, <sup>4</sup>Ingeniero Agrónomo BIOVEGA, Ministerio de Agricultura

\*Autor para correspondencia: pnunez@idiaf.gov.do, pnunez58@gmail.com

Dirección: Calle Rafael Augusto Sánchez N° 89, Ensanche Evaristo Morales, Santo Domingo, República Dominicana.

### RESUMEN

La República Dominicana es un país pionero en la producción de vegetales orientales (VO) para exportación en Centroamérica y El Caribe, contribuyendo con los ingresos de divisas a la economía dominicana. Sin embargo, la presencia de residuos de plaguicidas es una barrera que limita su comercialización en los mercados internacionales, principalmente el mercado de los Estados Unidos de América. El objetivo de este estudio es determinar los tipos de residuos, moléculas y concentraciones de organofosforados y carbamatos, plaguicidas presentes en frutas de cundeamor hindú (*Momordica charantia* L.), berenjena china (*Solanum melongena* L.) y vainitas largas (*Vigna unguiculata* L.), provenientes de plantaciones de productores. Se cuantificó la concentración de moléculas de organofosforados y carbamatos en frutos de vegetales seleccionados mediante la extracción a través de bioensayo rápido para las moléculas en estudio. Se seleccionaron cinco plantaciones ubicadas en tres localidades del municipio de La Vega. En cada plantación se realizaron seis muestreos secuenciales (seis muestreos en cada una de tres localidades en cinco plantaciones) para un total de 90 muestras de vegetales procesadas por molécula. Los resultados arrojaron muestra con residuos de plaguicidas en berenjena china y en vainitas, mientras que en cundeamor no se encontraron residuos. En berenjena china, los valores estuvieron fuera del límite permitido y en el segundo fueron aceptables. Por tanto, se concluye que los productores de vegetales están realizando un buen uso de los productos agroquímicos aplicados, debido a que en general, las muestras no presentaron un grado preocupante de residuos.

*Palabras claves:* Vegetales orientales, plaguicidas, residuos, República Dominicana.

### ABSTRACT

The Dominican Republic is a pioneer country in the production of oriental vegetables (OV) for export in Central America and the Caribbean, contributing with foreign exchange earnings to the Dominican economy. However, the presence of pesticide residues is a barrier that limits its commercialization in international markets, mainly the market of the United States of America. The objective of this study is to determine the types of residues, molecules and concentrations of organophosphates and carbamates, pesticides present in fruits of Indian cundeamor (*Momordica charantia* L.), Chinese aubergine (*Solanum melongena* L.) and long beans (*Vigna unguiculata* L.), from plantations of producers. The concentration of organophosphate and carbamate molecules was quantified in selected vegetable fruits by extraction through rapid bioassay for the molecules under study. Five plantations located in three locations in the municipality of La Vega were selected. In each plantation, six

sequential samplings were carried out (six samplings in each of three locations in five plantations) for a total of 90 vegetable samples processed per molecule. The results showed a sample with pesticide residues in Chinese aubergine and green beans, while no residues were found in cundeamor. In Chinese eggplant, the values were outside the allowed limit and in the second they were acceptable. Therefore, it is concluded that the vegetable producers are making good use of the agrochemicals applied, because in general, the samples do not present a worrying degree of residues.

*Keywords: Oriental vegetables, pesticides, residues, Dominican Republic..*

## **INTRODUCCIÓN**

La utilización de productos fitosanitarios en cultivos hortofrutícolas es una actividad que constituye una barrera en el renglón de vegetales orientales o asiáticos (VO), debido a que las probabilidades de encontrar residuos de plaguicidas en alimentos vegetales se han incrementado, limitando su comercialización hacia mercados internacionales por ser considerado de alto riesgo para la salud humana, Burgos-Alonso (2015).

La comercialización de VO es una fuente importante de recurso económico en el sector agrícola de la República Dominicana. Para el país, la importancia económica y social crecía cada año, debido a que el subsector llegó a generar más de US\$100 millones al país, Idiaf 2017.

Según Madariaga (2016), el país fue pionero en Centroamérica y El Caribe en la producción de vegetales orientales, teniendo sus inicios en el año 1978, iniciado por residentes japoneses asentados en La Vega, en el centro de la República Dominicana. En sus comienzos, toda la producción de vegetales estaba orientada al mercado de los Estados Unidos de América, pero a partir del 1990 hasta 1996, ese país prohibió la entrada de vegetales dominicanos, debido a que repetidamente se encontraron concentraciones de residuos de químicos que excedían los límites permitidos (Adoexpo, 2021).

En el caso de la producción de VO con fines de exportación, se resalta que uno de los principales problemas de estos cultivos, son las aplicaciones de plaguicidas de amplio espectro de acción sin tomar en consideración productos selectivos, monitoreos sistemáticos, dosis y momentos de aplicación adecuados, SEA-IICA-CNC (2007).

La mayor parte de las especies producidas son originarias de la India, algunas de África y otras de América.

En reiteradas ocasiones embarques con vegetales orientales enviados desde República Dominicana, han sido decomisados y eliminados, en los puertos de entrada de los países importadores. Las razones principales de estos decomisos es la presencia de plagas prohibidas o detección de niveles no tolerables para la comercialización de residuos de plaguicidas en los productos agrícolas exportados. Según reporte de FDA (2006), exportaciones de unas 17 empresas fueron decomisadas por contener

residuos de plaguicidas como: dimethoate, methiocarb, chlorothalonil, methamidophos, cypermethrin, iprodione y triademenol.

Los residuos de plaguicidas a lo largo de la historia han sido encontrados en frutas y vegetales de exportación y en alimentos procesados. Los plaguicidas están presentes en los sistemas de producción agrícola, aunque muchas veces no son percibidos, Gevao *et al.* (2000). Se entiende por residuo de plaguicida, aquellas sustancias concretas que se encuentran en los alimentos, los productos agrícolas como resultados del uso de plaguicidas, Pozo (2013). La persistencia de los plaguicidas en el suelo varía con las propiedades del suelo y aspectos del manejo de los sistemas de producción que influirán en la naturaleza y el grado de la asociación suelo-pesticida, Gevao *et al.* (2000). Para tales fines es recomendable revisar lo establecido por la Organización Mundial de la Salud (2010) sobre los límites máximos de plaguicidas en productos agrícolas.

En República Dominicana, la información sobre la presencia, moléculas y concentraciones de plaguicidas presentes en VO es limitada. Este estudio tiene como objetivo determinar los tipos de residuos, las moléculas y sus concentraciones de plaguicidas presentes en cundeamor hindú (*Momordica charantia*), berenjena china (*Solanum melongena*) y vainitas largas (*Vigna unguiculata*) plantaciones de productores de La Vega.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Ubicación, período y manejo de las plantaciones**

Se seleccionaron quince fincas (tres / localidad) de productores de vegetales orientales, distribuidas en cinco localidades (Sabaneta, Rancho Viejo, Cabuyas, Los Guayos y El Pinito) en la provincia de La Vega, República Dominicana. Las fincas se seleccionaron de manera aleatoria, tomando en cuenta el concepto económico, social y el cultivo. La investigación se realizó en el periodo desde noviembre del año 2018 a enero 2019. Las plantaciones fueron manejadas de acuerdo a los criterios de los productores, en términos de manejo de plaguicidas, en coordinación con el personal técnico del Programa Preinspección del Ministerio de Agricultura de la República Dominicana.

### **Método de investigación: recolección de muestras**

Esta investigación fue de tipo descriptiva, no experimental. La presencia de residuos de pesticidas organofosforados y carbamatos se determinó en tres tipos de vegetales orientales: cundeamor hindú (*Momordica charantia*), berenjena china (*Solanum melongena*) y vainitas largas (*Vigna unguiculata*), mediante la extracción de la concentración a través de bioensayo rápido. Para esto se utilizaron muestras de vegetales colectadas a partir del primer corte y hasta la sexta cosecha, provenientes de las quince plantaciones seleccionadas para el estudio, realizando seis muestreos secuenciales para un total de 90 muestras de vegetales procesadas por molécula (180 muestras).

## **Método de extracción para bioensayo rápido y análisis de residuos de pesticidas**

El método de extracción de residuos de pesticidas se realizó mediante la obtención de las moléculas organofosforados y carbamatos mediante “método de bioensayo rápido” (RBPR). Las muestras colectadas en el campo fueron previamente identificadas con un código y número de muestreo y trasladadas al laboratorio. Una vez recibidas las muestras, fueron nuevamente identificadas con un código, con el número de secuencia de muestreo y se registraron en el laboratorio para su análisis. En la preparación de muestras se utilizaron cuatro tubos de cristal. En el tubo marcado con el número 1 fue colocada la muestra sin bromo (1), en el 2 la muestra con bromo, en el 3 la muestra con la enzima y en el 4 el buffer, esto para determinar la presencia de plaguicidas. A las muestras se les determinó la presencia de residuos y a las que resultaron positivas para organofosforados y carbamatos se les determinó tipos de plaguicidas, tipo de moléculas y concentración.

Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Residuos de Plaguicidas del Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF), utilizando la metodología descrita en el protocolo para bioensayo (Idiaf 2018a) y las muestras positivas se le realizó un análisis de 323 residuos de pesticidas en alimentos (multiresiduos) por cromatografía, analizadas por extracción y limpieza usando el método de QueEChERS y luego un análisis de detección de residuos de pesticidas mediante cromatografía líquida / espectrometría de masas / espectrometría de masas (LC/MS/MS) y cromatografía de gases / espectrometría de masas/ espectrometría de masas (GC/MS/MS) y se realizaron en el laboratorio del Centro de Tecnologías Agrícolas (Centa) del Idiaf en Pantojas, Santo Domingo Oeste, Idiaf 2018b.

## **Análisis y manejo de datos**

En el análisis de datos, se aplicó estadística no paramétrica, de tendencia central (promedios y porcentajes), usando Microsoft Excel, versión 2017.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Presencia de residuos de plaguicidas presentes en los tres VO**

#### **Cultivos de cundeamor hindú (*Momordica charantia*)**

El 96.7 % de las muestras analizadas de frutos de cundeamor hindú no presentó presencia de organofosforados y carbamatos, Tabla 1, resultando solo una muestra positiva (3.3 %) en la localidad de Sabaneta en la sexta semana de muestreo.

#### **Cultivo de berenjena china (*Solanum melongena*)**

El 96.7 % de las muestras de berenjena china analizadas presentaron contenidos por debajo de la inhibición de plaguicidas, Tabla 1. Sólo el 3.3 % de las muestras analizadas mostró la presencia de

plaguicidas organofosforados y carbamatos. Esto ocurrió en el sexto y último muestreo de campo, en la localidad El Pinito.

### Cultivo de vainitas largas (*Vigna unguiculata*)

El 100 % de las muestras analizadas de vainitas largas presentaron contenidos por debajo del nivel mínimo permitido de plaguicidas, Tabla 1, y detectable en el análisis de laboratorio. Por lo tanto, no hubo presencia de plaguicidas organofosforados y carbamatos. Esto se debe a que los productores utilizaron las dosis recomendadas y un tiempo de carencia apropiado, en la aplicación de los plaguicidas.

Tabla 1. Análisis de presencia de plaguicidas en los cultivos de cundeamor hindú, berenjena china y vainitas largas en las localidades de estudio.

Cultivo	Localidad	Tiempo de muestreo (Semanas)					
		S1	S2	S3	S4	S5	S6
Cundeamor hindú ( <i>Momordica charantia</i> )	Sabaneta	-	-	-	-	-	+
	Rancho Viejo	-	-	-	-	-	-
	Cabuyas	-	-	-	-	-	-
	Los Guayos	-	-	-	-	-	-
	El Pinito	-	-	-	-	-	-
Berenjena china ( <i>Solanum melongena</i> )	Sabaneta	-	-	-	-	-	-
	Rancho Viejo	-	-	-	-	-	-
	Las Cabuyas	-	-	-	-	-	-
	Los Guayos	-	-	-	-	-	-
Vainitas largas ( <i>Vigna unguiculata</i> )	El Pinito	-	-	-	-	-	+
	Sabaneta	-	-	-	-	-	-
	Rancho Viejo	-	-	-	-	-	-
	Las Cabuyas	-	-	-	-	-	-
	Los Guayos	-	-	-	-	-	-

S = Semanas; + = Presencia de plaguicidas, - = No presencia de plaguicidas.

Existe un riesgo importante para varios sectores de la población; por un lado, los productores y trabajadores que manejan agroquímicos y cosechan los productos agrícolas, y por otro los consumidores donde el sector más vulnerable lo constituyen los niños, Pérez *et al.* (2009).

De acuerdo con Severino (2003), los plaguicidas organofosforados cobraron auge después de la prohibición del uso de los plaguicidas organoclorados y han resultado ser muy eficientes y económicos en el control de plagas; sin embargo, pese a que son menos persistentes en el ambiente, no dejan de representar un riesgo para la salud humana y para el deterioro de los ecosistemas, sobre todo si no se manejan de manera adecuada.

En Bucaramanga, Colombia, se realizó un estudio en muestras de papa, cebolla, tomate, manzana, fresas y uvas. Se evaluó la presencia de clorpirifos, diazinon, disulfotón, metil paratión, malatión, profenofos y etión. En dicha determinación, se observó que el total de las muestras analizadas (35), contenía residuos de más de dos plaguicidas organofosforados (el 6 % de las muestras contenía residuos de 2 plaguicidas, el 17 % de 3, el 20 % de 4, el 46 % de 5 y el 11 % de 6); además para el plaguicida profenofos se excedió el MRL (Límite Máximo Residual) en más del 50 % de los casos, Murcia y Stashenko 2008. El manejo de las plantaciones y el tipo de plaguicidas aplicados influyen el tipo de moléculas que aparezcan en cada muestra, así como el periodo de carencia del producto, al momento de tomar la muestra.

Según Ortiz *et al.* (2003), la eliminación de los plaguicidas en los cultivos depende de diversos factores como el crecimiento propio del vegetal, la acción de agentes atmosféricos como viento, lluvia, el grado de solubilidad y volatilidad del plaguicida, el tipo de degradación química que sufra y la naturaleza del propio plaguicida. Otro factor importante es el intervalo de seguridad recomendado para cada plaguicida. A estos factores, se agrega el manejo de aplicaciones y dosis usadas a nivel de campo, así como los periodos de carencia antes de la cosecha.

Pérez *et al.* (2013) detectó que la presencia de residuos de plaguicidas en hortalizas y frutas es frecuente en México, con más del 50% en las muestras evaluadas con estudios específicos, en monitoreos de productos para consumo nacional y de exportación a Estados Unidos de América; aunque, la mayoría de los casos no rebasaron los límites máximos de residuos de plaguicidas (LMRP). En otros estudios realizados por Benítez-Díaz *et al.* (2015), se reporta la presencia de residuos de plaguicidas en cáscara de papa, mientras que Pérez (2009) reporta la presencia de organofosforados en brócoli. Otros estudios realizados por Benítez-Díaz *et al.* (2015) y Pérez (2009) muestran la evidencia de residuos en frutas y vegetales, es decir esto no es una novedad encontrar residuos en productos agrícolas, sin embargo esto debe servir de alerta y monitoreo para nuestros sistemas de producción.

García-Hernández *et al.* (2018), publican un análisis de los plaguicidas en México. Indican que actualmente se utilizan Plaguicidas Altamente Peligrosos (PAPs) en las zonas agrícolas del país, su uso histórico y actual se relaciona con efectos negativos en ecosistemas terrestres y costeros, se han reportado efectos en la salud de los trabajadores agrícolas y sus familias. Estos autores reportan una lista extensa de plaguicidas encontrados en cultivos agrícolas en México en concentraciones muy variables.

La situación es que para producir, el hombre utiliza plaguicidas diversos y esto podría causar daños a los consumidores. Por ejemplo, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO 2015) reportó que en el año 2013 se obtuvo una producción agrícola a nivel mundial de 23.34 billones de toneladas (t); para lo cual se aplicaron 1.29 millones de t de plaguicidas (insecticidas, herbicidas, fungicidas y bactericidas).



Del Puerto *et al.* (2014) e indican que la presencia de residuos de plaguicidas en alimentos se debe principalmente al uso indiscriminado de éstos en la agricultura. La eliminación de los plaguicidas depende de diversos factores como el crecimiento propio del vegetal, la acción de agentes atmosféricos como viento, lluvia, el grado de solubilidad y volatilidad del plaguicida, el tipo de degradación química que sufra y la naturaleza del propio plaguicida. Otro factor importante es el intervalo de seguridad recomendado para cada plaguicida.

En estudio realizado en Colombia por Murcia y Stashenko (2008), se observó que el total de las muestras analizadas (35), contiene residuos de más de dos plaguicidas organofosforados (el 6 % de las muestras contiene residuos de 2 plaguicidas, el 17 % de 3, el 20 % de 4, el 46% de 5 y el 11 % de 6); además para el plaguicida profenofos se excede el MRL (Límite Máximo Residual) en más del 50 % de los casos.

Leal-Soto *et al.* (2014), reportan la presencia de residuos de plaguicidas organoclorados en suelos agrícolas, los productos de mayor incidencia fueron DDE, endosulfán, clordano, heptacloro epóxido y endrín, productos algunos de uso en suelos dedicados a la producción de VO.

Serra *et al.* (2007) en un ensayo en vainitas chinas, en la finca de un productor en la provincia de La Vega, comparo ocho tratamientos, incluyendo el uso de thiametoxam (sistémico); carbosulfan (sistémico, 2x) sustituido por diafenthiuron (4x); etofenprox, pymetrozine; y lambda-cyhalothrin. Esto es evidencia del uso de plaguicidas en estos vegetales para el control de plagas.

## Moléculas y concentraciones de plaguicidas presentes en tres VO

### Cultivo de cundeamor hindú (*Momordica charantia*)

Dentro de los análisis realizados en cundeamor hindú para las moléculas carbamatos y organofosforados, se encontró las moléculas butocarboxim-sulfoxide, methomyl, thiamethoxam (Tabla 2), en la localidad de Sabaneta en el sexto muestreo, las cuales se encuentran por debajo del límite máximo de residuos (LMR) permitido por el Código Alimentario (Codex alimentarius).

Tabla 2. Moléculas encontradas en los análisis de muestras vegetales en cundeamor hindú.

Cultivo	Moléculas Identificadas	Concentración (ppm)
Cundeamor hindú ( <i>Momordica charantia</i> )	Butocarboxim-Sulfoxide	0.01
	Methomyl	0.45
	Thiamethoxam	0.02

Nota. PPM= Parte por millón, medida de concentración.

### Cultivo de berenjena china (*Solanum melongena*)

En los análisis realizados a las muestras de cundeamor hindú para moléculas químicas de carbamatos y organofosforados se encontró en una de las cinco localidades, en la sexta semana de evaluación una muestra contaminada con las moléculas, pymetrozine, oxamyl, methomyl, thiamethoxam, thiacloprid, ethiprole, bifenazate, haloxyfop-methyl, bentazone, isouron (Tabla 3), las cuales se encuentran por debajo del límite máximo de residuos (LMR) permitido por el Codex.

**Tabla 3.** Moléculas encontradas en los análisis en berenjena china.

Cultivo	Moléculas Identificadas	Concentración (ppm)
Berenjena china ( <i>Solanum melongena</i> )	Pymetrozine	0.03
	Oxamyl	0.01
	Methomyl	0.03
	Thiamethoxam	0.03
	Thiacloprid	0.01
	Ethiprole	0.04
	Bifenazate	0.01
	Haloxyfop-methyl	0.01
	Bentazone	0.19
	Isouron	1.41

ppm= Parte por millón, medida de concentración.

### Cultivo de vainitas largas (*Vigna unguiculata*)

De acuerdo con los resultados de los análisis realizados a las muestras de vainita larga, el 100 % de las mismas presentaron contenidos por debajo del límite máximo de residuos permitidos. Por esto, no fue necesaria la realización de un segundo análisis. Debido a los resultados obtenidos en el análisis de las muestras se podría decir que los productores de este rubro dan cumplimiento a las normas establecidas por el Codex para la producción de sus cultivos, ver tabla 3.

Piñeiro *et al.* (2007) en Venezuela, reportaron una mayor concentración (mg/g) aldrín (0.0088), lindano (0.0054) y o,p'-DDT (0.0035) en muestras de vegetales. El análisis estadístico demostró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) para la concentración de POC en los diferentes tipos y marcas comerciales de aceites vegetales. La concentración de lindano en el aceite de maíz (0.0125 mg/g), de cis-clordano (0.0091 mg/g) y aldrín (0.0287 mg/g) en el aceite de soya sobrepasaron los límites máximos

de residuos (LMRs) establecidos por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud (FAO/WHO). En conclusión, se detectó una elevada incidencia de residuos de POC en los aceites vegetales analizados.

Los trabajos de Pérez *et al.* (2013), Serra *et al.* (2007), Leal-Soto *et al.* (2014), Murcia y Stashenko (2008), Benítez-Díaz *et al.* (2015) y Pérez (2009), evidencia que las concentraciones de residuos de plaguicidas son muy variables, entre cultivos y países y depende de la concentración aplicada y manejo de las plantaciones y sobre todo al tiempo de carencia del producto, antes de la cosecha.

La intoxicación por plaguicidas organofosforados y carbamatos produce efectos residuales, sobre todo en el sistema nervioso central y en el periférico, así como en las funciones neuromusculares. Se ha documentado que ciertos plaguicidas están asociados con el desarrollo de cáncer, esterilidad y malformaciones congénitas y se presentan con frecuencia intoxicaciones moderadas y severas. El contacto con el plaguicida se da por aplicación directa, arrastre por el viento, por el agua o por tomarlo del suelo contaminado o de otras fuentes del ambiente Schosinsky *et al.* (2009). Sánchez-Bayo y Goka (2014), reportan un estudio sobre los residuos de plaguicidas y el riesgo para las abejas, es decir que los plaguicidas afectan el entorno y la salud de los ecosistemas.

Es de suma importancia determinar el grado de contaminación por plaguicidas de los productos agrícolas que se consumen, pues estos están expuestos a contaminación por fumigación directa, contaminación de los suelos y aguas de riego y, por lo general, son productos que se consumen sin un lavado adecuado y sin cocción, Schosinsky *et al.* (2009).

## CONCLUSIONES

Los productos carbamatos y organofosforados son ampliamente utilizados en la agricultura de la República Dominicana en el control de diversidad de plagas en múltiples rubros agrícolas, los cuales son comercializados sin ningún tipo de control. No siendo así en el caso de las exportaciones, las cuales se ven afectadas siempre que se encuentran residuos de plaguicidas prohibidos por encima de los niveles permitidos por lo cual se realizó esta investigación en donde se encontraron los tipos de moléculas en los cultivos de cundeamor hindú, fueron butocarboxim- sulfóxido, methomyl, thiamethoxam. En berenjena china se encontraron pymetrozine, oxamyl, methomyl, thiamethoxam, thiacloprid, ethiprole, bifentazate, haloxifop-methyl, bentazone, isouron y en vainita larga no se encontró ningún tipo de molécula. Las moléculas encontradas en las muestras analizadas no tienen una alta concentración, están por debajo de los LMR permitidos por la OMS. De las 90 muestras analizadas de cundeamor hindú, berenjena china y vainita larga buscando la presencia de residuos de plaguicidas (carbamatos y organofosforados), solo dos muestras mostraron la presencia de residuos con inhibición mayor de un 35 %.

## AGRADECIMIENTOS

A los ingenieros José Suriel, José Luis Almonte, José Manuel Monegro, Ramón Jiménez, Alexis Peguero de Los Santos, José Antonio de León y Laura García del Ministerio de Agricultura, del Programa Preinspecciona por el seguimiento las actividades de campo. Además, se agradece la colaboración de los 15 productores de VO por permitir el acceso a sus fincas y el muestreo de frutos en sus plantaciones; así como al personal técnico del laboratorio de Análisis de Residuos de Plaguicidas del Idiaf, por su colaboración en los análisis de organofosforados y carbamatos.

## LITERATURA CITADA

- Benítez-Díaz, P.; Miranda-Contreras, L.; Molina-Morales, Y.; Sánchez-Gil, B.; Balza-Quintero, A. 2015. Residuos de plaguicidas en la cáscara e interior de la papa (*Solanum tuberosum* L.) proveniente de una región agrícola del estado Mérida, Venezuela. *Bioagro*, 27(1): 27-36.
- Burgos, P. 2015. Estudio de estabilidad de plaguicidas en vegetales y frutas. Laboratorio de Residuos de Agroquímicos Costa Rica. *Pensamiento Actual* 15(25): 197-205. (En línea). Revisado el 16 de febrero del 2021. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5821467>
- Del Puerto, R.; Asela, M.; Suárez, T.; Susana, P.; Estrada, D. E. 2014. Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3): 372-387.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, IT). 2015. FAOSTAT. (En línea). Revisado el 24 de noviembre del 2020. Disponible en <http://www.fao.org/faostat/en/#home> 03/02/17.
- FDA (Food and Drug Administration, US). 2006. Residuos de plaguicidas en productos exportados desde Rep. Dom. (En línea). Revisado el 12 de enero del 2021. Disponible en: [www.fda.gov](http://www.fda.gov).
- García-Hernández, J.; Leyva-Morales, J.; Martínez-Rodríguez, I.; Hernández-Ochoa, M.; Aldana-Madrid, M.; Rojas-García, A.; Betancourt-Lozano, M.; Pérez-Herrera, P.; Perera-Rios, J. 2018. Estado actual de la investigación sobre plaguicidas en México. CONACYT.
- Gevao, B.; Semple, K.; Jones, K. 2000. Bound pesticide residues in soils: a review. *Environmental pollution*, 108(1): 3-14.
- Idiaf (Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales). 2017. Memoria IDIAF 2015. Santo Domingo, DO. 83p.
- Idiaf (Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales). 2018a. Proceso de bioensayo, recibimiento y análisis de muestra. La Vega, DO. 3p.
- Idiaf (Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales). Centa (Centro de Tecnologías Agrícolas). 2018b. Análisis de 323 Residuos de Pesticidas en Alimentos (Multiresiduos). Santo Domingo, DO. 17p.
- Leal, S.; Valenzuela, A.; Gutiérrez, M.; Bermúdez, M.; García, J.; Aldana, M.; Leyva, G. 2014. Residuos de plaguicidas organoclorados en suelos agrícolas. *Terra Latinoamericana*, 32(1): 1-11.
- Madariaga, G. 2016. Análisis de la Cadena de Valor de Vegetales Orientales en la República Dominicana. Programa Exportando Calidad e Inocuidad. Asociación Dominicana de Exportadores (ADOEXPO). USAIC, IESC. (En línea). Revisado el 16 de febrero del 2021. Disponible en: [https://adoexpo.org/es/assets/Informe\\_VegOrientales\\_ECI\\_3v.pdf](https://adoexpo.org/es/assets/Informe_VegOrientales_ECI_3v.pdf)
- Murcia, A.; Stashenko, E. 2008. Determinación de plaguicidas organofosforados en vegetales producidos en Colombia. *Agro sur*, 36(2): 71-81.

- OMS (Organización Mundial de la Salud). 2010. Código Internacional de Conducta Sobre la Distribución y Utilización de Plaguicidas (CICSDUP). Roma, Italia, Organización Mundial de la Salud. (En línea). Revisado el 16 de septiembre del 2018. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70602/WHO\\_HTM\\_NTD\\_WHOPE\\_S\\_2010.7\\_spa.pdf;jsessionid=E6919FBB7BDD8F1E3D314DAA6C95D238?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/70602/WHO_HTM_NTD_WHOPE_S_2010.7_spa.pdf;jsessionid=E6919FBB7BDD8F1E3D314DAA6C95D238?sequence=1)
- Ortiz, R.; Muñoz, S.; Del Campo, M.; Lechuga, D.; Torres, E. 2003. Consulta externa en instituciones de salud de Hidalgo, México, según la opinión de los usuarios. *Revista Panamericana de Salud Pública* 13: 229-238.
- Pérez, A.; Segura, A.; García, R.; Colinas, T.; Pérez, M.; Vázquez, A.; Navarro H. 2009 Residuos de Plaguicidas Organofosforados en Cabezuela de Brócoli (*Brassica oleracea*) Determinados por Cromatografía de Gases *Rev. Int. Contam. Ambient.* 25(2): 103-110.
- Pérez, M.; Navarro, H.; Miranda, E. 2013. Residuos de plaguicidas en hortalizas: problemática y riesgo en México *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 29: 45-64.
- Piñero, G.; Izquierdo, C.; Allara, C.; García, U. 2007. Residuos de plaguicidas organoclorados en 4 tipos de aceites vegetales. (En línea). Revisado el 24 de noviembre del 2020. Disponible en: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222007000400013&lng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222007000400013&lng=es)
- Pozo, L. 2013. Estudio de residuos de carbofurán y metamidofos en papa (*Solanum tuberosum*) consumida en la sierra ecuatoriana. Tesis para optar por el Título Profesional de Química de Alimentos. Carrera de Química de Alimentos. Universidad Central de Ecuador. 103 p. (En línea). Revisado el 24 de enero del 2021. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1864/1/T-UCE-0008-08.pdf>
- Sánchez-Bayo, F.; Goka, K. 2014. Pesticide residues and bees--a risk assessment. *PLoS One.* 2014; 9(4):1-16.
- Schosinsky, K.; Guzmán, E.M.Q.; Ruepert, C. 2009. Optimización de un método para la detección de carbamatos y organofosforados en vegetales. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 43(1): 11-20.
- SEA-IICA-CNC (Secretaría de Estado de Agricultura, SEA; Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, y Consejo Nacional de Competitividad). 2007. Estudio de la cadena agroalimentaria de vegetales orientales en la República Dominicana. República Dominicana, 62 p. (En línea). Revisado el 24 de octubre del 2018. Disponible en: <http://legacy.iica.int/esp/regiones/caribe/repdominicana/documents/cadenas%20agroalimentarias/cadena%20agroalimentaria%20de%20vegetales%20orientales.pdf>.
- Serra, C.; Medrano, S.; Ayala, C.; Galicia, J.; Baltensperger, S. 2007. Alternativas para el manejo de artrópodos en vegetales orientales en la República Dominicana, 43va Reunión Anual de la Sociedad Caribeña de Cultivos Alimenticios (CFCS). San José, CR. (En línea). Revisado el 24 de octubre del 2018. Disponible en: <https://ageconsearch.umn.edu/record/256301/files/10.pdf>
- Severino, J. 2003. Orígenes de la producción de los vegetales orientales (OPVO). Oficina Central Santo Domingo. (En línea). Revisado el 24 de agosto del 2018. Disponible en: <http://www.idiaf.gov.do/publicaciones/Publicaciones/Vegetalesorientales.IDIAF/HTML/files/assets/downloads/page0012.pdf>



# Instituciones Auspiciadoras



## Ministerio de Agricultura

Es la institución estatal responsable de formular y dirigir la política agropecuaria del país, de acuerdo con los planes generales de desarrollo. También es responsable de estudiar la situación agropecuaria del país y presentar a la consideración del Gobierno el plan global agropecuario a corto y largo plazo. Así mismo, coordina los programas a corto y largo plazo de las entidades vinculadas y relacionadas al sector.



## Consejo Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (CONIAF)

EL CONIAF es una institución descentralizada del gobierno Dominicano, que fortalece, estimula y orienta al Sistema Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Forestales - SINIAF. Ofrece financiamiento a través del fondo de investigación, fomentando el desarrollo de la capacidad científica y tecnológica en instituciones públicas y privadas.



## Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF)

El IDIAF es la institución estatal responsable de la ejecución de la política de investigación y validación agropecuaria y forestal de la República Dominicana.



## Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal (CEDAF)

El CEDAF es una organización privada sin fines de lucro que promueve el desarrollo sostenible del sector agropecuario y forestal, a través de la capacitación, información, innovación institucional y análisis de políticas y estrategias sectoriales, avalados por una imagen de excelencia institucional y alta credibilidad con el fin de estimular una agricultura competitiva que contribuya a reducir los niveles de pobreza y a proteger el medio ambiente.



Revista APF Volumen 10 (1) 2021  
Revista Científica Agropecuaria y Forestal