

Aislamiento de hongos endofíticos (*Trichoderma* spp. y *Fusarium* spp.) en cultivares de plátanos (*Musa* AAB y *Musa* AAAB) en la región norcentral de la República Dominicana

Socorro García¹, Ramón Jiménez², Domingo Reginfo³, Marisol Morel⁴ y Juan de Dios Moya⁵

Abstract

Plantain production represents one of the most economically important agricultural activities in the Dominican Republic. In 2015, the harvested area was 16,375 ha, with a production of 897,210 t. However, plantain cultivation is affected by the nematodes *Radopholus similis*, *Helicotylenchus multicinctus*, *Pratylenchus coffeae* and *Rotylenchulus reniformis*, which decrease yields and increase production costs. For their control, producers use synthetic chemicals, which leave residues in the harvest and pollute the environment. The objective of this study was to isolate endophytic fungi *Trichoderma* and *Fusarium* from healthy roots of bananas, with potential for the biocontrol of *R. similis*. A non-probabilistic exploratory sampling was carried out and 60 root samples were taken in 10 farms in the municipalities of Salcedo, Moca and La Vega, located in the north-central region of the Dominican Republic. The roots were washed, cut into pieces of 3 and 5 cm long and disinfested in commercial chlorine, at 2 % sodium hypochlorite. Then they were cut into segments of 1 to 1.5 cm, cut longitudinally and seeded in 10 % PDA with antibiotic. Four Petri dishes per sample were used, five pieces of root were placed on each plate, for a total of 1,200. The plates were incubated at 28 ± 2 °C. The isolation technology was validated and 300 colonies of endophytic fungi were obtained, of which 31 corresponded to *Trichoderma* spp. and 269 to *Fusarium* spp. It is recommended to evaluate in laboratory, greenhouse and field the effectiveness of endophytic isolates in the biocontrol of *R. similis* and an economic analysis.

Keywords: Endophytic fungi, *Trichoderma*, *Fusarium*, Nematodes, Pest Biocontrol, Dominican Republic.

Resumen

La producción de plátano representa una de las actividades agrícolas de mayor importancia económica en la República Dominicana. En el 2015, la superficie cosechada fue 16,375 ha, con una producción de 897,210 t. Sin embargo, el cultivo de plátano es afectado por los nematodos *Radopholus similis*, *Helicotylenchus multicinctus*, *Pratylenchus coffeae* y *Rotylenchulus reniformis*, los cuales disminuyen los rendimientos y aumentan los costos de producción. Para su control, los productores utilizan productos químicos sintéticos, los cuales dejan residuos en la cosecha y contaminan el medio ambiente. El objetivo de este estudio fue aislar hongos endofíticos *Trichoderma* y *Fusarium* de raíces sanas de plátanos, con potencial para el biocontrol de *R. similis*. Se realizó un muestreo exploratorio no probabilístico y se tomaron 60 muestras de raíces en 10 fincas en los municipios de Salcedo, Moca y La Vega, localizados en la región norcentral de la República Dominicana. Las raíces fueron lavadas, cortadas en trozos de 3 y 5 cm de largo y desinfestadas en cloro comercial, al 2 % de hipoclorito de sodio. Luego fueron cortadas en segmentos de 1 a 1.5 cm, cortados longitudinalmente y sembrados en PDA al 10 % con antibiótico. Se utilizaron cuatro platos Petri por muestra, en cada plato se colocaron cinco trocitos de raíz, para un total de 1,200. Los platos fueron incubados a 28 ± 2 °C. Se logró validar la tecnología de aislamiento y se obtuvieron 300 colonias de hongos endofíticos de los cuales 31 correspondieron a *Trichoderma* spp. y 269 a *Fusarium* spp. Se recomienda evaluar en laboratorio, invernadero y campo la efectividad de aislados endofíticos en el biocontrol de *R. similis* y un análisis económico.

Palabras clave: Hongos endofíticos, *Trichoderma*, *Fusarium*, Nematodos, Biocontrol de plagas, República Dominicana.

INTRODUCCIÓN

La producción de plátano representa una de las actividades agrícolas de mayor importancia económica en la República Dominicana. En el año 2015, la superficie cosechada fue de 16,375 ha (260,364 tareas), con la cual se obtuvo una producción de 897,210 toneladas. De esta producción, se exportaron 9,295.4 toneladas, las cuales generaron unos US\$ 5,325,172 (MA, 2015). Las regiones agropecuarias dedicadas a la producción son la norte con 48,010 ta, nordeste con 38,540 ta, noroeste con 20,504 ta, norcentral con 61,979 ta, central

con 13,763 ta, sur con 30,300 ta, noroeste con 33,465 ta y este con 13,802 ta.

Sin embargo, el cultivo de plátano en la República Dominicana es afectado por plagas y enfermedades, entre las que se encuentran los nematodos fitoparásitos *Radopholus similis*, *Helicotylenchus multicinctus*, *Pratylenchus coffeae*, *Rotylenchulus reniformis*, los cuales disminuyen los rendimientos y aumentan los costos de producción (SEA, 2005). Estos nematodos actúan des-

¹Investigadores del Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (Idiaf). ¹Estacion Experimental Cacaotera Mata Larga. Correo electrónico: ¹socorrogarcia@hotmail.com, ⁴marisolmorel25@hotmail.com, ²jimenezping@hotmail.com, ³rengisan@hotmail.com, ⁵jmoya@idiaf.gov.do,

truyendo el sistema radicular, reduciendo la captación de agua y nutrientes y ocasionando la caída de la planta (volcamiento), con esto, la pérdida de la cosecha (Charvarria e Irrizarry 1997 y Jesse Román 1978).

Para el control de los nematodos, los productores utilizan frecuentemente productos químicos sintéticos, los cuales dejan residuos en la cosecha y contaminan el medio ambiente (Castillo *et al.* 2010 y Araya, 2003). Se tiene la necesidad de buscar alternativas culturales y biológicas que sean inocuas y amigables con el medio ambiente, entre estas se incluyen el uso de enmiendas orgánicas y el control biológico utilizando microorganismos antagonistas como actinomicetos, bacterias y hongos (Castillo 2016). Dentro de estos hongos se encuentran especies de *Trichoderma* spp. las cuales han sido investigadas por su acción endofítica contra fitopatógenos (Pocasangre *et al.* 2004, Cassambai *et al.* 2012 y Morales 2014).

Los hongos endofíticos son organismos que viven en interacción biológica con las plantas, por lo general, no producen enfermedad en las plantas y se encuentran taxonómicamente relacionados con los hongos fitopatógenos (Carroll, 1988). Según Strobel y Daisy (2003) los hongos endofíticos producen ciertos compuestos bioactivos dentro de la planta que pueden proteger la planta de la invasión de patógenos.

Según Cháves *et al.* (2015) Bioversity International y colaboradores desarrollaron investigaciones en Costa Rica sobre diversas funciones de microorganismos endófitos de *Musa* spp. y su utilización en el sistema de producción de banano, para promover el desarrollo de las plantas y controlar por medio biológico las plagas y enfermedades. En esos estudios se identificaron 12 géneros de hongos endófitos donde *Trichoderma* spp. y *Fusarium oxysporum* fueron los más frecuentes.

Pocasangre *et al.* (2004) reportaron que plantas de banano (*Musa* AAA) y plátano (*Musa* AAB) protegidas con aislados de *Trichoderma* spp. presentaron mortalidades de *R. similis* entre 72 y 99%, en todos los estados larvales y adultos. De igual forma, Morales (2014) reportó que dos aislados de *Trichoderma atroviridae* fueron efectivos en el biocontrol de *R. similis* en banano (*Musa* AAA) y, además, incrementaron el peso fresco total de la planta y del sistema radicular al combinarse con otros hongos endofíticos.

Investigaciones realizadas por Cassambai *et al.* (2012), aplicando cepas endofíticas de *Trichoderma* spp. en vitroplantas y cosmoplantas, lograron un incremento vegetativo, el cual favoreció el aumento en la producción de la biomasa total de la planta. Según Meneses (2003), con la aplicación de hongos endofíticos se logró reducir la población de *R. similis* entre 47 y 84 %, de los cuales las reducciones más altas las representó el género *Fusarium*. Mejía *et al.* (2008) reportaron que hongos endó-

fitos aislados de los tejidos sanos de *Theobroma cacao*, tuvieron acción antagonista *in vitro* contra el fitopatógeno *Phytophthora palmivora*.

El objetivo de este estudio fue aislar hongos endofíticos *Trichoderma* spp. y *Fusarium* spp. de raíces aparentemente sanas de plantas de plátanos, para el biocontrol del nematodo fitoparásito *R. similis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó durante el periodo marzo a junio del año 2010. La misma se desarrolló dentro del proyecto "Mejoramiento de la Calidad de Vida de Comunidades Rurales en cuatro países de América Latina y el Caribe, a través de Innovaciones Tecnológicas en la Producción, Procesamiento Agroindustrial y Mercadeo del Plátano", con financiamiento del Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria (Fontagro).

Se realizó un muestreo exploratorio no probabilístico (Hernández *et al.*, 1998), donde se tomaron 60 muestras de raíces en 10 fincas plataneras de los municipios Salcedo (provincia Hermanas Mirabal), Moca (provincia Espaillat) y La Vega (provincia La Vega). En estas fincas, previo a la toma de las muestras, se aplicó una encuesta y se verificó que en las mismas no se utilizan productos biológicos comerciales a base de *Trichoderma* spp. Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Protección Vegetal del Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (Idiaf) en Mata Larga, San Francisco de Macorís, República Dominicana.

Selección de fincas

Se escogieron fincas con un área no menor a dos hectáreas y cultivadas de las variedades 'Macho por Hembra Intermedio' (MxHI) (AAB) y 'FHIA-21' (AAAB). En Salcedo fueron seleccionadas cuatro fincas, en Moca tres y en La Vega tres. Las localidades escogidas para el estudio en Moca fueron: Sabana, Los Jiménez, Las Uvas y El Aguacate; en Salcedo la zona de Villa Tapia y en La Vega la zona Benguete.

Recolección muestras de raíces

En cada finca se tomaron seis muestras de raíces en 18 plantas. Para esto, se delimitaron seis parcelas de 25 m x 20 m (500 m²), y dentro de cada parcela se tomaron 3 plantas recién paridas o florecidas. De las raíces de estas tres plantas se preparó una muestra compuesta. Las raíces se tomaron en el espacio (centro) entre la planta madre y el hijo (interface) a una profundidad de 30 cm. Para esto, se utilizó un palín de 28 cm de alto por 13 cm de ancho, según la metodología descrita por Araya (2002) y Speijer (1997). Las muestras fueron colocadas en bolsas plásticas, se identificaron y transportaron al laboratorio. El número de fincas muestreadas y el nú-

mero de muestras tomadas por municipio se presentan en la Tabla 1.

Procesamiento de muestras y aislamiento de endofíticos.

Las muestras se procesaron con la metodología utilizada por Pocasangre *et al.* (2000). Se seleccionaron raíces aparentemente sanas, las cuales fueron lavadas con agua de llave para eliminar los residuos de suelo. Posteriormente, de las raíces principales se tomaron 30 raíces funcionales por muestra, las cuales fueron cortadas en trozos de 3 y 5 cm de largo, y se colocaron en un frasco de vidrio previamente esterilizado en autoclave a 121 °C durante 30 minutos, para ser desinfectadas. La desinfección se realizó por inmersión en cloro comercial, hipoclorito de sodio al 2 %, durante tres minutos agitando periódicamente. Cumplido el tiempo, se eliminó el cloro y se pasaron tres veces por agua destilada estéril por tres minutos en cada lavada. Luego se colocaron en un papel servilleta estéril por tres minutos para eliminar el exceso de humedad y fueron cortadas en los dos extremos, utilizando una pinza y un bisturí, hasta dejar segmentos de aproximadamente de 1 a 1.5 cm, (Figura 1a). Estos segmentos de raíces fueron cortados longitudinalmente y sembrados en PDA (medio de culti-

vo a base de papa dextrosa agar) al 10 % con antibiótico (amoxicilina 2 ml/litro) y ácido láctico al 85 % (30 gotas/litro), en platos Petri, (Figura 1b). Se utilizaron cuatro platos Petri por muestra, y en cada plato se colocaron cinco trocitos de raíz, para un total de 20 trocitos por muestra y 1,200 trocitos en el estudio. Los platos fueron incubados a 28± 2 °C, hasta que se observó crecimiento de los micelios, los cuales fueron purificados realizando nuevos cultivos con puntas de hifa. Los hongos endofíticos aislados fueron identificados morfológicamente con las claves de Samuels (2004) y Watanabe (2002).

Variables evaluadas.

Entre cinco y ocho días después de la siembra, se evaluó la cantidad de hongos endofíticos *Trichoderma* spp. y *Fusarium* spp. aislados por variedad y por municipio.

Conservación de los aislados *Trichoderma* y *Fusarium*.

Entre 10 y 15 días después del cultivo de los aislados, se realizaron recolectas de las esporas con tiras de papel filtro estéril de 0.5 cm x 3.0 cm, y se conservaron en microtubos de 2 ml en la nevera a una temperatura de 4 °C.

Tabla 1. Cantidad de muestras tomadas y fincas muestreadas por municipio.

Municipio	Número de fincas muestreadas	Número de muestras
Salcedo	4	24
Moca	3	18
La Vega	3	18
Total	10	60

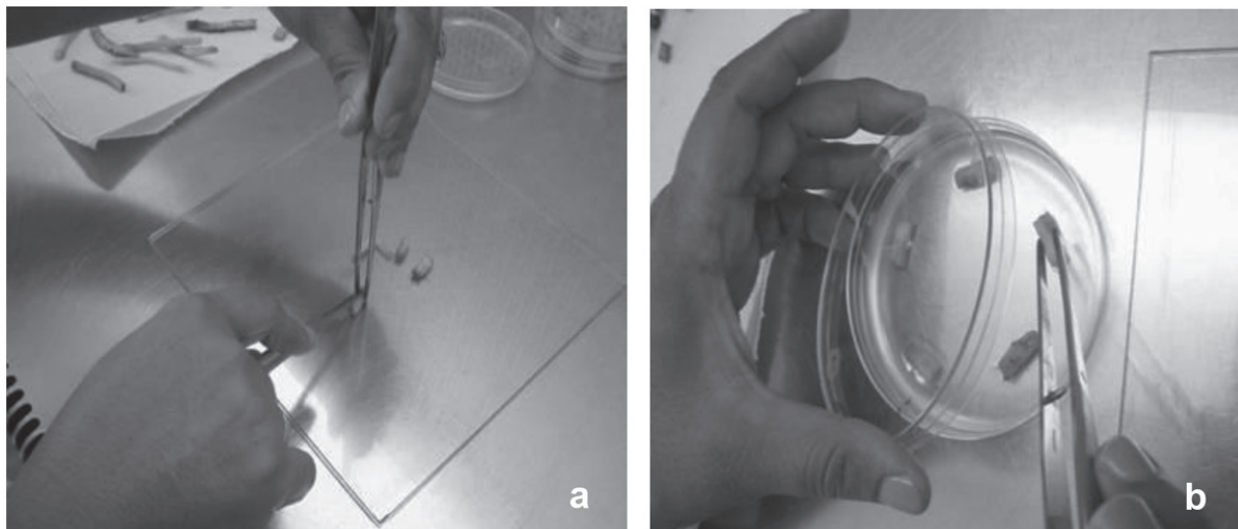


Figura 1. Preparación de raíces de plátano para el aislamiento de hongos endofíticos. Corte longitudinal (a) y colocación en medio de cultivo PDA (b)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los 1,200 trocitos de raíces sembrados, crecieron 574 (47.8%) colonias de hongos, de las cuales 31 correspondieron al género *Trichoderma*, 269 a *Fusarium* y 274 a otros géneros no identificados, Figura 2. Estos porcentajes son superiores a los encontrados por Salazar *et al.* (2005) en el cultivo de rosas, quienes con 560 subfragmentos sembrados obtuvieron 92 colonias (16,4 %) de hongos endófitos.

De los 31 aislados de *Trichoderma* spp., ocho (8) se obtuvieron en muestras de raíces de plátano tomadas en Salcedo, 21 en Moca y dos (2) en La Vega, mientras que, de los 269 aislados de *Fusarium* spp., 110 se obtuvieron en muestras recolectadas en Salcedo, 83 en Moca y 76 en La Vega, Figura 3.

Como puede observarse, en los tres municipios estudiados se aislaron hongos endófitos *Trichoderma* spp. y *Fusarium* spp. Resultados similares fueron encontrados por Pocasangre *et al.* (2000) en el cultivo de banano en todas las localidades de los países estudiados.

En las dos variedades de plátano se encontraron cantidades similares de *Fusarium* (130 colonias en 'MxHI' y 139 colonias en 'FHIA-21'), sin embargo, respecto a *Trichoderma*, en la variedad 'FHIA-21' se obtuvieron 21 colonias, algo más del doble de colonias que en la variedad 'MxHI' en la cual se aislaron 10 colonias, Figura 4.

De los 31 aislados de *Trichoderma* spp. 25 se encuentran conservados, Figura 5, y de *Fusarium* spp. 56, del cual en la Figura 6 se presentan algunos aislados.

CONCLUSIONES

En los municipios estudiados de Salcedo, Moca y La Vega, se aislaron 300 colonias de hongos endófitos de los cuales 31 correspondieron a *Trichoderma* spp. y 269 a *Fusarium* spp.

En la variedad 'FHIA-21' se obtuvo mayor cantidad de aislados de *Trichoderma* spp.

En Moca se aisló la mayor cantidad de *Trichoderma* spp., y en Salcedo la mayor cantidad de *Fusarium* spp.

RECOMENDACIONES

Evaluar en laboratorio, invernadero y campo la efectividad de los aislados endófitos en el biocontrol del nematodo *R. similis* y otros nematodos de importancia económica en la familia de las musáceas, tomando en consideración el análisis económico.

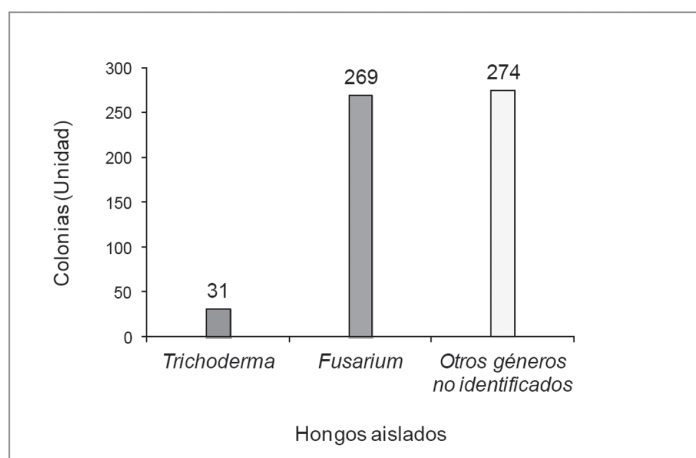


Figura 2. Hongos endófitos aislados de muestras de raíces de plátano.

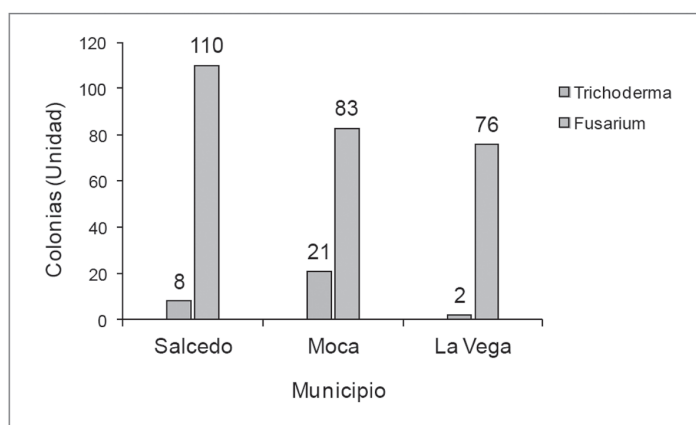


Figura 3. *Trichoderma* spp. y *Fusarium* spp. endófitos aislados de raíces de plátano, según municipio.

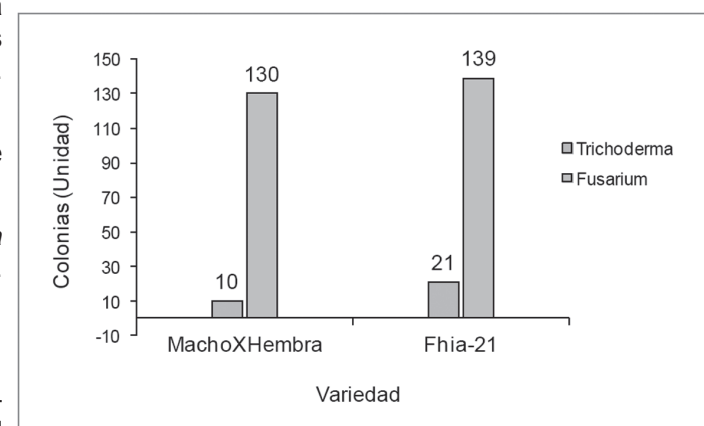


Figura 4. *Trichoderma* spp. y *Fusarium* spp. endófitos aislados de raíces de plátano según variedad.

Identificar morfológica y molecularmente los aislados de *Trichoderma* spp. y *Fusarium* spp.

Realizar estudios más ampliados para determinar si el factor variedad de plátano se correlaciona o influye con la cantidad de *Trichoderma* aislados.



Figura 5. Aislados endofíticos de *Trichoderma* spp.

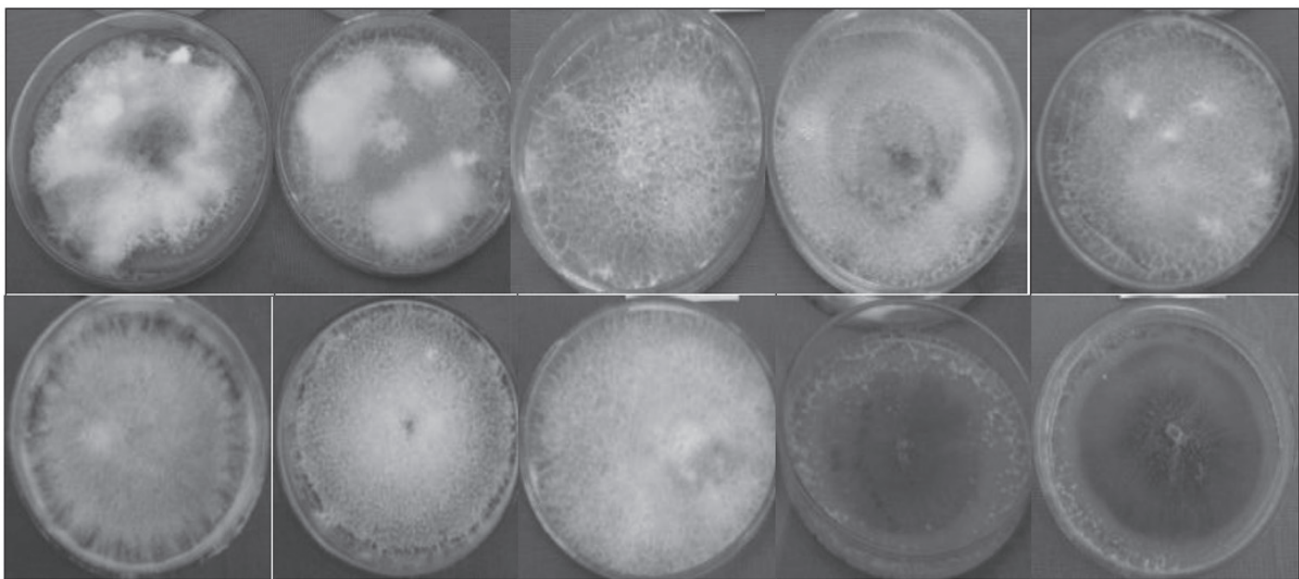


Figura 6. Aislados endofíticos de *Fusarium* spp.

LITERATURA CITADA

Araya, M. 2003. Situación actual del manejo de nematodos en banana (*Musa* AAA) y plátano (*Musa* AAB) en el trópico americano. En: Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos. Eds. Galileo Rivas y Franklin Rosales, INIBAP. Turrialba, CR. 79 p.

Araya, M. 2002. Metodología utilizada en el laboratorio de Corbana S. A. para la extracción de nematodos de las raíces de banana (*Musa* AAA) y plátano (*Musa* AAB). (En línea). Revisado el 15 de noviembre 2018. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/288946065_Metodologia_utilizada_en_el_Laboratorio_de_Nematologia_de_CORBANA_SA_para_la_extraccion_de_nematodos_de_las_raices_de_banano_Musa_AAA_y_platano_Musa_AAB.

Castillo, J.; Araya, M.; Patiño, L. 2010. Respuesta a la aplicación de nematicida en banana en la zona de Urabá, Colombia. *Agronomía mesoamericana* 21(2):307-317.

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, Recinto Mayagüez, PR. 125 p.

Carroll, G. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *University of Oregon. Ecology* 69 (1): 2-9.

Cassambai, E.; Lekidayo, L.; Pocasangre, L. 2012. Uso de hongos endofíticos como promotores de crecimiento en el cultivo de banana. *Tierra Tropical* 8 (1): 9-18.

Chaves, N.; Schilly, A.; Salcedo, A.; Dita, M.; Staver, C. 2015. Marchitez por *Fusarium* en Costa Rica. Resultados de Investigación. III Congreso Latinoamericano y del Caribe de Plátanos y Banano. (En línea). Revisado el 15 de noviembre 2018. Disponible en: <http://banana-networks.org/musalac/files/2015/09/8-N-Chaves-Marchitez-por-Fusarium-en-Costa-Rica.pdf>

Chavarría-Carvajal, J.; Irizarry, H. 1997. Rates, application intervals and rotation of four granular pesticides to control nematodes and the corm-weevil (*Cosmopolites sordidus* Germar) in plantain. *The Journal of Agriculture, University of Puerto Rico* 81(1-2):43-52.

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 y 226.

- MA (Ministerio de Agricultura, DO). 2015. Departamento de Seguimiento, Control y Evaluación. Estadística, siembra, cosecha, producción y rendimientos. Cuadros 3.3 y 5.1.6. Santo Domingo, DO. (En línea). Revisado el 15 de noviembre 2018. Disponible en: <http://www.agricultura.gob.do/index.php/estadisticas/siembra-cosecha-produccion-y-rendimientos/category/100-2-siembra-cosecha-produccion-y-rendimientos?download=573:2-1-consolidado-nacional-de-s-c-y-p-enero-noviembre-2017>
- Meneses, A. 2003. Utilización de hongos endofíticos provenientes de banano orgánico para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* Cobb, Thorne. Tesis en: Magister en Scientiae. Centro Agronómico tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, CR. 89 p.
- Mejía, C.; Rojas, I.; Maynard, Z.; Van Bael, S.; Arnold, E.; Hebbbar, P.; Samuels, J.; Robbins, N.; Herre, A. 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control* 46: 4-14.
- Morales, G. 2014. Bioprospección de hongos endofitos para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorne en el cultivo del banano. Tesis en: Magister en Gestión de Recursos Naturales y Tecnologías de Producción. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Campus Cartago, CR. 54 p.
- Pocasangre, L.; Zum Felde, A.; Meneses, A.; Cañizares, C.; Riveros, A.; Rosales, F.; Skora, R. 2004. Manejo alternativo de fitonematodos en banano y plátano. XVI Reunión Internacional de ACORBAT, Oaxaca, MX. 111 p.
- Pocasangre, L.; Sikora, R.; Vilich, V.; Schuster, R. 2000. Encuesta sobre los hongos endofíticos del banano de América Central y el criado para el control biológico del nematodo barrenador (*Radopholus similis*). *La Revista Internacional sobre Banano y Plátano*. Infomusa 1 (9): p 3-5.
- Román, J. 1978. *Fitonematología Tropical*. Universidad de Puerto Rico. Recinto Universitario de Mayagüez, Colegio de Ciencias Agrícolas, Estación Experimental Agrícola. Río Piedras, PR. 95 p.
- SEA (Secretaría de Estado de Agricultura, DO) 2005. Proyecto de apoyo a la transición competitiva Agroalimentaria. Diseño e Implementación del Sistema Nacional de Vigilancia, Notificación y Monitoreo Fitosanitario. Santo Domingo, DO. 18 p.
- Samuels, G. 2004. *Trichoderma: a guide to identification and biology*. United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. Systematic Botany and Mycology Laboratory. Beltsville, MD. 40 p.
- Speijer, P.; De Waele, D. 1997. Screening of *Musa* Germplasm for resistance and tolerance to nematodes. INIBAP Technical Guidelines. Montpellier, FR. (En línea). Revisado el 15 de noviembre 2018. Disponible en: https://www.bioversityinternational.org/uploads/tx_news/Screening_of_Musa_germplasm_for_resistance_and_tolerance_to_nematodes_241.pdf
- Strobel, G.; Daisy, B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol R.* 67 (4): 491-502.
- Watanabe, T. 2002. Pictorial atlas of soil and seed fungi. Morphologies of cultured fungi and key to species. Second Edition. CRC press, Lewis Publishers. 486 p. (En línea). Revisado el 15 de noviembre 2018. Disponible en: http://fmedicine.ajums.ac.ir/_fmedicine/Documents/Pictorial%20Atlas%20of%20Soil%20and%20Seed%20Fungi%20Morphologies%20of%20Cultured%20Fungi%20and%20Key%20to%20Species%20Second%20Edition_20130415_103243.pdf