

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

Birmania Wagner^{1*}, Elfrida Pimentel^{2a}, Iris Marcano^{2b}, Chery Kabe³, Benitho Colin³ y Pedro Núñez⁴

^{1*}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). ²Coinvestigadores. Docentes de la ^aFacultad de Ciencias Escuela de Microbiología y de la ^bFacultad de Ciencias Agronómicas y Veterinarias. Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD). ³Graduados de ingenieros agrónomos de la Escuela de Ingeniería Agronómica de la Facultad de Ciencias Agronómicas y Veterinarias. Universidad Autónoma de Santo Domingo (UASD). ⁴Investigador 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.

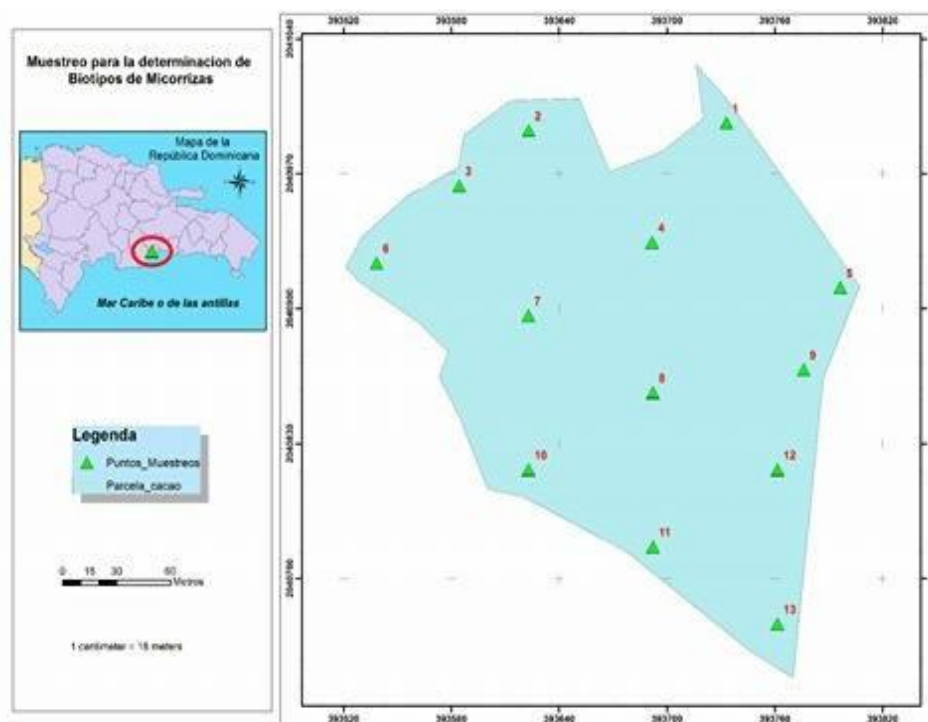


Figura 1. Ubicación de la Estación Experimental Engombe detallando los puntos de muestreo. Elaborado por el autor.

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 “Jenness 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 μ 38 μ . 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 μ , 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 cuadrículada. 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 H₂O 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 oligonucleótidos 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 H₂O 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).

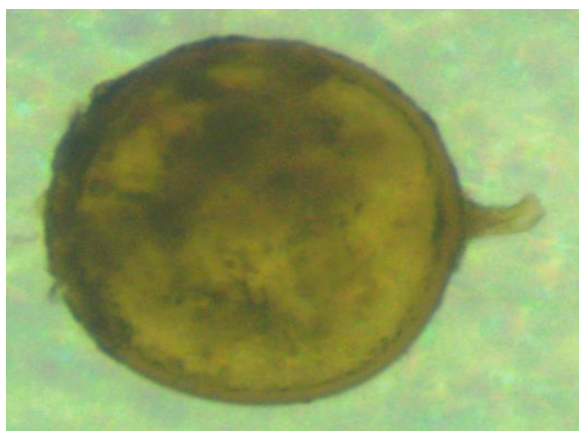


Figura. 3. Espora de forma globosa amarillo oscuro, presenta dos paredes similares al género *Glomus* sp.

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 espore 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.

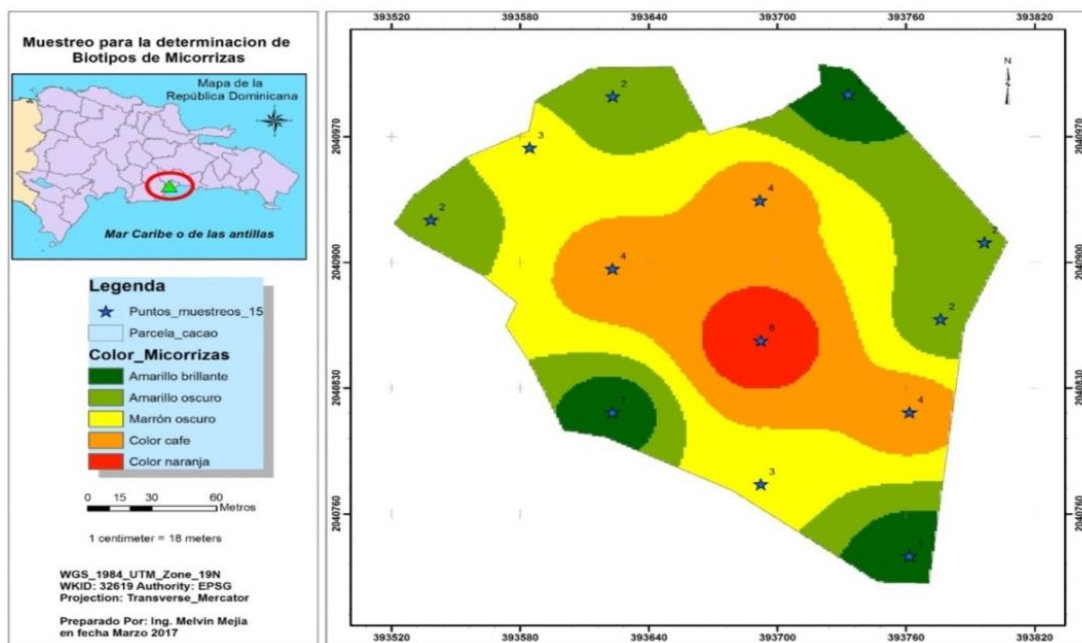


Figura 6. Ubicación de las esporas en el suelo según su color.

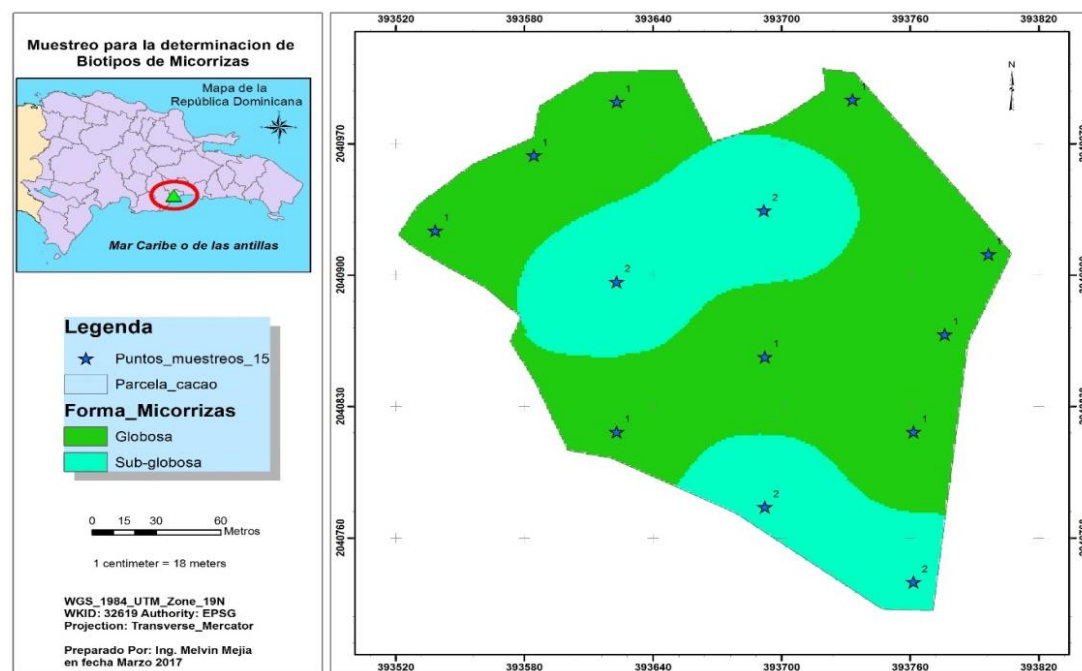


Figura 7. Ubicación de las esporas del hongo micorrízico según su forma.

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.

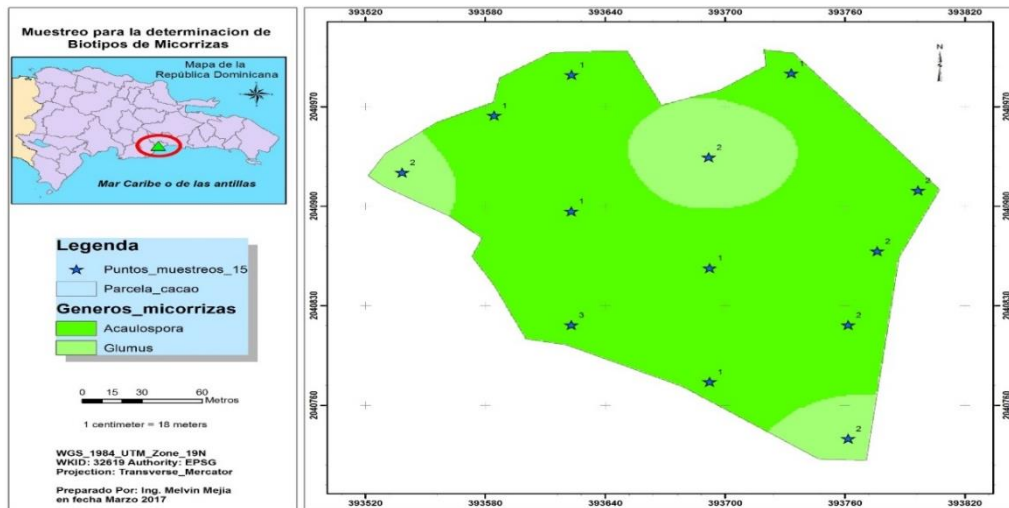


Figura 8. Ubicación de dos géneros de los tres descritos en este documento.

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*.

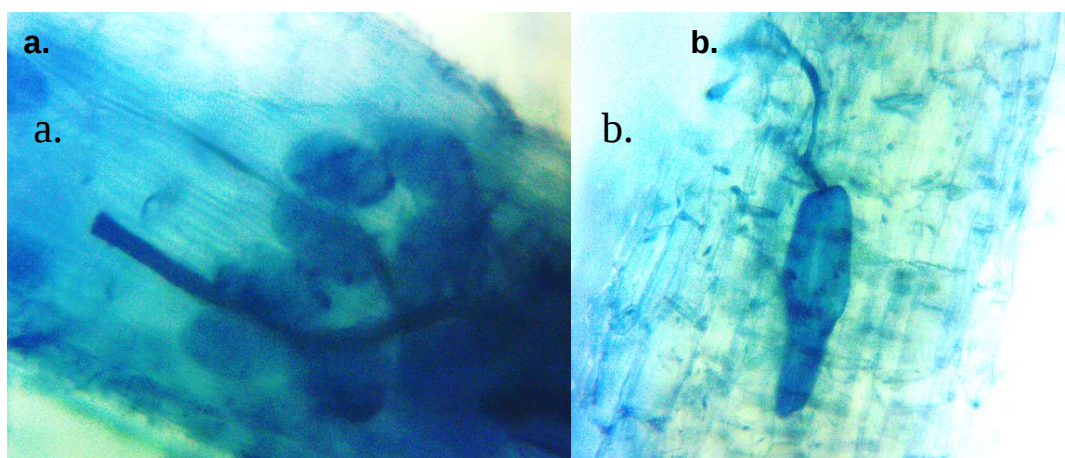


Figura 9. Estructura de vesículas en raíces de *Theobroma cacao* L. en:
a. vesículas alargadas y b. vesículas más engrosadas.

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

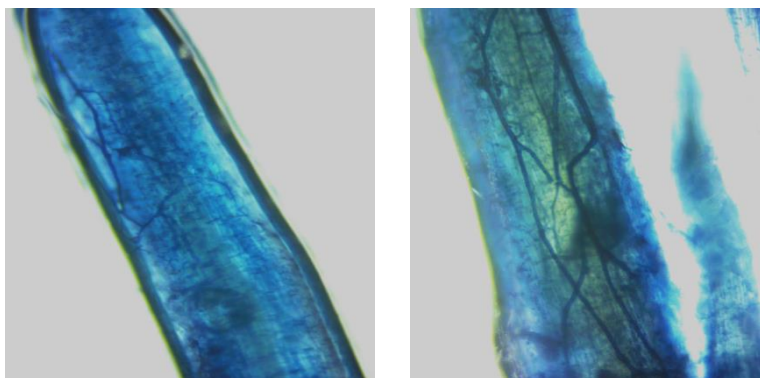


Figura 10, Monroy *et al.* (2013). Estas vesículas confirman los hallazgos mostrados anteriormente sobre las esporas del género *Glomus*

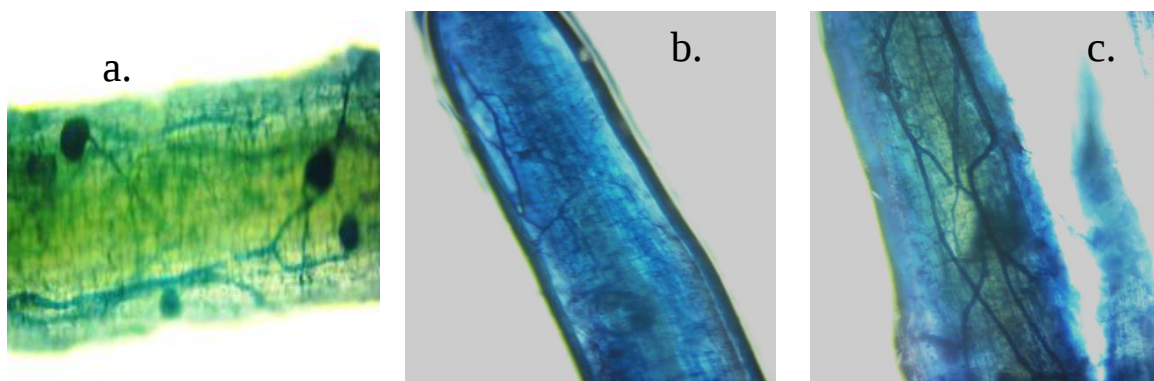


Figura 10. Estructuras similares a vesículas e hifas: a. vesículas, b. hifas, y c. vesículas e hifas.

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.

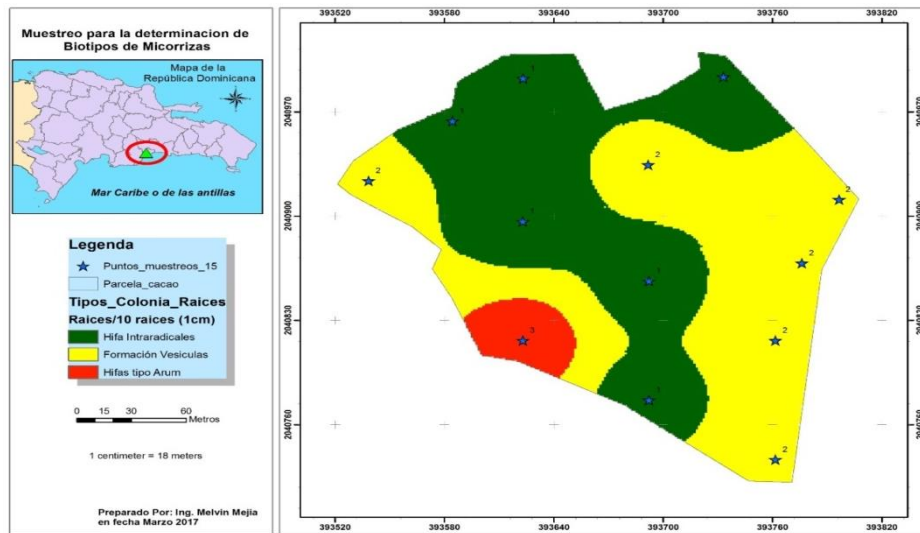


Figura 11. Localización de las estructuras observadas en raíces.

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 indica 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 %.

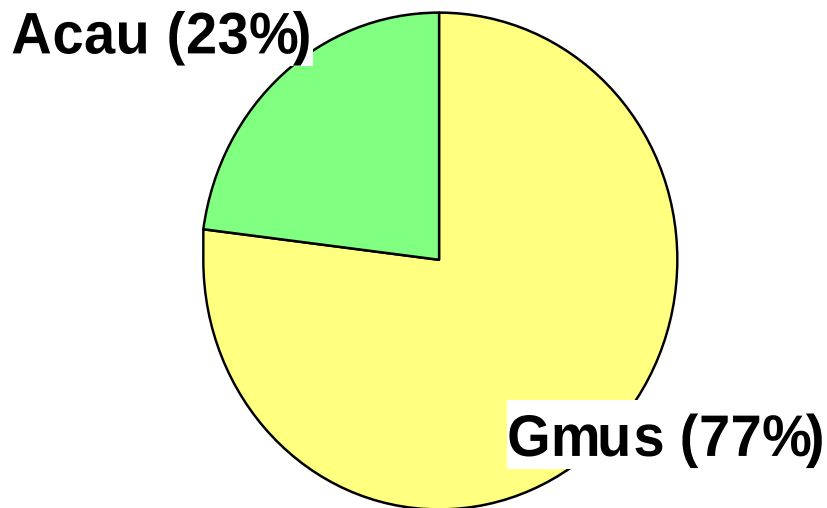


Figura 13. Porcentaje de aparición esporas por muestra de suelo Gmus = *Glomus*; Acau = *Acaulospora*).

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.

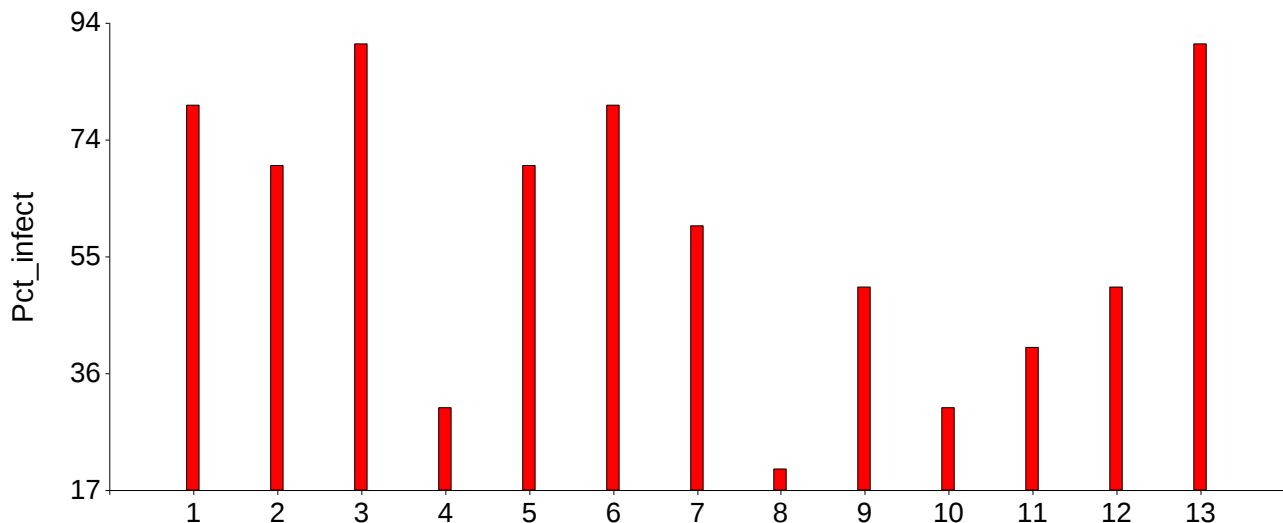


Figura 14. Porcentaje de infestación por hongos micorrícicos en muestras de raíz de 13 sitios de la colección de clones de cacao de la Estación Experimental Engombe.

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

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