



INIA
INSTITUTO NACIONAL
DE INVESTIGACIONES
AGRÍCOLAS

AÑO 2018 VOL. 68 NUM. 3-4

AGRONOMÍA TROPICAL



ISSN versión digital: 2542-3363
Depósito Legal: AR2017000075
ISSN versión impresa: 0002-192X
Depósito Legal: pp 195102AR73

Agronomía Tropical publica trabajos en las siguientes áreas temáticas: recursos fitogenéticos, fitomejoramiento, protección vegetal, bioecología, botánica, edafología, fertilidad de suelos, nutrición, recursos naturales, ambiente, agroecología, biotecnología agrícola vegetal, tecnología de alimentos, ingeniería agrícola, postcosecha, agroindustria, cadenas agroalimentarias, sistemas de producción agrícola vegetal, economía agrícola, desarrollo rural, agroforestería, investigaciones básicas y aplicadas en agroecosistemas de cultivos y demás temas afines al desarrollo agrícola.

Correo electrónico:
agronomia.tropical.inia@gmail.com

Teléfono
+58 243-2404766

Comité Editorial

Ligia Carolina Rosales	Editora Jefe
Oralys León Brito	Editor Asistente

Editores Asociados

Ezequiel Rangel. INIA - Venezuela
Ramón Silva-Acuña. INIA - Venezuela
Rafael Montilla. INIA - Venezuela
Renny Barrios. INIA - Venezuela
Oralys León Brito. INIA - Venezuela
Eduardo Delgado. INIA - Venezuela.

Oscar De La Rosa	Diagramación.
Carlos Landaeta	Gestión OJS

Miembros Fundadores

Luis Medina	Fonaiap Ceniap
Bruno Mazzani	Fonaiap Ceniap
Wasilik Ilijin	Fonaiap Ceniap
Rafael Pontis	Fonaiap Ceniap
Jesus Silva Calvo	Fonaiap Ceniap
Gino Malagutti	Fonaiap Ceniap
Guisepppe Ravanello	Fonaiap Ceniap
Luis Salas	Fonaiap Ceniap
Salomon Horovitz	Fonaiap Ceniap
Pedro Obregon	Fonaiap Ceniap
Dora M. de Zerpa	UCV Agronomía

Consejo Asesor

Julia Gilabert de Brito	INIA Venezuela
Ana María Casassa	LUZ
Felix Carreño	INIA Venezuela
Carlos Hidalgo	INIA Venezuela
Ada Maureen Medina	UCV Venezuela
Morela Fuchs	INIA Venezuela
Jesus Mendez	UDO Venezuela

Indización

IICA- CIDIA (Costa Rica)
Royal Tropic Institute (Holanda)
AGRIS (FAO, Roma)
LATINDEX (México)
Índice de Revistas (México)
REVENCYT (Venezuela)
Base de Datos REVIS (CATIE, Costa Rica)
Base de Datos RISPAL (CATIE, Costa Rica)
Base Agrícola Venezolana (INIA, Venezuela)
Scielo (Venezuela)
HINARI (FAO, Italia)

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGRÍCOLAS

Giomar Blanco	Presidente
Deisy Carvajal	Gerente General
Nohelia Rodríguez	Gerente de Investigación
Betzy Camacho	Gerente de Producción Social
Nicolas García	Gerente de Participación y Desarrollo Comunitario

Editada por la Gerencia de Investigación
Área de Gestión de la Información
Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas
Venezuela

AGRONOMÍA TROPICAL

**Revista científica del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas,
Ministerio del Poder Popular para la Agricultura Productiva y Tierras
Maracay, Venezuela**

Agradecimientos

Agronomía Tropical desean expresar su reconocimiento a todos los especialistas, que participaron en la revisión y arbitraje de los artículos que conforman el Volumen 68.

- Alexis Briceño Godoy / Universidad Nacional Experimental de los Llanos Ezequiel Zamora (UNELLEZ), Barinas. Venezuela.
- Amal Rosaly El Halah Blanco / Universidad de los Andes (ULA), Mérida. Venezuela.
- Barlín Olivares / Universidad de Córdoba (UCO), España.
- Belkis Camacho / Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Lara. Venezuela.
- Cristian Román Cazorla/ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Córdoba, Argentina.
- Diego Diamont / Instituto Nacional de investigaciones Agrícolas (INIA), Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP), Maracay. Venezuela.
- Dorian Rodríguez / Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado (UCLA), Barquisimeto, Venezuela.
- Duilio Torres Rodríguez / Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado (UCLA), Barquisimeto, Venezuela.
- Ezequiel Rangel / Instituto Nacional de investigaciones Agrícolas (INIA), Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP), Maracay. Venezuela.
- Franklin Morillo / Instituto nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Miranda. Venezuela.
- Franklin Paredes-Trejo / Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales Ezequiel Zamora, Barinas. Venezuela.
- Gino Campos / Instituto Nacional de investigaciones Agrícolas (INIA), Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP), Maracay. Venezuela.
- Guido Silva / Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Lara. Venezuela.
- Hipólito Israel Pérez Iglesias / Universidad Técnica de Machala, Provincia del Oro, Ecuador.
- José Bernardo Navarrete Cedeno / Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Manabí, Ecuador.
- José Miguel Cotes Torres / Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias, Medellín. Colombia.
- Lourdes González / Instituto nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Mérida. Venezuela.
- Luis Angulo Graterol / Universidad Central de Venezuela (UCV), Facultad de Agronomía (FAGRO), Maracay. Venezuela.
- Luis Bautista / Universidad Nacional Experimental del Táchira (UNET), San Cristóbal. Venezuela.
- Luis Guillén Pérez / Instituto nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Lara. Venezuela.
- María Elena Sanabria / Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado (UCLA), Barquisimeto, Venezuela.
- María Florencia Ghibaudo / Universidad Nacional de la Plata (UNLP), Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos. Argentina.
- Marlyn Escalante / Universidad Nacional Experimental del Táchira (UNET), San Cristóbal. Venezuela.
- Miguel Silva Borges /Universidad Central de Venezuela (UCV), Facultad de Agronomía (FAGRO), Maracay. Venezuela.
- Oralys León-Brito / Instituto Nacional de investigaciones Agrícolas (INIA), Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP), Maracay. Venezuela.
- Rafael Montilla / Instituto Nacional de investigaciones Agrícolas (INIA), Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP), Maracay. Venezuela.
- Zunilde Lugo / Instituto nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Mérida. Venezuela.

Damos las gracias igualmente a Ada Maureen Medina, Edgloris Marys y Reinaldo Cardona, por la corrección de los resúmenes en idioma inglés, y a todos aquellos investigadores que nos enviaron sus artículos e invitamos a la comunidad científica especializada a continuar remitiendo sus trabajos a la revista AGRONOMÍA TROPICAL.

TABLA DE CONTENIDO

Artículos Científicos

López, L; Lima, H; Perichi, G; Matute, I.

Efecto fagodisuasivo de extractos vegetales sobre la alimentación de la babosa gris y tamizaje fitoquímico	113
<i>(Phagodisuasive effect of plant extracts on gray slug feeding and phytochemical screening)</i>	

Rosales, LC; Crozzoli, R; San-Blas, E; Puente, L; Enrique, R; Hurtado, T; Sanoja, JE; Rodríguez H, MG.
Poblaciones naturales de nematodos entomopatógenos presentes en suelos de siete estados de Venezuela

	125
--	-----

(Natural populations of entomopathogenic nematodes present in soils of seven Venezuelan States)

Díaz-López, AA; Salazar-Yamarte, EG; Albarrán-Rincón, JG; Marín, C; Vegas-García, AL.

Efecto de diferentes reguladores de crecimiento sobre la embriogénesis somática en tres cultivares de cacao	137
<i>(Effect of different growth regulators on somatic embryogenesis in three cocoa cultivars)</i>	

Campos Tirado, G; Gutierrez, M; Ramis, C; Angulo Graterol, L; Henríquez, Z.

Identificación de marcadores microsatélites asociados a la concentración de Fe y Zn en el grano de la caraota en familias F_{2:3}	153
<i>(Identification of microsatellite markers associated Fe and Zn concentration in the grain of the common bean in F_{2:3} families)</i>	

Ramos, C; Montilla Coronado, RP.

Insectos asociados al cultivo del cacao depositados en el Museo de Insectos de Interés Agrícola (MIIA) del INIA - Venezuela	163
<i>(Insects associated with the cultivation of cocoa deposited in the Museum of Insects of Agricultural Interest (MIIA) of INIA - Venezuela)</i>	

Nota Técnica

Meza, NM; Daboín-León, BM; Renaud-Rodríguez, D; Riveros, RdC.

Rendimiento de clones de papa con resistencia a la candelilla tardía	177
<i>(Yield of potato clones with late candelilla resistance)</i>	

Instrucciones al autor	183
------------------------------	-----

Efecto fagodisuasivo de extractos vegetales sobre la alimentación de la babosa gris y tamizaje fitoquímico

Liliana López¹, Hilda Lima¹, Guillermo Perichi^{1*}, Irana Matute²

¹Universidad Central de Venezuela (UCV), Facultad de Agronomía (FAGRO), Departamento de Zoología Agrícola. Maracay, Aragua, Venezuela. ²Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP), Laboratorio de Nutrición Animal. Maracay, Venezuela. *Correo electrónico: perichig@hotmail.com

RESUMEN

Las babosas son consideradas una de las principales plagas en el ámbito mundial. Estas revisten importancia económica por los daños que ocasionan al alimentarse de hojas, tallos, bulbos, flores, raíces y semillas de muchas plantas cultivadas. El manejo de las poblaciones de estas plagas, en Venezuela, se limita al uso de cebos tóxicos, que son dañinos para diferentes organismos. Es necesario buscar alternativas agroecológicas eficientes en la producción de alimentos saludables. Con esa problemática, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto fagodisuasivo de extractos vegetales sobre la alimentación de la babosa gris (*Deroceras reticulatum*) y tamizaje fitoquímico. Para la actividad alimentaria de la babosa se utilizó una prueba sin posibilidad de elección o no preferencia. Se prepararon extractos acuosos de ají rocoto (*Capsicum pubescens*), algodón de seda (*Calotropis procera*), artemisa (*Artemisia vulgaris*), neem (*Azadirachta indica*), orégano orejón (*Plectranthus amboinicus*) y ruda (*Ruta graveolens*). Cada extracto se aplicó a discos de repollo blanco, para el alimento de las babosas; los discos de repollo del control se trataron con agua destilada. También, se determinó la presencia de metabolitos secundarios en las seis especies de plantas evaluadas. Los extractos vegetales acuosos aplicados a los discos foliares de repollo blanco presentaron diferentes grados de efectividad, sobre la actividad alimentaria de las babosas, con respecto al control. Sólo los extractos acuosos de ruda, neem y ají rocoto mostraron potencial disuasivo de la alimentación de *D. reticulatum*. Los esteroides y saponinas fueron los metabolitos secundarios más cuantiosos en las especies de plantas.

Palabras clave: compuestos fenólicos, *Deroceras reticulatum*, metabolitos secundarios, moluscos nocivos.

Phagodisuasive effect of plant extracts on gray slug feeding and phytochemical screening

ABSTRACT

The slugs are considered as one of the main pests worldwide. These are economically important for the damage they cause by feeding on leaves, stems, bulbs, flowers, roots and seeds of many cultivated plants. The management of the populations of these pests in Venezuela is limited to the use of toxic baits, which are harmful to different organisms. It is necessary to look for efficient agroecological alternatives in the production of healthy foods. With this problem, the objective of this work was to evaluate the phagodisuasive effect of plant extracts on gray field slug (*Deroceras reticulatum*) feeding and phytochemical screening. For the feeding activity of the slug, a test will be used without possibility of choice or not preference. Aqueous extracts of *Capsicum pubescens*, *Calotropis procera*, *Artemisia vulgaris*, *Azadirachta indica*, *Plectranthus amboinicus* and *Ruta graveolens* were prepared. Each extract was applied to white cabbage discs, for slug food; the cabbage disks of the control were treated with distilled water. Also, the presence of secondary metabolites in the six evaluated species of plants was determined. The aqueous vegetable extracts applied to the white cabbage leaf disks showed different degrees of effectiveness, on the feeding activity of slugs, with respect to the control. Only the aqueous extracts of *R. graveolens*, *A. indica* and *C. pubescens* showed deterrent potential of the feeding of *D. reticulatum*. Steroids and saponins were the most abundant metabolites in the plant species.

Key words: phenolic compound, *Deroceras reticulatum*, secondary metabolites, harmful mollusks.

Recibido: 15/06/2018 - Aprobado: 27/11/2018

INTRODUCCIÓN

Las babosas (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata) son consideradas una de las principales plagas en el ámbito mundial. Estas revisten importancia económica por los daños que ocasionan al alimentarse de hojas, tallos, bulbos, flores, raíces y semillas de muchas plantas cultivadas (Elmi *et al.* 2016).

En el Reino Unido, sin ninguna medida de manejo poblacional de babosas, especialmente, en canola y trigo, las pérdidas económicas son aproximadamente de 50 millones de dólares (43,5 millones de libras esterlinas) al año (Nicholls 2014). En Venezuela, aunque no se tienen estimaciones económicas de las pérdidas causadas por estos organismos, los productores del municipio Tovar del estado Aragua señalan a las babosas y caracoles como un problema en cultivos hortícolas (brócoli, coliflor, fresa y lechuga). En esa zona, la babosa gris *Deroceras reticulatum* Müller representa la plaga más importante (Fernández de Valera 1982).

El manejo de las poblaciones plagas de esta especie, en el país, y en otras partes del mundo, se limita al uso de cebos tóxicos; estos son formulados como pellets a base de metaldehído o carbamatos y tienen el inconveniente que son muy tóxicos para otros organismos, tales como: mamíferos, aves, peces e insectos (Salvio *et al.* 2008).

Los extractos vegetales constituyen una alternativa agroecológica de manejo poblacional de moluscos plagas y pueden influir en la protección sostenible de muchos cultivos (Hagner *et al.* 2015; Saad *et al.* 2017; Zala *et al.* 2018). Con ese fin, se evaluó el efecto fagodisuasivo de extractos vegetales sobre la alimentación de la babosa gris (*D. reticulatum*) y tamizaje fitoquímico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación de los ensayos

El experimento *in vitro*, para evaluar el efecto de seis extractos acuosos de origen botánico sobre la actividad alimentaria de la babosa gris, se realizó en el Laboratorio de Nematología Agrícola del Departamento de Zoología Agrícola de la Universidad Central de Venezuela - Facultad de Agronomía (UCV-FAGRO). La investigación de tamizaje fitoquímico, para detectar metabolitos secundarios, se ejecutó en el Laboratorio de Nutrición Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas - Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP). Ambos laboratorios ubicados en Maracay, estado Aragua.

Material vegetal

La información de las especies de plantas utilizadas para la preparación de los extractos vegetales acuosos se presenta en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Especies de plantas usadas para la preparación de extractos vegetales acuosos para evaluar su efecto sobre la actividad alimentaria de la babosa gris (*Deroceras reticulatum*) *in vitro*.

Nombre común	Nombre científico	Familia botánica	Parte de la planta utilizada
Ají rocoto	<i>Capsicum pubescens</i> Ruiz y Paz	Solanaceae	Fruto maduro con semillas
Algodón de seda	<i>Calotropis procera</i> (Aiton) Aiton	Asclepiadaceae	Hoja
Artemisa	<i>Artemisia vulgaris</i> Linneo	Asteraceae	Hoja
Neem	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss	Meliaceae	Mezcla de fruto verde y maduro con semilla
Orégano orejón	<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng	Lamiaceae	Hoja
Ruda	<i>Ruta graveolens</i> Linneo	Rutaceae	Hoja

Las hojas de algodón de seda y los frutos de neem se colectaron en la UCV-FAGRO y las hojas de orégano orejón en el municipio Bolívar, estado Aragua. El resto del material vegetal (hojas de artemisa, ruda y frutos de ají rocoto) se adquirió en los mercados de Maracay, del mismo estado.

Secado y pulverizado del material vegetal

Una vez limpias las hojas de algodón de seda, artemisa, orégano orejón y ruda, con un paño de tela humedecido, se secaron bajo sombra, por un periodo entre 7 a 15 días. Los frutos de ají rocoto y neem se secaron a $50^{\circ}\text{C} \pm 2$ por separados durante 7 días, en una estufa Memmert modelo U30.

Los materiales secos se molieron en un equipo Retsch modelo ZM-200, hasta obtener un polvo fino de aproximadamente 0,5 mm. Luego, se empaquetaron en bolsas de papel Kraft, con excepción el polvo de neem, que se almacenó en bolsas plásticas con cierre hermético. Finalmente, se resguardaron en una incubadora WTC Binder modelo ED-53 a una temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2$, hasta el momento de la preparación de los extractos vegetales acuosos.

Preparación de los extractos acuosos

En una balanza granataria Ohaus se pesaron 10; 20 y 30 g del material vegetal en polvo. Luego, se diluyeron en 200 mL de agua destilada y se dejaron macerar en frascos esterilizados de color ámbar, a temperatura ambiente, durante 24 h. Para asegurar la extracción de los principios activos, se mantuvieron en agitación inicial durante 30 min, con un agitador de matraces Burrell modelo 75 y se dejaron reposar durante 10 min.

Una vez macerado el material vegetal, los extractos resultantes se filtraron a través de un papel Whatman® 1; se envasaron en frascos estériles de color ámbar y se guardaron en un refrigerador a 8°C , para su posterior uso. Las concentraciones finales (tratamientos) de los extractos utilizados para la evaluación fueron: 0 (control); 5; 10 y 15 %.

Animales de prueba

Las babosas se colectaron en las zonas de producción agrícola vegetal del sector Cruz Verde, municipio Tovar, estado Aragua. Estas se colocaron en una cava refrigerada, para su traslado al Laboratorio de Zoología Agrícola de la Facultad de Agronomía en Maracay, estado Aragua.

En el laboratorio, se seleccionaron ejemplares con longitud corporal cercana a los 40 mm (sin conocer su edad y estado de madurez sexual), que presentaron una mayor vitalidad. Se mantuvieron en recipientes plásticos con papel absorbente, humedecido con agua de clorada. Las condiciones de laboratorio fueron a una temperatura (T) de $24^{\circ}\text{C} \pm 1$, humedad relativa (HR) de $75\% \pm 5$ y un fotoperiodo (FP) de 12:12 h (luz:oscuridad). Las babosas se alimentaron con hojas de repollo blanco (*Brassica oleracea* var *capitata*) hasta 24 h, antes de establecer el ensayo.

Evaluación del efecto de los extractos vegetales acuosos sobre la masa consumida de repollo blanco por la babosa

Para evaluar el efecto de los extractos vegetales acuosos sobre la masa consumida por la babosa (actividad alimentaria), se utilizó una prueba sin posibilidad de elección o no preferencia. La prueba fue la de Delgado *et al.* (2012) con modificación, que consistió en utilizar la babosa gris como sujeto experimental en vez de un insecto. Se usaron dos discos foliares de repollo blanco ($3,5\text{ cm}^2$ cada uno) por tratamiento. Estos se sumergieron durante 1 hora, en cada concentración de los extractos (discos tratados = DT), y dos en agua destilada (discos control = DC).

Posteriormente, los dos DT y los dos DC se pesaron en una balanza analítica digital marca Kern, y el peso se registró como masa inicial. Los dos discos por tratamiento, se colocaron por separados en una placa Petri (9 cm diámetro x 1,5 cm altura), con una base de papel de filtro Whatman® 1, humedecido con agua destilada para minimizar la desecación del material vegetal. Se colocó una babosa dentro de cada placa, se taparon y mantuvieron a una $T = 24^{\circ}\text{C} \pm 1$; HR =

75 % ± 5; FP = 12:12 h (luz:oscuridad), durante 24 horas.

Transcurrido ese tiempo, las babosas se retiraron de las placas. Los discos de repollo por tratamiento se pesaron en la balanza y el peso se registró como masa final. La masa consumida (g) por la babosa, para cada tratamiento, se obtuvo de la diferencia entre la masa inicial y la final de los discos de repollo. La unidad experimental fue una placa Petri por tratamiento (C = 0; 5; 10 y 15 %), por cada extracto vegetal. Se realizaron siete observaciones por tratamiento.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado (DCA). A los resultados de masa consumida se le efectuó un análisis de varianza (ANAVAR), previo análisis de los supuestos con la prueba de Shapiro-Wilk para normalidad y la de Bartlett para igualdad de varianzas. Las medias de los tratamientos se compararon entre sí, con la Prueba de Mínima Diferencia Significativa (MDS) a un nivel de significancia de $P < 0,05$. Los análisis se realizaron con el programa estadístico STATISTIX 8.0 (NH Analytical Software, Roseville, MN, USA).

Cálculo del índice de palatabilidad y porcentaje de reducción de la alimentación (efecto anti-apetitivo)

Para cada extracto vegetal y concentraciones de los tratamientos se calculó el índice de palatabilidad, según Dankowska y Kłosek (2008); es decir, el porcentaje de disco consumido en cada tratamiento/porcentaje de disco consumido en el control.

El porcentaje de reducción de la alimentación (%RA), efecto anti-apetitivo, se calculó de acuerdo a la fórmula de Bentley *et al.* (1984). La fórmula corresponde a:

$$\%RA = \left(\frac{DC - DT}{DC} \right) * 100$$

donde; DC es la masa de los discos consumidos en el control y DT es la masa de los discos consumidos en cada tratamiento. Todas las masas se expresaron en gramos (g). El índice de palatabilidad y el %RA se interpretaron mediante un

análisis de tipo descriptivo, según las gráficas obtenidas.

Tamizaje fitoquímico para la identificación de grupos de metabolitos secundarios

La presencia de grupos de metabolitos secundarios (MS), en las especies de plantas evaluadas, se determinó por pruebas cualitativas. Estas se basaron en reacciones de coloración y precipitación a través de un tamizaje fitoquímico previo, descrito por Rondina y Coussio (1969) y con modificaciones en la presente investigación. Estas consistieron en la utilización de 2 g de muestra vegetal y 12,5 mL de etanol a 90 %, para la extracción de los MS en ultrasonido por 1 hora a 4°C y posterior macerado por 24 horas en refrigeración. Para expresar los resultados de las pruebas cualitativas, se registró la ausencia o presencia de los MS mediante la escala de cruces propuesta por los referidos autores (Cuadro 2).

Cuadro 2. Escala de cruces según Rondina y Coussio (1969) para indicar la ausencia o presencia de MS en las diferentes especies de plantas utilizadas en el efecto fagodisuasivo de extractos vegetales sobre la alimentación de la babosa gris (*Deroceras reticulatum*).

Símbolo	Metabolitos Secundarios (MS)
-	Ausente
+	Presencia leve
++	Presencia notable
+++	Presencia cuantiosa

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de diferentes extractos acuosos de plantas sobre la masa consumida por la babosa gris, en discos de repollo blanco (*in vitro*)

Las pruebas de Shapiro-Wilk y Bartlett fueron satisfactoria para realizar un ANAVAR ($P > 0,05$). El análisis estadístico en algunos extractos vegetales mostró diferencias significativas en la masa consumida por la babosa, entre los tratamientos aplicados a los discos foliares de repollo blanco con las seis especies de plantas evaluadas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de diferentes extractos acuosos de plantas sobre la masa consumida por la babosa gris (*Deroceras reticulatum*) en discos de repollo blanco *in vitro*.

Extracto acuoso	Medias de los disco foliares				Estadísticos	
	Concentración (%)	Masa inicial (g)	Masa final (g)	¹ Masa consumida (g)	F	p
Orégano orejón	0 (Control)	0,6180	0,4686	0,1494 ab	3,24	0,039
	5	0,4563	0,2317	0,2246 a		
	10	0,5009	0,3175	0,1834 ab		
	15	0,5384	0,4379	0,1005 b		
Ají rocoto	0 (Control)	0,4919	0,2868	0,2051 a	5,12	0,0086
	5	0,4432	0,2357	0,2075 a		
	10	0,5463	0,4519	0,0944 b		
	15	0,3974	0,3590	0,0384 b		
Neem	0 (Control)	0,5561	0,2974	0,2587 a	5,34	0,0073
	5	0,5788	0,3602	0,2186 ab		
	10	0,5221	0,3667	0,1554 bc		
	15	0,5355	0,3892	0,1463 c		
Algodón de seda	0 (Control)	0,5231	0,2783	0,2448 a	3,41	0,0433
	5	0,4831	0,3563	0,1268 b		
	10	0,5227	0,4008	0,1219 b		
	15	0,4532	0,2776	0,1756 ab		
Artemisa	0 (Control)	0,5107	0,3286	0,1821 ab	1,73	0,1869
	5	0,4678	0,3408	0,1270 b		
	10	0,4373	0,2531	0,1842 ab		
	15	0,4431	0,2277	0,2153 a		
Ruda	0 (Control)	0,4862	0,3773	0,1089 a	1,70	0,1929
	5	0,4741	0,3774	0,0967 a		
	10	0,4383	0,3732	0,0651 a		
	15	0,4642	0,4212	0,0430 a		

(1) Valores en la misma columna de masa consumida con las mismas letras por cada extracto no presentan diferencias estadísticas significativas entre sí, según la prueba de MDS ($P < 0,05$).

Con el extracto acuoso de ají rocoto se pudo observar que a la concentración de 15 %, la masa consumida (0,0384 g) por la babosa fue menor y estadísticamente diferente ($P < 0,05$) a la consumida (0,2050 g) en los discos control. Con la ruda, no se detectaron diferencias estadísticas significativas ($P > 0,05$) en la masa consumida por la babosa entre los tratamientos. Sin embargo, a pesar de que no existen diferencias desde el punto de vista estadístico es importante destacar que a medida que aumentó la concentración del extracto la masa consumida fue menor.

El extracto acuoso de neem, también presentó efecto fagodisuasivo. Al realizar la prueba de Mínima Diferencia Significativa (MDS), se encontró diferencias significativas a la concentración de 15 % con relación al control ($P < 0,05$). La masa consumida por la babosa, en el control fue de 0,2587 g; mientras que, a las concentraciones de 5; 10 y 15 % la masa consumida disminuyó a 0,2186; 0,1554 y 0,1463 g, respectivamente.

En el extracto de algodón de seda, a la concentración de 15 % la masa consumida (0,1756 g) por

la babosa fue estadísticamente similar ($P>0,05$) a la masa consumida (0,2448 g) en el control. Por tanto, no se observó en los discos tratados un efecto disuasivo de la alimentación de la babosa.

Con el extracto de artemisa, no se encontró diferencias estadísticas significativas ($P>0,05$) a concentraciones de 0 (control), 5, 10 y 15 % en la masa consumida. El extracto acuoso de orégano orejón solo presentó diferencias significativas ($P>0,05$) a la concentración de 15 %. El resto de los tratamientos con la inclusión del control, fueron estadísticamente similares.

Índice de palatabilidad y porcentaje de reducción de la actividad alimentaria

En las Figuras 1 y 2 se presentan los valores de palatabilidad y porcentaje de reducción de la alimentación de la babosa (%RA) sobre discos de repollo blanco tratados con seis extractos vegetales acuosos, respectivamente.

Para el extracto acuoso de ají rocoto a las concentraciones de 5; 10 y 15 %, se pudo observar que el índice de palatabilidad fue de 1,12; 0,45

y 0,23, respectivamente. Mientras que, el %RA fue de -1,17; 53,96 y 81,30 %, respectivamente. El índice de palatabilidad en la ruda disminuyó en la medida que aumentó la concentración del extracto y paralelamente aumentó el %RA. Este comportamiento fue similar al que se encontró en el extracto de ají rocoto.

El extracto acuoso de neem, también presentó efecto antiapetitivo. El índice de palatabilidad a concentraciones de 5; 10 y 15 % fue de 0,81; 0,64 y 0,59, respectivamente y el %RA fue de 15,47; 39,94 y 43,44 %, respectivamente. A medida que aumentó la concentración del extracto, los discos de repollo blanco resultaron ser menos atractivos como alimento para la babosa.

Los índices de palatabilidad a concentraciones de 5 y 10 % con el extracto de algodón de seda fueron muy similares. Sin embargo, a la concentración de 15 % este valor fue ligeramente superior. Este comportamiento, indica un efecto estimulante de la alimentación de la babosa sobre los discos de repollo blanco. Por otra parte, el %RA a la concentración de extracto de 15 % fue 28,26 %.

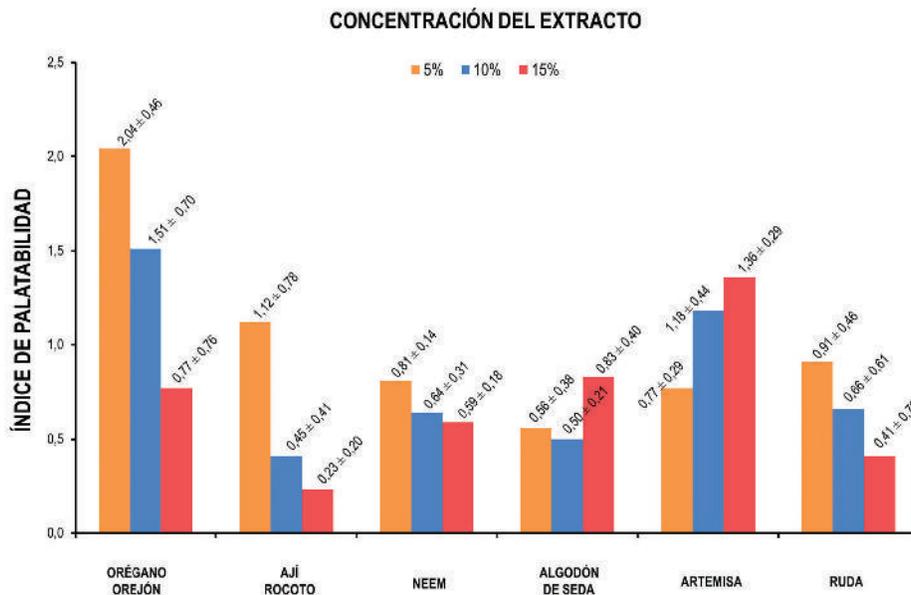


Figura 1. Índice de palatabilidad (promedio \pm desviación estándar) de los discos foliares tratados con los extractos acuosos de las diferentes plantas evaluadas y consumidos por la babosa *Deroceras reticulatum*.

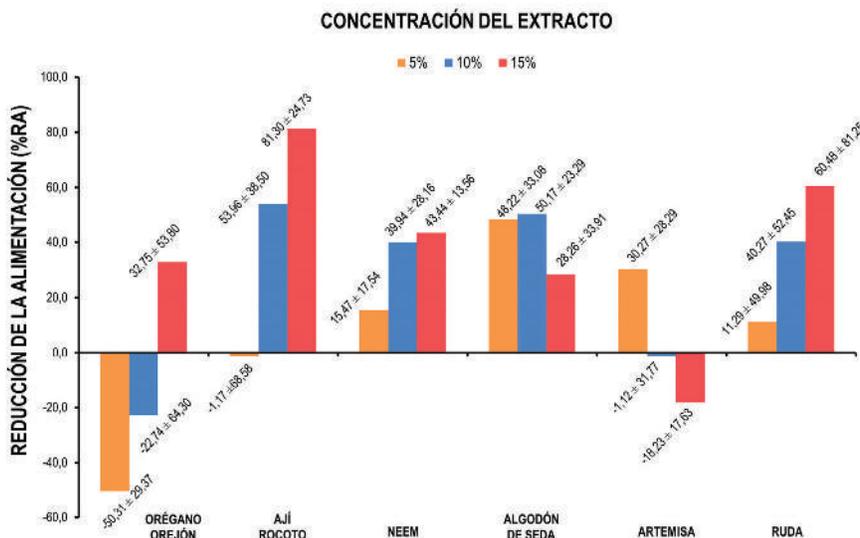


Figura 2. Porcentaje de reducción de la alimentación (promedio ± desviación estándar) de la babosa *Deroceras reticulatum* sobre discos foliares tratados con los extractos acuosos de las diferentes plantas evaluadas.

En las Figuras 1 y 2 se observa, que los discos foliares tratados con el extracto acuoso de artemisa presentaron índices de palatabilidad de 0,77; 1,18 y 1,36 y de porcentaje de reducción de la alimentación de 30,27; -1,12 y -18,23 % a concentraciones de 5; 10 y 15%, respectivamente. En términos generales, el índice de palatabilidad aumentó y disminuyó el %RA a medida que aumentó la concentración del extracto. Esto sugiere un efecto atrayente del extracto a medida que aumenta la concentración del mismo, puesto que, se estimula la alimentación de la babosa sobre los discos de repollo.

El extracto de orégano orejón solo mostró efecto anti-apetitivo a la concentración de 15 %. Los valores de palatabilidad y %RA fueron de 0,77 y 32,75 %, respectivamente. Los valores del índice de palatabilidad y %RA de los discos de repollo tratados a esa concentración fueron muy similares a los obtenidos con los discos tratados con el extracto de artemisa al 5 %.

En general, los resultados muestran que los seis extractos vegetales acuosos preparados y aplicados sobre discos foliares de repollo blanco presentan diferentes grados de efectividad sobre la actividad alimentaria de *D. reticulatum*. En pruebas similares realizadas sobre la especie *D. laeve*, con extractos de diferentes plantas, sin relación botánica con las de este trabajo, a excepción de las lamiáceas: albahaca (*Ocimum basilicum* L.), mejorana (*Origanum majorana* L.), menta (*Mentha piperita* L.) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.), los extractos evaluados presentaron un efecto fagoestimulante similar al del orégano orejón de este estudio (Dankowska 2005, Dankowska y Bendowska 2006, Dankowska y Kłosek 2008).

Los extractos acuosos de ruda, neem y ají rocoto mostraron potencial para limitar la alimentación de la babosa gris; resultado que no queda del todo claro, desde el punto de vista del estadístico, debido a que la masa consumida en los discos tratados con el extracto acuoso de ruda no presentó diferencias significativas entre las concentraciones evaluadas (Cuadro 3).

Cuadro 4. Metabolitos secundarios ausentes o presentes en las diferentes plantas utilizadas en el efecto fagodisuasivo de extractos vegetales sobre la alimentación de la babosa gris (*Deroceras reticulatum*).

Pruebas fitoquímicas		Plantas					
Grupo de MS	Prueba y/o reacciones	Artemisa	Ají rocoto	Algodón de seda	Neem	Orégano orejón	Ruda
Fenoles	Cloruro férrico	++ ⁽¹⁾	+	++	+	++	+++
Taninos condensados	Vainillina / HCl	+	+	+	+	+	++
Taninos hidrolizables	Gelatina	++	+	++	+++	++	++
Quinonas	Bornträger	-	-	-	-	+++	-
Cumarinas	Baljet	+	++	++	+	+++	++
Flavonoides	Shinoda	-	++	++	+	+	+++
Proantocianidinas	Rosenheim	-	-	-	++	-	-
Catequinas	Rosenheim	++	+++	++	-	-	+++
Cardenólidos	Kedde	-	-	-	-	-	-
Triterpenos	Lieberman - Burchard	-	-	-	+++	-	-
Esteroides	Lieberman - Burchard	+++	+++	+++	-	+++	+++
Saponinas	Espuma	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Aminoácidos no proteicos	Ninhidrina	-	+++	+	+++	+	+++
Alcaloides	Dragendorff	+	++	-	-	-	+++
Glucósidos cianogénicos	Guignard	-	-	-	-	-	-
Azúcares reductores	Fehling	+	+++	++	++	+	++

⁽¹⁾Escala de cruces de Rondina y Coussio (1969). [-] Ausente. [+] Presencia leve. [++] Presencia notable. [+++] Presencia cuantiosa.

Resultados ambiguos sobre actividad fagodisuasiva en condiciones de elección y no elección son frecuentes. Sin embargo, cuando se desea explorar la actividad de varias sustancias (*in vitro*) sobre la conducta de una especie plaga se

recomienda una prueba de elección binaria por ser más sensible (Schoonhoven *et al.* 2005).

Perera *et al.* (2017) señalan que, ciertos compuestos volátiles de cadena lineal con un grupo funcional

carbonilo (2-nonanona, 2-undecanona y 2-decanona) presentes en la ruda son disuasivos de la alimentación en animales fitófagos; estos actúan como un mecanismo químico de defensa frente a la herbivoría. En las Figuras 1 y 2 se muestran que el índice de palatabilidad de los discos tratados con el extracto de ruda disminuyó (palatabilidad al 15 % = 0,41) y el porcentaje de inhibición de la alimentación de la babosa aumentó, en la medida que se incrementó la concentración de este extracto (%RA al 15 % = 60,48).

Con relación a los extractos de neem y ají rocoto, los discos tratados presentaron un comportamiento similar en palatabilidad y actividad antialimentaria como en los tratados con ruda. Karthiga *et al.* (2012) señalan que, el neem tiene efecto antialimentario en caracoles y babosas que afectan el follaje de *Cordyline fruticosa* (L.) A.Chev. El posible efecto anti-apetitivo o fagodisuasivo del neem se atribuye a tres sustancias de tipo limonoides (azadiractina, nimbina y salanina); estas pueden afectar la actividad de la enzima acetilcolinesterasa sobre el neurotransmisor acetilcolina en animales herbívoros (Pavela 2016).

La acción fagodisuasiva en ají rocoto, pudiera estar asociada por la presencia de sustancias pungentes como los capsaicinoides. Estas sustancias presentan actividad biocida o antialimentarias en insectos. Por esa razón, se usan como repelentes para el manejo de plagas en la agricultura y como sinergistas con insecticidas sintéticos (Olszewska *et al.* 2010). En referencias mundiales, existe un alto porcentaje de trabajos que reportan el efecto antialimentario o molusquicida de una amplia variedad de plantas sobre moluscos de interés médico-veterinario; mientras que, las relacionadas con caracoles y babosas plagas son escasas (Koma-Okwute 2012).

Esta investigación constituye el primer trabajo del efecto antialimentario de algunos extractos acuosos de plantas sobre la babosa *D. reticulatum* en Venezuela. Sin embargo, los resultados presentados sugieren seguir la exploración con otras plantas; así como, otras metodologías (prueba de elección binaria o múltiple), para dilucidar el posible efecto que puedan tener los extractos vegetales sobre diferentes especies de moluscos plagas.

Tamizaje fitoquímico para la identificación de algunos grupos de metabolitos secundarios (MS)

En el Cuadro 4, se muestran los resultados de diferentes pruebas fitoquímicas realizadas. Para cada especie vegetal, se puede apreciar la presencia o ausencia de un determinado MS. Los esteroides y las saponinas fueron los MS con presencia cuantiosa. La presencia o ausencia de diferentes grupos de MS entre las plantas evaluadas, se distinguen porque pertenecen a distintas familias botánicas; además, diversos factores genéticos, ontogénicos, morfogenéticos y ambientales (luz, temperatura, agua y salinidad) pueden influir en la biosíntesis y la acumulación de los MS. La variación de uno de esos factores puede alterar el contenido del MS (Yang *et al.* 2018).

La información que se tiene sobre el rol de los MS de las plantas superiores, en animales herbívoros, es el resultado de numerosas investigaciones, especialmente, en insectos (Wink 2018). Es necesario realizar estudios posteriores para dilucidar su efecto biológico sobre moluscos plagas.

CONCLUSIONES

Los extractos vegetales acuosos aplicados sobre discos foliares de repollo blanco presentan diferentes grados de efectividad sobre la actividad alimentaria de la babosa *D. reticulatum*.

Los extractos acuosos de ruda, neem y ají rocoto tienen potencial disuasivo en la alimentación de *D. reticulatum*.

El tamizaje fitoquímico evidenció la presencia y ausencia de diferentes grupos de metabolitos secundarios; de estos, los esteroides y las saponinas fueron los más cuantiosos en las plantas evaluadas.

AGRADECIMIENTO

Al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) por el financiamiento del Proyecto PEI No. 2012000634 "Identificación de la malacofauna de interés agrícola del municipio Tovar, estado Aragua y algunas alternativas agroecológicas para su control".

LITERATURA CITADA

- Bentley, MD; Leonard, DE; Stoddard, WF; Zalkow, LH. 1984. Pyrrolizidine alkaloids as larval feeding deterrents for spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Annals of Entomological Society of America* 77(4):393-397.
- Dankowska, E. 2005. Deterrent effect of plant infusions on *Deroceras laeve* (O. F. Müller, 1774). *Folia Malacologica* 13:105-108.
- Dankowska, E; Bendowska, J. 2006. Further studies on the effect of plant infusions on the feeding of *Deroceras laeve* (O. F. Müller, 1774). *Folia Malacologica* 14:57-60.
- Dankowska, E; Kłosek, I. 2008. Plant extracts, infusions and decoctions as factor limiting feeding activity of *Deroceras laeve* (O.F. Müller, 1774) (Gastropoda: Pulmonata: Agriolimacidae). *Folia Malacologica* 16:35-38.
- Delgado, E; García-Mateos, Ma del R; Ybarra-Moncada, Ma del C; Luna-Morales, C; Martínez-Damián, Ma. 2012. Propiedades entomotóxicas de los extractos vegetales de *Azardichtha indica*, *Piper auritum* y *Petiveria alliacea* para el control de *Spodoptera exigua* Hübner. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 18(1):55-69.
- Elmi, F; Hoda, H; Elmi, M. 2016. The laboratory investigation of the effect of *Alocasia macrorrhiza* and *Urtica dioica* extracts on *Caucasota chealencoranea* (Mouss.) and *Helicella candeharica* (L. Pfr.). *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5:101-108.
- Fernández de V, J. 1982. Contribución al conocimiento de las babosas y sietecueros (Mollusca: Gastropoda) que causan daños a la agricultura en Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía (Maracay)* XII (3-4):353-386.
- Hagner, M; Kuoppala, E; Fagernäs, L; Tiilikkala, K; Setälä, H. 2015. Using the copse snail *Arianta arbustorum* (Linnaeus) to detect repellent compounds and the quality of wood vinegar. *International Journal of Environmental Research* 9:53-60.
- Karthiga, S; Jegathambigai, V; Karunarathne, M; Svinningen, A; Mikunthan, G. 2012. Snails and slugs damaging the cut foliage, *Cordylina fruticosa* and use of biorationals towards their management. *Communications in Agricultural and Applied Biological* 77:691-698.
- Koma-Okwute, S. 2012. Plants as Potential Sources of Pesticidal Agents: A Review. In: Soundararajan, R. (Ed.). *Pesticides. Advances in Chemical and Botanical Pesticides*. Intech. pp. 207-231.
- Nicholls, C. 2014. Implications of not controlling slugs in oilseed rape and wheat in the UK. *Agriculture and Horticulture Development Board (AHDB). HGCA Research Review No. 79. 9 pp.*
- Olszewska, J; Têgowska, E; Grajpel, B; Adamkiewicz, B. 2010. Effect of application of capsaicin and pyrethroid on metabolic rate in mealworm *Tenebrio molitor*. *Ecological Chemistry and Engineering* 17:1355-1359.
- Pavela, R. 2016. History, presence and perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against insects- a Review. *Plant Protection Science* 52:229-241.
- Perera, A; Karunarathne, M; Chinthaka, S. 2017. Biological activity and secondary metabolite profile of *Ruta graveolens* leaves against maize weevil infestations. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 5:233-241.
- Rondina, R; Coussio, J. 1969. Estudio fitoquímico de plantas medicinales argentinas. *Revista de Investigación Agropecuaria* 6:352-366.
- Saad, A; Ismail, S; Dahalan, F. 2017. Metaldehyde toxicity: A brief on three different perspectives. *Journal of Civil Engineering, Science and Technology* 8:108-114.
- Salvio, C; Faberi, A; López, A; Manetti, P; Clemente, N. 2008. The efficacy of three metaldehyde pellets marketed in Argentina, on the control of *Deroceras reticulatum* (Müller) (Pulmonata: Stylommatophora). *Spanish Journal of Agricultural Research* 6:70-77.

- Schoonhoven, LM; van Loon, JJ; Dick, M. 2005. Insect-Plant Biology. Second Edition. Oxford University Press. Oxford, UK. 421 pp.
- Wink, M. 2018. Plant secondary metabolites modulate insect behavior-step toward addiction?. *Frontiers in Physiology* 9:1-9.
- Yang, L; Wen, K; Ruan, X; Zhao, Y; Wei, F; Wang, Q. 2018. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules* 23:1-26.
- Zala, M; Sipai, S; Bharpoda, T; Patel, B. 2018. Molluscan pests and their management: A review. *An International e-Journal* 7:126-132.

Poblaciones naturales de nematodos entomopatógenos presentes en suelos de siete estados de Venezuela

Ligia Carolina Rosales^{1*}, Renato Crozzoli², Ernesto San-Blas³, Liliana Puente¹, Roberto Enrique⁴, Teida Hurtado⁵, Julia Elena Sanoja⁶, Mayra G. Rodríguez H.⁴

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Centro Nacional de Investigaciones Agrícolas (CENIAP). Maracay, Venezuela. ²Universidad Central de Venezuela (UCV), Facultad de Agronomía (FAGRO), Instituto de Zoología Agrícola. Maracay, Venezuela. ³Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Centro de Estudios Botánicos y Agroforestales. Maracaibo, Zulia, Venezuela. ⁴Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). San José de las Lajas, Cuba. ⁵Asesor Técnico Fitosanitario. Maracay, Venezuela. ⁶Universidad Pedagógica Experimental Libertador (UPEL), Centro de Investigación en Educación Matemática usando Nuevas Tecnologías (CEINEM-NT). Maracay, Venezuela. *Correo electrónico: carolina.rosalesa@gmail.com

RESUMEN

Los nematodos entomopatógenos se encuentran en el suelo y son parásitos de insectos, que en simbiosis con una bacteria pueden causar la muerte de los mismos. Se utilizan como agentes de control biológico de insectos plaga. En la búsqueda de nematodos entomopatógenos nativos, se efectuó una prospección en los estados Amazonas, Aragua, Mérida, Miranda, Sucre, Táchira y Yaracuy, en Venezuela. Se procesaron 218 muestras de suelo según metodología descrita por Bedding y Akhurst (1975). Se obtuvieron 21 aislamientos de nematodos entomopatógenos, con una Frecuencia de Recuperación de 9,63 % y un Índice de Abundancia de 0,67. De estos, 20 pertenecen al género *Heterorhabditis* Poinar y uno a *Steinernema* Travassos. Con el análisis de la estadística descriptiva se determinó el porcentaje de NEP según género y tipo de suelo, hallándose: *Heterorhabditis indica* (9,52 %); *Heterorhabditis amazonensis* (23,80 %); *Heterorhabditis* spp. (61,90 %) y *Steinernema* sp. (4,76 %). El 86 % de los aislamientos se obtuvieron de suelos cultivados y de las localidades positivas para la presencia de NEP, el 57,14 % corresponden tanto a suelos arenosos como franco arenosos. Con la prueba Chi-cuadrado (χ^2) de independencia (Siegel y Catellan, 2009) se determinó que existe asociación estadísticamente significativa ($P < 0,05$) entre la frecuencia de recuperación y el tipo de suelo, así como entre la frecuencia de recuperación y la altitud. El suelo franco arenoso y la altitud 0 - 300 m.s.n.m. fueron las características que resultaron significativas en la detección de los nematodos.

Palabras Clave: control biológico, *Heterorhabditis*, *Steinernema*

Natural populations of entomopathogenic nematodes present in soils of seven Venezuelan States

ABSTRACT

Entomopathogenic nematodes are found in the soil and are parasites of insects, which in symbiosis with a bacterium can cause their death. They are used as biological control agents for pest insects. In the search for native entomopathogenic nematodes, a survey was carried out in the states of Amazonas, Aragua, Mérida, Miranda, Sucre, Táchira and Yaracuy, in Venezuela. 218 soil samples were processed according to the methodology described by Bedding and Akhurst (1975). 21 entomopathogenic nematode were obtained, with a Recovery Frequency of 9.63 % and an Abundance Index of 0.67. Of these, 20 belong to the genus *Heterorhabditis* Poinar and one to *Steinernema* Travassos. With the analysis of descriptive statistics, the percentage of entomopathogenic nematodes according to gender and type of soil was determined, finding: *Heterorhabditis indica* (9.52 %); *Heterorhabditis amazonensis* (23.80 %); *Heterorhabditis* spp. (61.90 %) and *Steinernema* sp. (4.76 %). 86 % of the EPN were obtained from cultivated soils. In the places where EPN presence was positive, 57.14 % correspond to both sandy and sandy loam soils. With the Independence Chi-square test (χ^2) (Siegel and Catellan, 2009) was determined that there is a statistically significant association ($P < 0.05$) between the recovery frequency and the type of soil, as well as between the recovery frequency and altitude. The sandy loam soil and the altitude 0 – 300 m above sea level were the significant characteristics in the detection of nematodes.

Key words: biologic control, *Heterorhabditis*, *Steinernema*

Recibido: 14/11/2017 - Aprobado: 14/08/2018

INTRODUCCION

Para el control de las plagas agrícolas en Venezuela se utilizaron, tradicionalmente, numerosos productos químicos, los que produjeron afectaciones al ambiente y la salud de los trabajadores del campo (Miranda-Contreras *et al.* 2013). Los avances tecnológicos permitieron la detección de residuos en los alimentos que antes pasaban desapercibidos, lo que hace presumir, que hoy día, puede estar afectada la salud de muchas personas, por el consumo tanto de frutas y hortalizas frescas como de alimentos procesados. En consecuencia, diversos investigadores enfocan sus esfuerzos en desarrollar insumos alternativos a productos químicos sintéticos para el control de plagas. Entre estas alternativas, el control biológico representa una herramienta emergente para el manejo de plagas en la agricultura sostenible (Patibanda y Ranganathswamy 2018)

Los nematodos entomopatógenos (NEP) de los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema*, desarrollan su ciclo de vida en el suelo y necesitan parasitar un insecto para completar el mismo. En asociación mutualista con bacterias simbiotas de los géneros *Photorhabdus* y *Xenorhabdus*, causan la muerte del insecto. El infectivo juvenil del nematodo penetra el insecto por los espiráculos, boca o ano y libera la bacteria dentro de su cuerpo. Por esto, los insectos que habitan o parte de su ciclo de vida permanecen en el suelo y otros ambientes protegidos, son los más afectados por los NEP. Estos pueden reproducirse masivamente en diversos sistemas *in vivo* o *in vitro*; son compatibles con diferentes productos químicos y biológicos, así como, seguros para su uso en la agricultura (Shapiro *et al.* 2017).

La búsqueda de los NEP, generalmente, se efectúa en muestras de suelo, de donde se extraen por diversos métodos. Se encuentran distribuidos en todos los ecosistemas, y de alguna manera sus niveles poblacionales se relacionan a la presencia de insectos del suelo. Al efectuar prospecciones, se ha discutido si las posibilidades de encontrarlos están asociadas a algún factor en particular o si hay diferencias entre áreas agrícolas y cultivadas (Sharmila *et al.* 2018).

Shapiro-Ilan *et al.* 2017, explican cómo los ecosistemas difieren en los parámetros que caracterizan el suelo (pH, humedad, textura, entre otros) y las condiciones del microhabitat (presencia de raíces, cubierta vegetal, fauna subterránea). Esto puede afectar la red alimentaria del suelo y a los NEP de una manera impredecible. Al comparar suelos que representan diferentes escenarios ecológicos, se puede vincular la distribución natural de los NEP a factores abióticos y bióticos. Estos conforman los ensamblajes de la red alimentaria del suelo, para definir los factores que determinan la abundancia y actividad de EPN en cada ecosistema.

El estudio de estos organismos se abordó en Venezuela, con el hallazgo de aislamientos en determinadas zonas del país (Rosales y Suárez 1998; San Blas *et al.* 2015a). En años recientes, se encontraron nuevas especies de NEP (San Blas 2015b, 2016). Con esos antecedentes y el planteamiento de que Venezuela es un país megadiverso (Aguilera *et al.* 2003), en zonas sin explorar se podrían encontrar nuevos aislamientos. Esto podría fortalecer el uso del control biológico, incluyendo a los nematodos entomopatógenos como parte del Manejo Integrado de Plagas.

El objetivo de este trabajo fue explorar suelos de siete estados de Venezuela, en la búsqueda de nuevos aislamientos nativos de NEP como un aporte para su estudio, contra plagas agrícolas de importancia en el país.

MATERIALES Y MÉTODOS

La prospección se realizó en siete estados de Venezuela: Amazonas, Aragua, Mérida, Miranda, Sucre, Táchira y Yaracuy. Se muestrearon al azar, áreas cultivadas, sin antecedentes de aplicación de NEP, y de vegetación natural. Se registraron los datos de altitud y coordenadas geográficas de cada área, con un GPS Map 76C Sx Garmin. Los datos promedios de lluvias anuales (2000-2010) de los sitios muestreados se obtuvieron de la red de estaciones meteorológicas del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) y del Instituto Nacional de Hidrología y Meteorología (INAMEH) (Rodríguez *et al.* 2006).

A inicios del período lluvioso de los años 2009 a 2011, las muestras de suelo se tomaron con palines a una profundidad de 10 - 25 cm. Se conformaron muestras compuestas por varias submuestras, tomadas en 10 puntos, en un radio de 8 - 10 m al punto central de muestreo, hasta completar 1 kg de suelo. Se colocaron en bolsas de polietileno para minimizar la deshidratación. Se etiquetaron con la información geográfica correspondiente y almacenaron en un envase con aislamiento térmico.

Las muestras se trasladaron al Laboratorio de Nematología del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas - Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP), ubicado en la sede administrativa del INIA, Maracay, estado Aragua. Se registraron los datos correspondientes al tipo de vegetación, de cada sitio de muestreo. Los palines se desinfectaron con alcohol (70 %) cada vez que se utilizaron, antes de retirarse del sitio de muestreo.

Las muestras se procesaron en el laboratorio, la misma semana en que se colectaron. Se homogeneizaron y procesaron, según la metodología de Bedding y Atkurst (1975), colocando 300 g de suelo húmedo por contenedor plástico de 12 onzas (dos para cada muestra). En cada contenedor, se utilizaron como cebo, 10 larvas de último instar de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), procedentes de una cría estandarizada según metodología propia del Laboratorio de Nematología INIA-CENIAP (Rosales *et al.* 2009). Los contenedores se invirtieron e incubaron a temperatura ambiente ($27 \pm 2^\circ\text{C}$) y oscuridad (12 h / 12 h), por 12 días. Durante este tiempo, los contenedores se revisaron diariamente para observar las larvas. Se seleccionaron las que presentaron la sintomatología de parasitismo que causan los NEP, como cambios de coloración y cese de movimientos.

Las larvas de *G. mellonella* muertas, se lavaron suavemente con alcohol (70 %) y agua destilada estéril y se colocaron en trampas White, para obtener los juveniles infectivos (JI), por el método de trampas modificado (Woodring y Kaya 1988). Los JI que emergieron de las larvas procedentes de un mismo contenedor, se consideraron un aislamiento. En los casos en que, al revisar los contenedores, no se encontró ninguna larva

parasitada, el proceso se repitió una vez más para confirmar la presencia/ausencia de NEP (Zadji *et al.* 2013).

En primera instancia, la determinación de géneros se efectuó según la coloración que presentaron las larvas al momento del parasitismo. Esta corresponde al color marrón rojizo para el género *Heterorhabditis* y beige crema para *Steinernema* (Poinar 1990). Después de inocular las larvas de *G. mellonella*, al quinto día, se disectaron para identificar la presencia de adultos hermafroditas, en la primera generación, para el género *Heterorhabditis*; de machos y hembras para el género *Steinernema* (Adams y Nguyen 2002). La determinación de especies se realizó por estudios moleculares (secuenciación), en el Laboratorio de Protección Vegetal, del Centro de Estudios Botánicos y Forestales del Instituto Venezolano de Investigación Científica (IVIC) – Zulia.

Los aislamientos obtenidos se mantuvieron en el cepario del INIA-CENIAP, con ciclos sucesivos de infección-reproducción en *G. mellonella*, según metodología de Dutky *et al.* (1964).

La frecuencia de recuperación (FR) y la abundancia (A) de NEP se calcularon mediante las siguientes fórmulas (Liu y Berry 1995):

$$FR = \left(\frac{\text{Número de muestras positivas}}{\text{Número total de muestras}} \right) \times 100$$

$$A = \frac{\text{Número de lugares positivos}}{\text{Número total de lugares muestreados}}$$

Un duplicado de cada muestra de suelo se procesó en el Laboratorio de Suelos del INIA – CENIAP, para determinar pH y textura, con los métodos potenciométrico y Boyoucos, respectivamente (Gilabert *et al.* 1990).

Se empleó la Estadística Descriptiva a través del cálculo de las frecuencias relativas para conocer la distribución de NEP según el género y la presencia de los mimos, según los tipos de suelo. Con la Estadística Inferencial no paramétrica, a través de la prueba Chi-cuadrado (χ^2) de independencia (Siegel y Catellan, 2009) se determinó la asociación entre la frecuencia de recuperación y las variables: tipo de suelo, altitud, vegetación asociada y pH, bajo un nivel de significancia del 5 % ($\alpha = 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del total de 218 muestras procesadas se obtuvieron 21 aislamientos de NEP, lo que representó una Frecuencia de Recuperación (FR) de 9,63 %, valor que se enmarca dentro de los intervalos informados mundialmente (Cagnolo *et al.* 2016). Se encontraron NEP en los siete estados visitados (Cuadro 1).

El porcentaje de recuperación de aislados de NEP varía de una región a otra. Entre 2,8 y 15,7 % son los valores que se reportaron en países de América Latina (López Nuñez *et al.* 2007; Edgintong *et al.* 2010; Myers *et al.* 2015). El valor de FR que se obtuvo en la presente investigación se considera aceptable, tomando en consideración el número de muestras. Para la abundancia (A), el valor que se obtuvo fue bajo (0,10), en comparación con estudios similares que obtuvieron valores de 4,86 (Sánchez 2002) y 16,1 (Giayetto y Cichón 2006).

El hallazgo de muestras positivas en todos los estados evaluados, sugiere la existencia de una amplia distribución de poblaciones de NEP en Venezuela. Esto debe ser objeto de investigaciones futuras. De las poblaciones que se encontraron (Cuadros 2 y 3), 20 pertenecen al género *Heterorhabditis* (95,23 %) y una a *Steinernema* (4,76 %); esta última proveniente del estado Mérida.

En estudios previos en el país, Rosales *et al.* 1998; Fan *et al.* 2000; San Blas *et al.* 2015b, localizaron poblaciones de NEP de ambos géneros.

La presencia de NEP en las muestras se distribuyeron según su género (Cuadro 3): *Heterorhabditis indica* (9,52 %); *Heterorhabditis amazonensis* (23,80 %); *Heterorhabditis* spp. (61,90 %); y *Steinernema* sp. (4,76 %). El 86 % de los aislamientos se obtuvieron en áreas cultivadas.

De acuerdo al tipo de suelo, de las localidades positivas para la presencia de NEP, con igual porcentaje, el 28,57 % corresponde tanto a los suelos arenoso y franco arenoso. Se observó una mayor presencia de *Heterorhabditis* spp. en el suelo arenoso (19,05 %) y en el suelo franco arenoso (14,28 %).

Diversos estudios de prospecciones de NEP en otros países, han reportado la ocurrencia de ambos géneros. Se señala que, la familia Heterorhabditidae es endémica, de climas calientes, y la familia Steinernematidae de climas templados. En las zonas tropicales y subtropicales es de esperar una predominancia de *Heterorhabditis*, aunque este planteamiento difiere entre autores, porque otros indican la predominancia de *Steinernema* en otras áreas geográficas (López-Núñez *et al.* 2007, Edginton *et al.* 2010, Cagnolo *et al.* 2016).

Cuadro 1. Distribución geográfica de las muestras de suelo colectadas, número de aislamientos de nematodos entomopatógenos encontrados, frecuencia de recuperación y abundancia.

Estado	Muestras colectadas	Aislamientos identificados	Frecuencia de Recuperación (%)		Abundancia ***
			(Total)*	(Estado)**	
Amazonas	10	2	0,92	20,00	0,20
Aragua	47	5	2,29	10,64	0,11
Mérida	36	3	1,38	8,33	0,08
Miranda	25	2	0,92	8,00	0,08
Táchira	22	2	0,92	9,09	0,09
Sucre	38	5	2,29	13,15	0,13
Yaracuy	40	2	0,92	5	0,05
Total	218	21	9,63	n/a	0,10

* (muestras positivas / total de muestras) x 100; ** (muestras positivas / total de muestras para cada estado) x 100;

*** sitios positivos / sitios totales muestreados; n/a: No aplica.

Cuadro 2. Ubicación geográfica, vegetación asociada, tipo de suelo y características climáticas de las localidades donde se obtuvieron nematodos entomopatógenos.

Código de la muestra	Localidad	Vegetación asociada	Altitud (m.s.n.m.)	Tipo de suelo	pH del suelo	Precipitación media anual (mm)	NEP
INIA-1	Finca Porras, Colonia Tovar, municipio Tovar, Aragua. 10.4106845, -67.2854661	Durazno (<i>Prunus persica</i> L.)	1.620	Franco arenoso	5,4	1.172	<i>Heterorhabditis amazonensis</i>
INIA-2	Finca Mucumba, Timotes, municipio Miranda, Mérida 8.9966086, -70.7508375	Ajo (<i>Allium sativa</i> L.)	3.000	Franco arcillo-limoso	6,6	1.300	<i>Heterorhabditis</i> sp.
INIA-3	Finca Era, Santo Domingo, municipio Cardenal Quintero, Mérida 8.8553901, -70.7013988,	Papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	2.230	Franco arenoso	5,7	1.257	<i>Heterorhabditis</i> sp.
INIA-4	Estación Experimental Mucuchíes, INIA, municipio Rangel, Mérida 8.7603323, -70.9013066,16	Papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	2.893	Franco arcilloso	7,3	823	<i>Steinernema</i> sp.
INIA-5	Estación Experimental Bramón INIA, Hacienda El Trompillo, municipio Acevedo, Táchira 7,650000, -72,383333	Cafeto (<i>Coffea arabica</i> L.)	1.105	Franco limoso	5,8	1.350	<i>Heterorhabditis</i> sp.
INIA-6	Estación Local Pueblo Hondo INIA, municipio Jáuregui, San Cristóbal, Táchira 8.2516667, -71.9286206	Papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	2.379	Franco arcilloso	5,9	1.745	<i>Heterorhabditis</i> sp.
INIA-7	Sector Corral de Piedras, río El Corozo, El Limón, municipio Mario Briceño Iragorry, Aragua 10.3155251, - 67.6396106	<i>Heliconia</i> spp.	465	Franco limoso	7,2	974	<i>Heterorhabditis indica</i>
INIA-8	Núcleo de desarrollo endógeno José Félix Ribas, El Hondón, municipio Revenga, Aragua 10.2463269, -67.2523436,16	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	950	Franco arenoso	6,4	1.019	<i>Heterorhabditis indica</i>
INIA-9	Núcleo de desarrollo endógeno José Félix Ribas, El Hondón, municipio Revenga, Aragua 10.2463269, -67.2523436,16	Pimentón (<i>Capsicum annum</i> L.)	950	Franco arenoso	6,3	1,019	<i>Heterorhabditis amazonensis</i>
INIA-10	Campo Experimental Padrón, sector Tapipa, municipio Acevedo, Miranda. 10.131400, -66.17788	Cítricos (<i>Citrus</i> spp.)	41	Arenoso	5,3	313,7	<i>Heterorhabditis amazonensis</i>

Cuadro 2. cont...

INIA-11	Estación Experimental Amazonas INIA Puerto Ayacucho, municipio Atures, Amazonas 5.6164782, -67.6046211	Sin cultivar (Gramíneas silvestres)	139	Arenoso	5,8	2.233	<i>Heterorhabditis</i> sp.
INIA-12	Farriar, municipio Veroes, Yaracuy 10.4976568, -68.571915,21	Ají dulce (<i>Capsicum annuum</i> L.)	107	Franco arenoso	6,8	1.900	<i>Heterorhabditis</i> sp.
INIA-13	Estación Experimental Yaritagua, Km. 3 vía El Rodeo, municipio Peña, Yaracuy 10.0444368, -69.0883358	Caña de Azúcar (<i>Saccharum</i> <i>officinarum</i> L.)	308	Franco arcilloso	5,7	874	<i>Heterorhabditis</i> sp.
INIA-14	Finca Misle, El Jarillo, municipio Guaicaipuro, Miranda. 10.3558226, -67.1810874	Tomate de árbol (<i>Cyphomandra</i> <i>betacea</i> (Cav.) Sendtn)	1.670	Franco limoso	6,4	1.154	<i>Heterorhabditis</i> <i>amazonensis</i>
INIA-15	Finca Infante, municipio Ature, Amazonas. 5.641599, -67.5856667	Túpiro (<i>Solanum</i> <i>sessiliflorum</i> Dunal)	140	Arenoso	5,4	2.233	<i>Heterorhabditis</i> sp.
INIA-16	Centro Formación Socialista Agro- pecuario Tunapuy, Sector Tunapuy, municipio Libertador, Sucre. 10.5817227, -63.0453999,14	Lechosa (<i>Carica papaya</i> L.)	53	Arcillo limoso	4,7	1.353	<i>Heterorhabditis</i> sp.
INIA-17	Morahal, Parroquia Chacopata, municipio Cruz Salmerón Acosta, Sucre. 10.680950, -63.819756	Musáceas (<i>Musa</i> spp)	20	Arenoso limoso	4,7	243,8	<i>Heterorhabditis</i> sp.
INIA-18	Playa Paraíso, salida de Güiria vía Macuro, Cocal, municipio Valdéz, Sucre 10.5827014, -62.2915042	Sin cultivar (Arena de playa)	10	Arenoso	5,2	1.108	<i>Heterorhabditis</i> sp.
INIA-19	La Ensenada de Playa Grande, municipio Bermúdez, estado Sucre 10.6666488, -63.2756717	Uva de playa (<i>Coccoloba uvifera</i> (L.) L.)	3	Arenoso	4,9	855	<i>Heterorhabditis</i> sp.
INIA-20	Campo Experimental Irapa, municipio Mariño, Sucre 10.594944, -62.554752	Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	49	Franco arenoso	5,7	1.600	<i>Heterorhabditis</i> sp.
INIA-21	Orilla del río La Trilla, municipio Costa de Oro, Aragua 10.4485764, -67.7702796	<i>Heliconias</i> spp.	127	Arenoso	4,5	1.120	<i>Heterorhabditis</i> <i>amazonensis</i>

Cuadro 3. Distribución de los NEP según el tipo de suelo.

Identificación del NEP	Tipo de Suelo							Total
	Arenoso	Arenoso limoso	Franco arenoso	Franco arcilloso	Franco limoso	Franco arcilloso limoso	Arcilloso limoso	
<i>Heterorhabditis indica</i>	f			1		1		2
	Fr			4,76 %		4,76 %		9,52 %
<i>Heterorhabditis amazonensis</i>	f	2		2		1		5
	Fr	9,52 %		9,52 %		4,76 %		23,80 %
<i>Heterorhabditis</i> spp.	f	4	1	3	2	1	1	13
	Fr	19,05 %	4,76 %	14,28 %	9,52 %	4,76 %	4,76 %	61,9 %
<i>Steinernema</i> sp.	f				1			1
	Fr				4,76 %			4,76 %
Total	f	6	1	6	3	3	1	21
	Fr	28,57 %	4,76 %	28,57 %	14,28 %	14,28 %	4,76 %	100

f = Aislamientos hallados; Fr = Proporción de aislamientos hallados

Con relación a la altitud, la población de *Steinernema* se halló a 2.893 m.s.n.m. Varios autores refieren la afinidad del género *Steinernema* por las zonas de clima frío y de mayor altitud (Argotti *et al.* 2010; Campos-Herrera *et al.* 2007). Contrario a esto, en Venezuela se colectó *Steinernema papillatum* y *Steinernema goweni* n. sp. (San Blas *et al.* 2015a, 2016) ambas en una zona que no supera los 10 m.s.n.m. Esto permite señalar que, para nuestro país, el rango de altitud donde se puede ubicar este género de NEP es amplio y sin limitación de la altura para su distribución. Los aislamientos de *Heterorhabditis* se hallaron desde 20 hasta 3.000 m.s.n.m, lo que evidencia el amplio rango de adaptabilidad que posee este género con relación a la altura. Esto coincide con Edgington *et al.* (2010), quienes señalaron la presencia de estos NEP en un rango desde 0 hasta 4.200 m de altitud.

Un estudio previo hecho en Venezuela, obtuvo un agrupamiento para los nematodos relacionado con la altitud sobre el nivel del mar. El dendrograma resultante del análisis de las distancias genéticas para los NEP mostró la formación de

dos grupos donde en el grupo I se localizaron los aislamientos colectados entre los 20-950 m.s.n.m. y en el grupo II se ubican los aislados colectados a 1.105-3.000 m.s.n.m (Peteira *et al.* 2014).

Los factores que determinan la presencia de NEP en zonas específicas son diversos. La distribución de estos a escala global está probablemente, influenciada por el clima y por eventos de dispersión que incluyen los asociados a la actividad humana. La distribución local, estaría influida por la textura del suelo, vegetación y disponibilidad de hospedantes (Valadas *et al.* 2014). Sin embargo, Campos-Herrera *et al.* (2016) establecieron que más que la vegetación, son las propiedades edáficas, principalmente las que afectan la humedad, las que pueden asociarse a los patrones espaciales de los NEP. Conocer esta información podría mejorar la detección de los mismos.

El mayor número de poblaciones de NEP que se hallaron en este estudio, provino de las muestras de suelo tomadas de zonas agrícolas cultivadas (76 %). El resultado coincidió con Zepeda-Jazo *et al.* (2014), quienes indican que hay alta prevalencia

de NEP en suelos cultivados. Esto puede guardar relación con la presencia de siembras con alta incidencia de plagas, como lo refirió Yan *et al.* (2016).

Los autores encontraron *Heterorhabditis* y *Steinernema*, en 35 % de las muestras de suelo provenientes de los agroecosistemas. Montores-Ramírez *et al.* (2016) reportaron que el mayor número de muestras positivas a NEP fue en sitios cultivados, y se pudiera asociar a la presencia de alto contenido de materia orgánica, con humedad continua y uso de fertilización orgánica. Esto podría favorecer el establecimiento de poblaciones de NEP.

Se infiere que hay una alta probabilidad de encontrar NEP en las áreas agrícolas por la confluencia de los factores antes mencionados. Sharmila *et al.* (2018), señalan que, en cultivos intensivos, la preparación del suelo expone los nematodos a la desecación, por lo que disminuyen sus poblaciones; sin embargo, agroecosistemas más estables como café, pastos y cultivos perennes, favorecen la presencia de los mismos. Jaffuel *et al.* 2018, compararon NEP provenientes de zonas agrícolas, bosques y praderas y los valores de abundancia, riqueza y diversidad no variaron entre los tres ecosistemas. Pero los NEP provenientes de las praderas tuvieron mayor capacidad de matar insectos. Esto resaltó la importancia de evaluar conjuntamente los factores abióticos y bióticos.

En referencia al tipo de suelo, el mayor grupo de aislamientos de NEP se recuperó de suelos arenosos y franco arenosos, ambos con (28,57 %), seguido de franco-limosos y franco arcillosos ambos con (14,28 %); y arenoso-arcilloso, arenoso- limoso y franco-arcillo-limoso, cada tipo con 4,76 % de las muestras. Argotti *et al.* (2010) consiguieron *Heterorhabditis* en suelos francos y franco-arenosos y *Steinernema* en franco-limosos. Habitualmente, en suelos orgánicos de texturas arenosas y franco arenosas, la supervivencia y el desplazamiento son mayores que en suelos arcillosos (Melo *et al.* 2009)

Los NEP se encuentran dispersos en el ambiente y para su uso, necesitan ser ubicados mediante muestres masivos. La habilidad de los JI para

distribuirse en el suelo y localizar al hospedante es esencial para la sobrevivencia de las poblaciones naturales de nematodos. El movimiento de los JI en el suelo se realiza principalmente sobre la película de agua. De allí, la importancia de la humedad del suelo, que tiene una relación estrecha con la textura y el contenido de materia orgánica del mismo. El tamaño de los poros del suelo, en combinación con una mayor humedad, limita los niveles de oxígeno y, como consecuencia, la actividad y la supervivencia de los JI (Shapiro-Ilan *et al.* 2017). Por consiguiente, la sobrevivencia de los JI y las posibilidades de encontrarlos en un muestreo, pudiera disminuir en suelos de textura fina, lo cual coincide con nuestros resultados.

En general, los NEP tiene preferencia por los suelos arenosos, aunque no es limitante. Estos han sido reportados en una amplia variedad de hábitats y tipos de suelo, abarcando todas las combinaciones texturales conocidas (Shapiro-Ilan *et al.* 2014)

Los NEP se encontraron en suelos con un rango entre 4,7 y 7,3 de pH del suelo. Esto coincide con resultados de otros países donde han encontrado estos organismos en suelos con pH desde 4,76 hasta 9,2 (Devi *et al.* 2016). Está demostrado el gran rango de adaptabilidad al pH del suelo que tienen los NEP; su distribución no se asocia a un rango de pH en particular. El pH del suelo, no parece ser una limitante para el desarrollo y presencia de estos nematodos. La mayoría de los agroecosistemas poseen un pH que varía de 4-8, lo que facilita su utilización como controladores biológicos de plagas en cultivos.

Con relación a las dos especies encontradas *H. amazonensis* y *H. indica* ambas destacan por su uso en otros países para el control de plagas (Campos-Herrera *et al.* 2016). En Venezuela, resta realizar los correspondientes estudios de patogenicidad sobre los insectos plagas de los cultivos y hacer los ajustes para su aplicación.

Con la prueba Chi-cuadrado (χ^2) se encontró significancia estadística ($P < 0,05$) entre la frecuencia de recuperación y el tipo de suelo, así como entre la frecuencia de recuperación y la altitud (Cuadro 4). El mayor valor de la frecuencia de

Cuadro 4. Valores de Ji-cuadrado (χ^2) y probabilidad asociada (P) de la frecuencia de recuperación y las variables: tipo de suelo, altitud, tipo de vegetación y pH del suelo.

Pruebas de la frecuencia de recuperación	Variables			
	Tipo de suelo	Altitud m.s.n.m.	Vegetación asociada	pH del suelo
χ^2	18,36	15,7	5,44	5,83
P	0,04*	0,04*	0,07	0,21

recuperación (28,57 %) se registró en las áreas con predominio de los suelos franco arenoso y arenoso, así como, en una altitud de alto predominio de 0 - 300 m.

La generación de información relacionada a los NEP es muy valiosa para nuestro país, ya que va conformando una base de conocimiento para un área que está presta a ser desarrollada, como un componente importante de la implementación del control biológico de insectos plaga.

CONCLUSIONES

Se encontraron NEP en todos los estados del país muestreados, lo que evidenció la potencialidad que tiene Venezuela como fuente de estos organismos.

La mayor cantidad de NEP se detectó en suelos cultivados y con un alto contenido de arena.

Se deben incrementar los muestreos para explorar otras localidades del país, que con seguridad revelarán nuevas cepas con las características requeridas para diferentes situaciones de plaga – cultivo.

AGRADECIMIENTO

Convenio Cuba Venezuela, Proyecto "Producción de nematodos entomopatógenos para el control de plagas agrícolas". A los Ingenieros Agrónomos Guillermo Briceño, Johangel García y al técnico Edward Espín por su colaboración en el trabajo de campo y laboratorio.

LITERATURA CITADA

- Adams, B; Nguyen, K. 2002. Taxonomy and Sistematics. In: Entomopathogenic Nematology. Edited by R. Gaugler. CAB International. p:1-34
- Aguilera, M; Azocar, A; González, E. 2003. Venezuela un país megadiverso. En: Biodiversidad en Venezuela. Tomo II. Editado por Fundación Polar. p:61-81
- Argotti, E; Gallegos, P; Alcázar, J; Kaya, H. 2010. Patogenicidad de nematodos entomopatógenos del género *Steinernema* y *Heterorhabditis* sobre larvas de *Tecia solanivora* en Ecuador. Boletín Técnico 9. Serie Zoológica 6:162-17.
- Bedding, RA; Akhurst, RJ.1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. Nematologica 21:109-110.
- Cagnolo, S; Carranza, F; Trimarchi, L; Bertolotti, M. 2016. New findings of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema rarum* (Nematoda: Heterorhabditidae, Steinemematidae) in Córdoba, Argentina. Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales, n.s. 18(2):191-199.
- Campos-Herrera, R; Escuera, M; Labrador, S. Robertson, L; Barrios, L; Gutiérrez, C. 2007. Distribution of the entomopathogenic nematodes from La Rioja (Northern Spain). Journal of invertebrate Pathology 95 (2): 125-139.
- Campos-Herrera, R; El Borai, F; Rodríguez, J; Duncan, L. 2016. Entomopathogenic nematode food web assemblages in Florida natural areas. Soil Biology and Biochemistry 93:105–114.

- Devi, G; Mishra, H; Brattacharyya, B; Nath, DJ. 2016. Occurrence of entomopathogenic nematode (Rhabditida: Heterorhabditidae, Steinernematidae) in whitegrubs infested areas of Majuli, Assam. *Indian Journal of Biopesticides* 9(2):148 -156.
- Dutky, SR; Thompson, JV; Cantwell, GE. 1964. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. *Journal of Insect Pathology* 6:417-422.
- Edgington, S; Buddie, A; Moore, D; France, A; Merino, L; Tymo, L; Hunt, DJ. 2010. Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes in Chile. *Nematology* 12:915-928.
- Fan, X; Maggiorani, A; Gudiño, S. 2000. Uso de nematodos entomopatógenos como una alternativa en el control de la polilla (*Tecia solanivora*), importante plaga de la papa (*Solanum tuberosum*). Mérida. Venezuela. *Revista Forestal Venezolana* 44(1):115-118
- Giayetto, A; Cichón, L. 2006. Distribución, gama de huéspedes y especificidad de cinco poblaciones de *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae) del Alto Valle de Río Negro y Neuquén, Argentina. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 35:163-183.
- Gilabert de B, J; López de R, Y; Pérez de R, Y. 1990. Manual de métodos y procedimientos de referencia. Análisis de suelos para diagnóstico de fertilidad. Fonaiap- Ceniap. Serie D. N°28. 164 p.
- Jaffuel, G; Blanco-Pérez, R; Hugc, AS; Chiribogaa, X; Meulic, RG; Mascherd, F; Turlingsa, T; Campos-Herrera, R. 2018. The evaluation of entomopathogenic nematode soil food web assemblages across Switzerland reveals major differences among agricultural, grassland and forest ecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 262: 48–57.
- Liu, J; Berry, RE. 1995. Natural distribution of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Oregon soils. *Environmental Entomology* 24:159-216.
- López-Nuñez, JC; Cano, L; Gongora, C; Stock, SP. 2007. Diversity and evolutionary relationship of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) from the Central Andean region of Colombia. *Nematology* 9: 333 – 341.
- Melo, EL; Ortega, CA; Susurluk, A; Gaigl, A; Bellotti, A. 2009. Poblaciones nativas de nematodos entomopatógenos (Rhabditida) en cuatro departamentos de Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 35:28-33.
- Miranda-Contreras, I; Gómez-Pérez, R; Rojas, G; Cruz, I; Berrueta, L; Salmen, S; Colmenares, M; Barreto, S; Balza, A; Zavala, L; Yasmin, Y; Osuna, J. 2013. Occupational Exposure to Organophosphate and Carbamate Pesticides Affects Sperm Chromatin Integrity and Reproductive Hormone Levels among Venezuelan Farm Workers. *Journal of Occupational Health* 55: 195–203.
- Montores-Ramírez, J; Cortés-Madriral, H; Zepeda-Jazo, I. 2016. Presencia de nematodos entomopatógenos *Steinernema* Travassos, 1927 y *Heterorhabditis* Poinar, 1976, en la Ciénaga de Chapala, Michoacán, México. *Entomología mexicana* 3:262-268.
- Myers, RY; Sipes, BS; Matsumoto, TK; Mello, CL; Mello, JS. 2015. Occurrence and distribution of Heterorhabditid populations in the Hawaiian Islands. *Nematropica* 45:198-207.
- Patibanda, AK; Ranganathswamy, M. 2018. Effect of Agrichemicals on Biocontrol Agents of Plant Disease Control. In: *Microorganisms for Sustainability. Volume 2: Microbes for Sustainable Agro-ecosystem*. Panpatte, DG; Jhala, YK; Shelat, HN; Rajababu, V. (Editors). Springer Nature Singapore Pte Ltd. p:1- 21.
- Peteira, B; Rodríguez, MG; Rosales, LC; Maselli, A; Casado, R; Castro, L; Salazar, E; Enrique, R; Miranda, I. 2014. Variabilidad molecular de aislamientos venezolanos de nematodos entomopatógenos y sus bacterias simbioses. *Revista Protección Vegetal* 29 (2):112-121.
- Poinar, GO. 1990. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. in R. Gaugler and H. K. Kaya, eds.

- Entomopathogenic nematodes in biological control. Boca Raton, FL: CRC Press. p:23–62.
- Rodríguez, MF; Cortéz, A; Nuñez, MC; Ovalles, F; Rey, JC. 2006. Distribución espacial de las redes meteorológicas en Venezuela. INIA Divulga 8:23-30.
- Rosales, LC; Rodríguez, MG; Enrique, R; Puente, L; García, J. 2009. Cría masiva de nematodos entomopatógenos para el control de plagas. INIA Divulga 12:19–22.
- Rosales, LC; Suárez H, Z. 1998. Evaluación de nematodos entomopatógenos como posibles agentes de control biológico contra *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae). Revista de Entomología Venezolana 13:122-140.
- San-Blas, E; Rosales C; Torres, Á. 2015a. Entomopathogenic Nematodes in Tropical Agriculture: Current Uses and Their Future in Venezuela. In: Campos-Herrera R. (eds) Nematode Pathogenesis of Insects and Other Pests. Ecology and applied technologies for Sustainable in Plant and Crop Protection. Springer, Cham. p:365-389.
- San-Blas, E; Portillo, E; Nnermut, J; Ppuža, V; Morales, P. 2015b. *Steinernema papillatum* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Venezuela. Nematology. 17:1081-1097.
- San-Blas, E; Morales-Montero, P; Portillo, E; Nnermut, J; Puza, W. 2016. *Steinernema goweni* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Zulia State, Venezuela. Zootaxa 4067 (2): 200–214
- Sánchez, L. 2002. *Heterorhabditis bacteriophora* HC1. Estrategia de desarrollo como agente de control biológico de plagas insectiles. Tesis de grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. UNAH, La Habana, Cuba. 100 p.
- Siegel, S; Catellan, NJ. 2009. Estadística no paramétrica. México: Trillas. 435 p.
- Shapiro-Ilan, I; Brown, I; Lewis, E. 2014. Freezing and Desiccation Tolerance in Entomopathogenic Nematodes: Diversity and Correlation of Traits. Journal of Nematology 46(1):27–34.
- Shapiro-Ilan, I; Hazir, S; Glazer, I. 2017. Basic and Applied Research: Entomopathogenic Nematodes. Chapter 6. In: Microbial Control of Insect and Mite Pests from Theory to Practice. Edited by Lawrence A. Lacey. Elsevier Inc. p:91-105.
- Sharmila, R; Shanmuga P, R; Subramanian, S; Poornima, K; Pandiyan, M. 2018. Review on ecology of entomopathogenic nematodes. Journal of Entomology and Zoology Studies 64:1086-1093.
- Valadas, V; Laranjo, M; Mota, M; Oliveira, S. 2014. A survey of entomopathogenic nematode species in continental Portugal. Journal of Helminthology 88(3):327-41. DOI: 10.1017/S0022149X13000217.
- Woodring, JL; Kaya, HK. 1988. Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: A handbook of biology and techniques. Southern Cooperative Series Bulletin 331, Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, AR. 123 p.
- Yan, X; Waweru, B; Qiu, X; Hategekimana, A; Kajuga, J; Li, H; Edgington, S; Umulisa, C; Han, R; Toepfer, S. 2016. New entomopathogenic nematodes from semi-natural and smallholder farming habitats of Rwanda, Biocontrol Science and Technology. 26(6):820-834, DOI: 10.1080/09583157.2016.1159658
- Zadji, L; Hugues, B; Baimey, L; Afouda, L; Houssou, FG; Waeyenberge, L; de Sutter, N; Moens, M; Decraemer, W. 2013. First record on the distribution of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) in Southern Benin. Russian Journal of Nematology 21(2):117-130.
- Zepeda-Jazo, I; Molina-Ochoa, J; Lezama-Gutierrez, R; Skoda, S. 2014. Survey of entomopathogenic nematodes from the families Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nematoda: Rhabditida) in Colima, México. International Journal of Tropical Insects Science 34:53-57.

Efecto de diferentes reguladores de crecimiento sobre la embriogénesis somática en tres cultivares de cacao

Andy Arturo Díaz-López^{1*}, Efraín Gerardo Salazar-Yamarte^{1†}, José Gerardo Albarrán-Rincón¹, Carlos Marín¹, Ariadne Lucrecia Vegas-García²

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP). Maracay, Venezuela. ²Universidad Agraria del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrarias. Guayaquil, Ecuador. *Correo electrónico: diazaa35@gmail.com

RESUMEN

Los métodos de propagación tradicionales en el cultivo de cacao son pocos eficientes, por el bajo número de plantas que se producen; estas, pueden presentar características agronómicas indeseables para los productores. La embriogénesis somática puede ser la vía más apta para la regeneración de accesiones de cacao. Se evaluó el efecto del 2,4-D y su combinación con 6-BA y kinetina en la embriogénesis somática de cacao. Se usaron cinco concentraciones de 2,4-D (0; 0,5; 1; 1,5 y 2 mg.L⁻¹) combinadas con 0,05 mg.L⁻¹ de 6-BA y 0,3 mg.L⁻¹ de kinetina sobre el índice de formación de callos (IC) y la formación de embriones somáticos en tres cultivares de cacao (SCA-6, OC-60 y CNM-4), con dos tipos de explantes (estaminodios y pétalos). A los 14 y 28 días de subcultivo se evidenció una respuesta diferencial entre cultivares y tipo de explante en el IC. El mayor IC14 y de IC28 ocurrió en estaminodios y pétalos cultivados en 0,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 6-BA, con valores respectivos de 11,6 y 29. La mayor frecuencia embriogénica (40 %) y número de embriones somáticos se obtuvo en estaminodios de SCA-6 con 1,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D, a diferencia de los embriones obtenidos en los pétalos cultivados en 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 6-BA. El análisis de componentes principales mostró alta correlación entre la concentración de reguladores de crecimiento, tipo de explante y las variables relacionadas con la embriogénesis; así como, una baja correlación de estas con los IC14 y IC28.

Palabras clave: medio de cultivo, micropropagación, pétalos, *Theobroma cacao* L.

Effect of different growth regulators on somatic embryogenesis in three cocoa cultivars

ABSTRACT

Traditional propagation methods in cocoa cultivation are not very efficient, due to the low number of plants that are produced; these may present undesirable agronomic characteristics for producers. Somatic embryogenesis may be the most suitable route for the regeneration of cocoa accessions. The effect of 2,4-D and its combination with 6-BA and kinetin on somatic embryogenesis of cocoa was evaluated. Five concentrations of 2,4-D (0; 0,5; 1; 1,5 and 2 mg.L⁻¹) were used combined with 0,05 mg.L⁻¹ of 6-BA and 0,3 mg.L⁻¹ of kinetin on the callus formation index (IC) and the formation of somatic embryos in three cocoa cultivars (SCA-6, OC-60 and CNM-4), with two types of explants (staminodes and petals). At 14 and 28 days of subculture, a differential response was evident between cultivars and type of explant in the IC. The highest IC14 and IC28 occurred in staminodes and petals grown in 0,5 mg.L⁻¹ of 2,4-D and 6-BA, with respective values of 11,6 and 29. The highest embryogenic frequency (40 %) and the highest number of somatic embryos was obtained in staminodes of SCA-6 with 1,5 mg.L⁻¹ of 2,4-D, unlike the embryos obtained in the petals grown in 2 mg.L⁻¹ of 2,4-D and 6-BA. The principal component analysis showed a high correlation between the concentration of growth regulators, type of explant and the variables related to embryogenesis; as well as a low correlation of these with IC14 and IC28.

Key words: culture media, micropropagation, petals, *Theobroma cacao* L.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) tiene gran importancia en la economía de muchos países tropicales, por el uso de su producción. De la almendra se obtiene el licor o pasta de cacao, al moler las semillas de cacao tostado, fermentadas o no; la manteca que se utiliza para cosméticos, en forma de preparaciones o ungüentos contra la resequedad de la piel y los labios; en la preparación de chocolate blanco y en panadería y repostería. El polvo de cacao, por su parte, se usa para la elaboración de chocolates, bombones y otros productos de confitería (Quintero *et al.* 2017).

En Venezuela, la baja productividad del cultivo de cacao está influida por la presencia de enfermedades; la pérdida progresiva de cultivares tipo criollo, por la obtención de un mayor rendimiento; plantaciones abandonadas; pocos programas de asistencia técnica, transferencia de tecnología y la falta de una infraestructura apropiada (Quintero y García 2010). Otro problema es la alta variabilidad genética en las plantaciones de cacao, como consecuencia de su condición alógama, debido a la incompatibilidad polen-estilo.

Para mantener la uniformidad de los materiales genéticos de cacao se tiene la propagación asexual, por estacas e injertación. Estos no resultan ser los métodos más eficientes, por el dimorfismo vegetativo de la planta, como tallos ortotrópicos que originan una raíz pivotante; su número es reducido, lo que limita su uso. Otro, los tallos plagiotrópicos, que son más numerosos y forman un sistema radical poco profundo; esto restringe la resistencia a la sequía y origina un sistema aéreo desequilibrado, que requiere de cortes frecuentes (Ramos y Gómez 2002).

La embriogénesis somática representa una alternativa para obtener materiales genéticos de cacao uniformes. Es definida por Williams y Maheswaran (1986), como el proceso donde las células haploides o diploides se desarrollan en plantas diferenciadas sin la fusión de gametos. Los embriones somáticos son estructuras bipolares, con un eje radical-apical y no poseen conexión vascular con el tejido materno; son capaces de crecer y formar plantas. Se puede utilizar en los programas de conservación y de

mejora genética de muchas especies vegetales (Gómez 1998; Celestino *et al.* 2005).

Ese proceso morfogénico se ha utilizado en la propagación de plantas de cacao, con diferentes tipos de explantes, tales como: pétalos, estaminodios y cotiledones; así como, diferentes medios de cultivo y fuentes de carbono (Henao *et al.* 2018; Bustami y Werbrouck 2018; García *et al.* 2018).

En Venezuela, Velásquez *et al.* (2006) realizaron modificaciones en la concentración de la fuente de carbono y reguladores de crecimiento, en el medio de cultivo; concluyeron que la inducción de embriones somáticos, a partir de explantes florales, está influenciada por el cultivar y el tamaño del botón floral.

Díaz-López *et al.* (2015) evaluaron el efecto del tiempo de subcultivo (14; 28 y 42 días) sobre la embriogénesis somática, en cinco cultivares de cacao venezolanos. En la metodología utilizaron dos tipos de explante inicial: pétalos y estaminodios; obtuvieron un mayor número de embriones en los estaminodios subcultivados cada 28 días.

Henao *et al.* (2018) desarrollaron un protocolo de regeneración de plantas de cacao, vía embriogénesis secundaria, en diferentes cultivares de origen colombiano. Con este, evaluaron el efecto de dos medios de cultivo, tipo de explante y tiempo de subcultivo, sobre la formación de embriones. En los resultados, encontraron diferencias en la capacidad de respuesta de los cultivares a la inducción del proceso embriogénico.

Las plantaciones de cacao, en Venezuela, están constituidas con alto número de árboles de avanzada edad y baja producción (Quintero y García 2010). Es necesario, plantas jóvenes y uniformes con características agronómicas deseables. Estas podrían ser obtenidas a través del proceso de embriogénesis somática, por los antecedentes sobre la posibilidad de regenerar plantas de cacao por esta vía.

Por tanto, se planteó como objetivo evaluar el efecto de diferentes reguladores de crecimiento sobre la embriogénesis somática, en tres cultivares de cacao, a partir de explantes florales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación de la investigación.

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Unidad de Biotecnología Vegetal del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP) del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Venezuela.

Material Vegetal.

Se utilizaron botones florales de 5-6 mm de longitud colectados de los genotipos Ocumare-60 (OC-60), Cuyagua Nombre María (CNM-4) y Scabina-6 (SCA-6), ubicados en el Banco de Germoplasma del INIA-CENIAP, estado Aragua. Los botones florales se colectaron en horas de la mañana y se transportaron hasta el laboratorio en tubos de plástico con 20 mL de agua destilada estéril.

Desinfección de los botones florales y extracción de los estaminodios y pétalos.

Los botones florales se desinfectaron con una solución de etanol al 70 %, por dos minutos; seguido de una solución de hipoclorito de sodio al 1 % de ingrediente activo (I.A.), por 10 min, con agitación constante. Luego se realizaron tres lavados, de cinco minutos cada uno, con agua destilada estéril. Los botones florales se cortaron con un bisturí N° 11 estéril, a 1/3 de su longitud, desde la parte basal, para la extracción de los estaminodios; y, la extracción de los pétalos con una aguja de disección estéril.

Evaluación del efecto del 2,4-D sobre la inducción y crecimiento del callo.

Para la inducción de callo, los estaminodios y pétalos se sembraron en un medio de cultivo compuesto por las sales de Driver y Kuniyuki (1984) (DKW); con suplemento de 22,7 nM de Thidiazuron (TDZ), según el protocolo descrito por Li *et al.* (1998). Se usaron cinco concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), a saber: 0; 0,5; 1; 1,5 y 2 mg.L⁻¹; se añadió: 20 g.L⁻¹ de glucosa; 250 mg.L⁻¹ de glutamina; 100 mg.L⁻¹ de mioinositol; 2 mg.L⁻¹ de tiamina-HCl; 1 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico; 2 mg.L⁻¹ de glicina y 2 g.L⁻¹ de Phytigel™. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,8 con una solución de KOH

o HCl 1N. Los explantes permanecieron por 14 días en condiciones de oscuridad en un cuarto climático, a 24°C de temperatura.

El diseño experimental fue totalmente aleatorio, con organización de un arreglo factorial 3x5x2. Se conformaron 30 combinaciones de tratamientos, con cinco repeticiones, lo que representó un total de 150 unidades experimentales o explantes. Los factores evaluados fueron: tres genotipos de cacao (OC-60, CNM-4 y SCA-6), cinco concentraciones de 2,4-D (0, 0,5; 1; 1,5 y 2 mg.L⁻¹) y dos explantes (estaminodios y pétalos). Se utilizó un total de 75 estaminodios y 75 pétalos provenientes de 150 botones florales.

Se evaluó el índice de formación de callos a los 14 días de cultivo (IC14), según Chatanásig (2004), mediante la siguiente expresión:

$$IC = \sum(\text{estado} \times \# \text{ de explantes en ese estado})$$

En esta fase de inducción, se asignó un valor numérico al estado del callo:

- E0: Ausencia de callo (0)
- E1: Inicio de pequeñas formaciones de callo (1)
- E2: El callo cubre casi totalmente el explante (2)
- E3: el callo cubre completamente el explante (3)

Se analizó el índice de crecimiento de callo con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,10$). Para la comparación de rangos promedios de a pares se empleó el método descrito por Conover (1999). Los datos del ensayo se tabularon y procesaron en una hoja de cálculo electrónica Microsoft® Excel 2010 y el análisis estadístico avanzado con el programa Infostat v. 2016 (Di Rienzo *et al.* 2016). Asimismo, se describió la apariencia del callo según su coloración y consistencia.

Evaluación del efecto de la kinetina y la 6-BA en los callos primarios.

Se establecieron dos experimentos con los callos formados a partir de los explantes florales. En el primero, se transfirió el 50 % de los callos a un medio de cultivo Secondary Callus Growth (SCG-1), compuesto por las sales de Lloyd y McCown (1981); se suplementó con las concentraciones de 2,4-D mencionadas anteriormente y 0,3 mg.L⁻¹

de kinetina. En el segundo, se transfirió el 50 % de los callos restantes y la kinetina se reemplazó por 0,05 mg.L⁻¹ de 6-Benciladenina (6-BA) en el medio SCG-2. Ambos medios de cultivo se suplementaron con 20 g.L⁻¹ de glucosa, 50 mL de agua de coco; 1 mL.L⁻¹ de stock de vitaminas B5 (100 mg de mioinositol; 10 mg de tiamina-HCl; 1mg de ácido nicotínico y 1mg de piridoxina) y 2,2 g.L⁻¹ de Phytigel™. El pH se ajustó a 5,7 con una solución de KOH 1N. Los explantes permanecieron en condiciones de oscuridad, a una temperatura de 24°C, durante 14 días.

El diseño experimental fue totalmente aleatorio, con organización de un arreglo factorial 2x5x2x3. Los factores evaluados fueron: dos tipos de explante (estaminodios y pétalos); cinco concentraciones de 2,4-D (0, 0,5; 1; 1,5 y 2 mg.L⁻¹); dos fuentes de citocinina (kinetina a una concentración de 0,3 mg.L⁻¹ y 6-BA a una concentración de 0,05 mg.L⁻¹) y tres genotipos de cacao para un total de 60 combinaciones de tratamientos, con cinco repeticiones. Se utilizó un total de 300 botones florales (unidades experimentales).

Se realizó una descripción del callo según su coloración y consistencia. La variable respuesta que se evaluó fue el Índice de Desarrollo de callo a los 28 días de cultivo (IC28), según Chatanásig (2004); quien estableció para esta etapa cuatro estados con su respectivo valor numérico, a saber:

- E4a: callos < 2mm (4)
- E4b: callos de 2-4mm (5)
- E4c: callos de 4-6mm (6)
- E4d: callos > 6mm (7)

Los datos se analizaron con la prueba no paramétrica de una vía (o una cola) de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,10$). Para la comparación de rangos promedios de a pares se empleó el método descrito por Conover (1999). Los datos del ensayo se tabularon y procesaron en una hoja de cálculo electrónica Microsoft® Excel 2010 y el análisis estadístico avanzado con el programa Infostat versión 2016 (Di Rienzo *et al.* 2016).

Diferenciación de embriones somáticos.

Las masas proembriogénicas se transfirieron a un medio de cultivo constituido por las sales de DKW más 30 g.L⁻¹ de sacarosa, 1 g.L⁻¹ de glucosa, 100 mg.L⁻¹ de mioinositol, 2 mg.L⁻¹ de tiamina-HCl, 1 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico, 2 mg.L⁻¹ de glicina y 2 g.L⁻¹ de Phytigel™. Se realizaron subcultivos cada 14 días, hasta la aparición de los embriones somáticos. Se evaluó la frecuencia de embriones somáticos (FE), número de embriones según su etapa de desarrollo (globular, corazón y torpedo), número total de embriones somáticos por cultivar y número de embriones somáticos por explante embriogénico.

Se empleó el Análisis de Componentes Principales de la varianza total (ACP) para evaluar la interacción de los diferentes factores. Se realizó una prueba de Ji-Cuadrado, a un nivel de significación de $\alpha = 0,10$. También se efectuó el análisis de Correspondencias Múltiples (ACM). Se utilizó el software Infostat versión 2016 (Di Rienzo *et al.* 2016).

Caracterización Histológica.

Con la finalidad de corroborar la naturaleza embriogénica de los callos, estos se fijaron en una mezcla de 5 mL de formaldehído al 40 %, 5 mL de ácido acético y 90 mL alcohol al 70 % (FAA) por tres semanas. Luego, se realizó la deshidratación en una serie ascendente de alcohol butílico terciario (50; 70; 85; 95; 100 % y alcohol absoluto), con permanencia de 30 min en cada uno de estos. Al final del proceso, se efectuaron tres cambios con alcohol butílico terciario puro y los callos se dejaron toda la noche en el último de estos.

El material vegetal deshidratado se colocó en un recipiente con parafina fundida a 60°C y se realizaron tres cambios de la misma, para eliminar el alcohol por evaporación. Luego, las muestras se transfirieron en cajas de cartulina con parafina fundida, y se dejaron solidificar a temperatura ambiente. Finalmente, se prepararon bloques de parafina que se cortaron a 12 μ m de grosor, con un micrótopo. Los cortes se sometieron a una batería de tinción con safranina y fastgreen, previo a su observación. Las observaciones se realizaron en un microscopio óptico, marca LEITZ.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del 2,4-D.

Según la prueba de Kruskal-Wallis, se observaron diferencias estadísticas en cada genotipo de cacao, en el IC14, con un valor de significancia de $\alpha = 0,10$. Se evidenció un efecto del 2,4-D en la formación de callos. Los IC14 más altos en los estaminodios se obtuvieron en los genotipos CNM-4 y SCA-6 cuando estuvieron expuestos a las concentraciones de 0,5 mg.L⁻¹ y 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D, con valores respectivos de 11,6 ± 6,5 y 11,2 ± 6,3. En pétalos, los IC14 más altos (8 ± 5,8 y 7,2 ± 1,8) se observaron en los mismos genotipos, cuando se cultivaron con 0,5 mg.L⁻¹ y 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D, respectivamente (Cuadro 1).

En los genotipos OC-60 y CNM-4 se observaron diferencias en la respuesta de los estaminodios y los pétalos expuestos a las concentraciones de 2,4-D. En OC-60 el mayor IC14 (8,6 ± 3,8) ocurrió en estaminodios cultivados con 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D; mientras que, en los pétalos se presentó cuando se expusieron a concentraciones de 0,5 y 2 mg.L⁻¹ (5,6 ± 5,1 y ± 4,6 respectivamente), de ese regulador de crecimiento.

Otro de los valores más altos de IC14 (10,0 ± 3,8), en el genotipo CNM-4, se observó en estaminodios cultivados en 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D. Los pétalos de este mismo genotipo mostraron valores más altos IC14 (8,0 ± 5,8 y 7 ± 4,6) cuando se cultivaron en 0,5 y 2 mg.L⁻¹, respectivamente, de ese regulador. El genotipo SCA-6 también mostró diferencias entre los IC14 de pétalos y estaminodios, con los mayores valores en estos últimos; no se observaron diferencias significativas en el IC14 de los pétalos de este genotipo, expuestos a las concentraciones de 2,4-D.

Los resultados evidencian una importante influencia del genotipo, porque los IC14 fueron estadísticamente diferentes entre los tres cultivares de cacao evaluados (Cuadro 1). Se pudo apreciar una mayor tendencia a la formación de callo en el estaminodio, con un IC14 promedio superior de 6,3 en comparación con los pétalos que fue de 4,64. Estos resultados difieren de los obtenidos por Kouassi *et al.* (2017), quienes encontraron más producción de callos en pétalos que en los estaminodios, en tres genotipos de cacao (C1, C14 y C16); solo en uno (C9) observaron una mayor formación de callo en los estaminodios.

Cuadro 1. Rangos y medias de interacción genotipo×explante×concentración de 2,4-D sobre el IC14 bajo condiciones de cultivo *in vitro*. Laboratorio de Biotecnología Vegetal INIA-CENIAP, 2016.

Explante	2,4-D (mg.L ⁻¹)	IC14					
		SCA-6		OC-60		CNM-4	
		Medias	Rangos	Medias	Rangos	Medias	Rangos
Estaminodios	0	0	14,0 b	0	14,0 b	0	14,0 b
	0,5	9,6 ± 3,1	48,5 a	5,0 ± 5,2	32,5 ab	11,6 ± 6,5	55,7 a
	1	11,2 ± 6,3	52,3 a	5,6 ± 4,0	37,2 ab	6,4 ± 7,5	37,7 ab
	1,5	9,4 ± 4,9	49,5 a	4,2 ± 3,4	32,8 ab	7,6 ± 7,5	42,7 a
	2	7,2 ± 6,5	40,9 ab	8,6 ± 3,8	46,7 a	10,0 ± 3,8	51,5 a
Pétalos	0	0	14,0 b	0	14,0 b	0	14,0 b
	0,5	6,6 ± 4,2	50,0 a	5,6 ± 5,1	44,0 a	8,0 ± 5,8	51,2 a
	1	7,2 ± 1,8	52,1 a	4,6 ± 3,2	39,0 ab	4,4 ± 5,8	34,8 ab
	1,5	6,8 ± 4,7	48,2 a	3,8 ± 2,9	35,1 ab	4 ± 4,4	35,5 ab
	2	6,0 ± 1,9	45,6 a	5,6 ± 4,6	42,8 a	7 ± 4,6	49,7 a

Letras iguales significan que no se observaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos para la prueba de medias de Kruskal-Wallis ($\alpha=0,10$). P estaminodio = 0,0048; P pétalo= 0,0101

Esto puede deberse a que, el callo se forma a partir de las células parenquimáticas del estaminodio; las cuales son consideradas un tipo de tejido menos especializado y tienen la capacidad de rediferenciarse. Monsalve *et al.* (2005) afirman que los estaminodios se encuentran en el cojín floral fundidos en la base con los estambres y cerca de la zona meristemática floral. Eso puede influir en una mejor respuesta callogénica de este explante en comparación con el pétalo.

Los callos formados en los estaminodios se caracterizaron por presentar una coloración amarilla crema y consistencia compacta. En los pétalos se observó la presencia de callos de apariencia y consistencia más friable y con la misma coloración. Esto coincide con Jheng *et al.* (2006), quienes hacen referencia al cambio en las características del callo en *Oncidium*; que pasan de ser granular y de coloración amarilla, a un callo embriogénico más friable o compacto, cuando combinaron el 2,4-D con el TDZ.

En la Figura 1 se puede apreciar los cuatro estados de desarrollo del callo en los dos tipos de explantes utilizados según Chatanásig (2004) para los tres cultivares de cacao evaluados. La aplicación de 2,4-D resultó importante para la inducción de callos en los tejidos de cacao. La acción del TDZ pudo tener, también, un papel primordial en el incremento endógeno de auxinas,

en el tejido vegetal; este afecta la concentración de otros reguladores de crecimiento en algunas dicotiledóneas. Estudios histológicos reportan que la proliferación celular se mejora por el TDZ, en combinación con el 2,4-D (Guo *et al.* 2011).

Según los resultados, hubo una respuesta callogénica muy variable en los genotipos OC-60 y CNM-4, con excepción de SCA-6, que mostró IC14 similares en las diferentes concentraciones de 2,4-D, en los dos explantes. Las diferencias en la respuesta callogénica en OC-60 y CNM-4 podrían estar asociadas al contenido endógeno de hormonas en los tejidos; además, probablemente, que no se alcanzó la concentración óptima de 2,4-D y TDZ; puede mencionarse otro factor, como la influencia del genotipo en la respuesta inicial.

Los resultados coinciden con los obtenidos por Velásquez *et al.* (2006), quienes observaron una mayor formación de callo en los estaminodios cultivados con 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 80 g.L⁻¹ de sacarosa y la influencia del genotipo sobre la respuesta de éstos. Monsalve *et al.* (2005), por su parte, mencionan que la aplicación de 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D en combinación con TDZ favoreció la formación de callo; así como, una apariencia friable en pétalos y estaminodios de cuatro cultivares de cacao del norte de Santander. Garate-Navarro y Arévalo-Gardini (2017) observaron una mayor

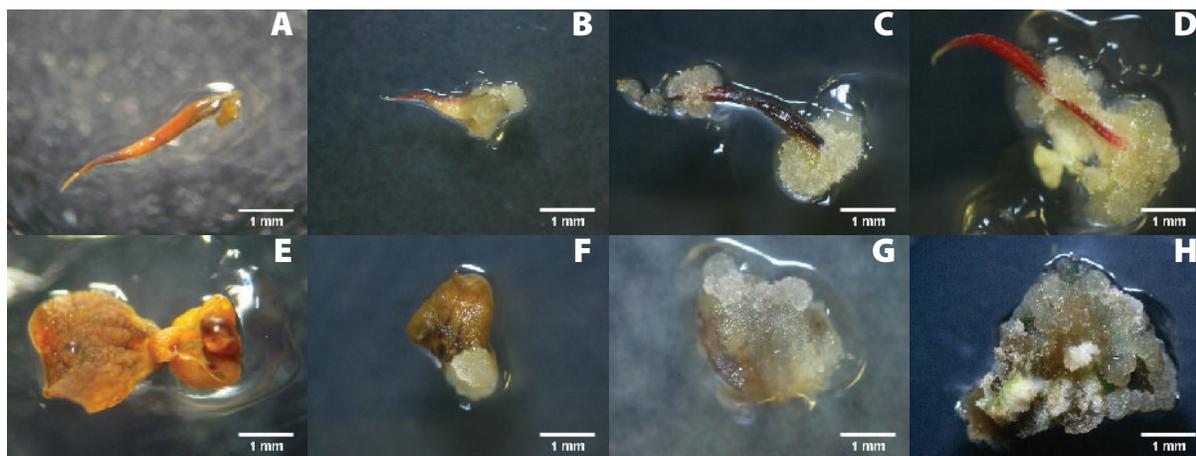


Figura 1. Estados de desarrollo del callo en explantes florales de cacao a los 14 días de establecidos en el medio de cultivo PCG-DKW. **A** y **E**: Estado de desarrollo de callo E0 (3,5X). **B** y **F**: Estado de desarrollo de callo E1 (3,5X). **C** y **G**: Estado de desarrollo de callo E2 (3,5X). **D** y **H**: Estado de desarrollo del callo E3 (3,5X). *A-D*: Estaminodios. *E-H*: Pétalos.

formación de callos en estaminodios de cacao en un medio de cultivo con 1,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D combinado con 7 µg.L⁻¹ de TDZ; esto contrasta con los resultados del presente trabajo, donde la formación de callo con 1,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D fue menor, probablemente, porque se utilizó una menor concentración de TDZ.

Efecto del 6-BA y la kinetina.

El efecto de los dos medios de cultivo estudiados sobre el IC28 se presenta en el Cuadro 2. La prueba de Kruskal-Wallis estableció diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,10$), entre los genotipos, la concentración de 2,4-D y la fuente de citocinina. Los mayores IC28 se observaron en los pétalos de SCA-6 cultivados en el medio con 0,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 6-BA (29); así como, en los

estaminodios expuestos a esta misma concentración de 2,4-D combinado con kinetina (28,8). La respuesta de los estaminodios de este cultivar no fue estadísticamente significativa, cuando se expusieron al 6-BA combinado con 0,5; 1,5 y 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D.

El genotipo OC-60, por su parte, también mostró IC28 altos en los pétalos cultivados con 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D combinado con 6-BA (26,6) y kinetina (26,8); igual, con la concentración de 1 mg.L⁻¹ de esta auxina combinada con kinetina (26,2). El mayor IC28 en el genotipo CNM-4 se observó en los estaminodios cultivados en 0,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D y kinetina con un valor de 26,2; mientras que, en los pétalos el IC28 más alto fue de 23,6 en el medio de cultivo con 1,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D y la misma citoquinina. Esta respuesta diferencial la

Cuadro 2. Rangos y medias de interacción genotipo×explante×concentración del 2,4-D y citoquininas sobre el IC28 en explantes de cacao bajo condiciones de cultivo *in vitro*. Laboratorio de Biotecnología Vegetal INIA-CENIAP, 2016.

Citoquinina	Explante	2,4-D (mg.L ⁻¹)	IC28					
			SCA-6		OC-60		CNM-4	
			Medias	Rangos	Medias	Rangos	Medias	Rangos
6-BA	Estaminodio	0	0	24,0 d	0	24,0 d	0	24,0 d
		0,5	27,2 ± 15,3	120,0 a	13,6 ± 13	61,5 bcd	17,6 ± 10,3	69,0 abcd
		1	25,4 ± 14,4	110,2 abc	14,6 ± 11,0	63,6 bcd	15,4 ± 14,1	66,4 abcd
		1,5	26,6 ± 14,9	117,7 a	18,6 ± 11,7	75,9 abc	16,4 ± 15,1	72,6 abcd
		2	26,8 ± 15,1	117,7 a	24 ± 3,9	90,3 abc	19,6 ± 11,7	78,4 abc
	Pétalo	0	0	24,5 d	0	24,5 d	0	24,5 d
		0,5	29 ± 7,3	113,7 a	16,4 ± 10,7	65,3b cd	20,8 ± 14,0	92,7 abc
		1	27,8 ± 15,5	120,7 a	21,6 ± 12,3	83,4 abc	17,6 ± 16,3	77,5 abcd
		1,5	26 ± 14,8	109,6 abc	21 ± 12,3	82,0 abc	16,8 ± 15,6	71,7 abcd
		2	26,4 ± 15,0	112,4 ab	26,6 ± 14,9	112,2 ab	14,6 ± 11	62,8 bcd
Kinetina	Estaminodio	0	0	24,0 d	0	24,0 d	0	24,0 d
		0,5	28,8 ± 3,30	115,0 a	23,2 ± 9,9	95,5 abc	26,2 ± 5,8	102,8 abc
		1	14 ± 14,6	66,4 abcd	24,6 ± 6,2	95,3 abc	15 ± 3,7	58,8 cd
		1,5	23 ± 7,5	90,7 abc	25,4 ± 5,2	98,6 abc	21,2 ± 5,7	80,2 abc
		2	18,4 ± 11,3	73,9 abcd	25,8 ± 5,4	99,9 abc	25,2 ± 7,3	100,6 abc
	Pétalo	0	0	24,5 d	0	24,5 d	0	24,5 d
		0,5	20,8 ± 14,0	92,7 abc	21,2 ± 5,4	76,6 abcd	21,6 ± 12,5	83,6 abc
		1	16,4 ± 16,8	75,8 abcd	26,2 ± 6,2	97,8 abc	14,8 ± 8,7	57,5 cd
		1,5	23,8 ± 13,7	95,8 abc	19,6 ± 11,1	74,7 abcd	25,6 ± 3,6	91,9 abc
		2	26 ± 6,6	96,6 abc	26,8 ± 2,5	97,6 abc	20,8 ± 5,0	73,3 abcd

Letras iguales significan que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para la prueba de medias de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,10$).

reportó, también, Monsalve *et al.* (2005), quienes evaluaron el efecto de la kinetina y la 6-BA en combinación con el 2,4-D sobre la formación de callos en pétalos y estaminodios de cacao. En el estudio encontraron la mejor respuesta en el medio de cultivo con 2,4-D y kinetina, dependiendo del genotipo y usando el pétalo como explante inicial.

Magyar-Tábori *et al.* (2010) mencionan que, la mayor eficiencia del 6-BA en la inducción de respuestas morfogénicas pudiera relacionarse con su menor susceptibilidad a la degradación enzimática. Es posible que la cantidad de 6-BA en el medio fuera menor que la Kinetina, lo que presenta una mayor cantidad de forma libre, de fácil disponibilidad para los explantes (Buah *et al.* 2010). Asimismo, Klem *et al.* (2004) informaron que el 6-BA es químicamente más estable que otras citoquininas derivadas de purinas.

Con relación al tipo de explante, no se observaron diferencias significativas para un $P = 0,10$; puede afirmarse que, para esta etapa del cultivo, el explante no representó un factor que explique la variación en la respuesta, como ocurrió con el IC14. Esto puede deberse que, al final del subcultivo, la necrosis que afecta el tejido trajo como consecuencia una disminución en el crecimiento del callo.

Chanatásig (2004) observó que los callos embriogénicos de cacao cesaron su crecimiento y mostraron signos de necrosis, con una coloración café oscura como consecuencia de la acumulación de compuestos fenólicos. Otra razón que puede explicar esto, es que los callos embriogénicos formados en presencia de 2,4-D se bloquean en su desarrollo por la eliminación de este regulador de crecimiento; posteriormente, se da inicio a la producción y acumulación de auxina endógena en la periferia del callo, al aumentar la expresión de genes responsables de la biosíntesis de auxina (Su *et al.* 2009, Bai *et al.* 2013).

Durante la permanencia de los explantes en el medio de cultivo SCG, se observó la presencia de estructuras similares a embriones somáticos, en etapa globular, en la superficie del callo del genotipo CNM-4; aunque no llegaron a desarrollarse y tomaron una coloración marrón oscuro (Figura 2).

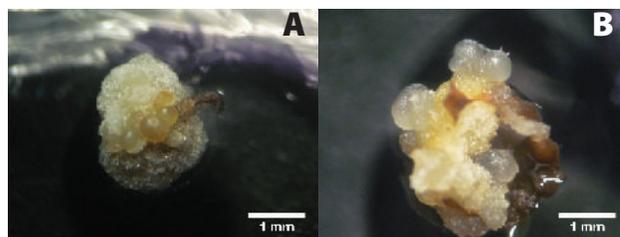


Figura 2. Detalle de explantes con estructuras similares a embriones somáticos en etapa globular en CNM-4 (3,5X). **A:** Estaminodio. **B:** Pétalo.

Lo anterior, coincide con Li *et al.* (1998), quienes observaron estas estructuras sobre estaminodios de cacao, al final del período de permanencia en un medio de cultivo suplementado con 2 mg.L^{-1} 2,4-D y $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de kinetina. Gallego *et al.* (2016) reportaron que estas estructuras globulares tomaron una coloración marrón oscura en el genotipo de cacao ICS95 y explican que el oscurecimiento de las mismas se debe a la presencia de gran cantidad de polifenoles distribuidos al azar en el tejido y mezclados con polisacáridos y proteínas, lo cual detuvo el proceso de embriogénesis somática en cacao. Quiroz-Figueroa *et al.* (2001) también afirman que los compuestos fenólicos pueden actuar como inhibidores de la embriogénesis somática.

Por otro lado, Castellarin *et al.* (2011) mencionan que la producción de fenoles se relaciona, estrechamente, con los azúcares. Dai *et al.* (2014) afirman que, la síntesis de estos compuestos se incrementa con el uso de la glucosa durante el cultivo *in vitro* de *Vitis vinifera* L. y, se asocia a la expresión de genes estructurales y regulatorios. Quiñónez-Galvez *et al.* (2016) determinaron que la concentración de fenoles se incrementó en condiciones de oscuridad, a un mayor contenido de glucosa en el medio de cultivo. La máxima concentración de estos compuestos se detectó a los 14 días de cultivo de estaminodios de cacao.

Diferenciación de embriones somáticos.

Durante la permanencia de los callos en el medio sin reguladores de crecimiento, se mantuvo el proceso de necrosis iniciado en el subcultivo anterior. Los estaminodios no experimentaron esta necrosis, continuaron su crecimiento y conservaron su coloración amarilla crema. Eso ocurrió

con el resto de los cultivares, sin la formación de embriones somáticos.

La diferenciación de embriones somáticos ocurrió durante el segundo subcultivo en el medio sin reguladores de crecimiento, dos meses después de iniciado el cultivo. Sólo el genotipo SCA-6 resultó embriogénico y el número de embriones somáticos varió según la concentración de 2,4-D y su combinación con kinetina y 6-BA (Figura 3A, 3B, 3C y 3D). Se observó la presencia de

raíces en los callos embriogénicos (Figura 3E) y embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo: globular, corazón y torpedo (Figura 3D, 3F y 3G). En la Figura 3H se muestran proembriones de cacao en la parte interior del callo. Estas estructuras mostraron células con citoplasma denso y un núcleo prominente. No se observa la presencia de una protodermis definida como si ocurre en el embrión globular de la Figura 3I que muestra, además, células con una

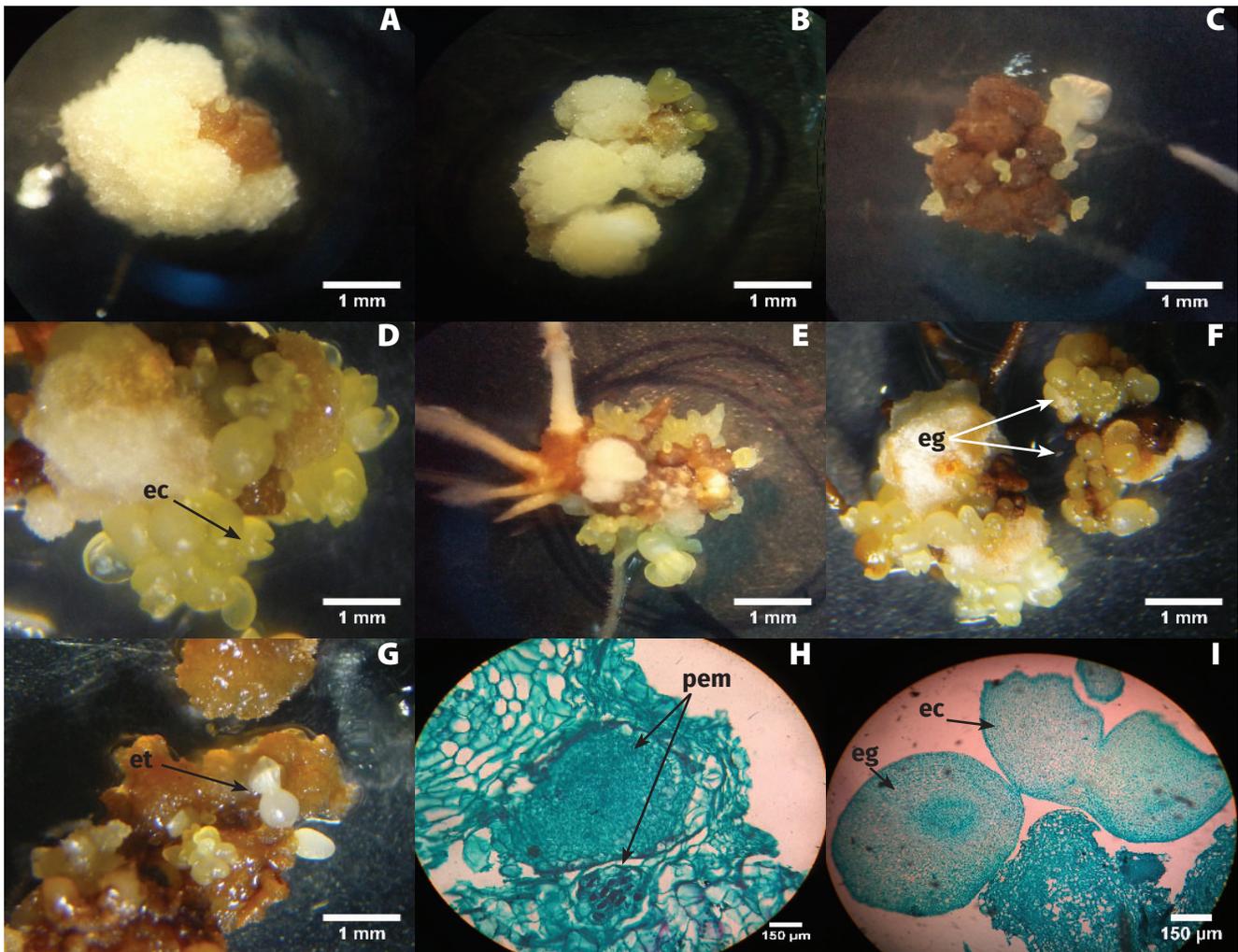


Figura 3. Callos embriogénicos de cacao cultivar SCA-6. **A:** Callo embriogénico de estaminodio con $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D. **B:** Callo embriogénico de estaminodio con 1 mg.L^{-1} de 2,4-D. **C:** Callo embriogénico de pétalo con $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D. **D:** Callo embriogénico de pétalo con 2 mg.L^{-1} de 2,4-D con embrión somático en etapa de corazón. **E:** Callo embriogénico con raíces. **F:** Embriones somáticos en etapa globular. **G:** Embrión somático en etapa de torpedo dos meses después de iniciado el cultivo. **H:** Proembrión de cacao en el interior del callo (40X). **I:** Embriones somáticos en etapa globular y corazón (20X). **ec:** embrión en etapa de corazón, **eg:** embrión en etapa globular, **et:** embrión en etapa torpedo, **pem:** proembrión.

alta actividad mitótica. En la Figura 3, también se muestran embriones somáticos en transición hacia la etapa de corazón.

En la Figura 4 se muestra el número de embriones somáticos y la frecuencia embriogénica según su etapa de desarrollo en el cultivar SCA-6 para la combinación de 2,4-D y kinetina, y se presentó mayor frecuencia embriogénica en los pétalos cultivados en el medio que contenía 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D (20 %) en comparación con los estaminodios, cuya frecuencia más alta fue de 16% en presencia de 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D.

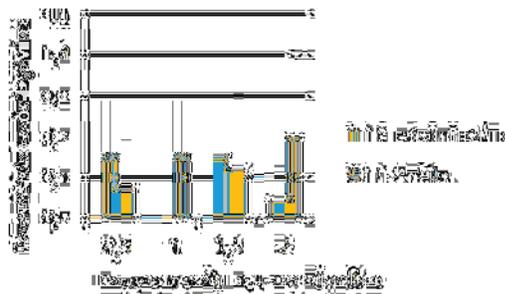


Figura 4. Frecuencia embriogénica con 2,4-D y Kinetina (0,3 mg.L⁻¹) en el genotipo SCA.

Con respecto al número de embriones somáticos, en la Figura 5 se muestra que los pétalos produjeron mayor valor; esto, cuando se utilizó 1,5 mg.L⁻¹ (16) y 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D (13 embriones) en el medio de cultivo, en comparación con los estaminodios que solo produjeron seis embriones somáticos en el medio con 0,5 mg.L⁻¹ y cuatro en 1,5 mg.L⁻¹ de esta auxina (Figura 6).

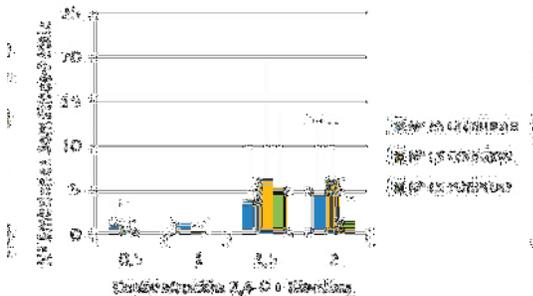


Figura 5. Embriones somáticos en pétalos del genotipo SCA-6 con 2,4-D y Kinetina (0,3 mg.L⁻¹)

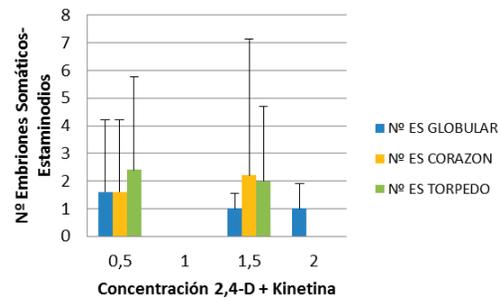


Figura 6. Embriones somáticos en estaminodios del genotipo SCA-6 con 2,4-D y Kinetina (0,3 mg.L⁻¹)

Los explantes expuestos a las diferentes concentraciones de 2,4-D en combinación con 6-BA mostraron la mayor frecuencia embriogénica, con un valor aproximado de 40 % en los estaminodios con 1,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D (Figura 7).

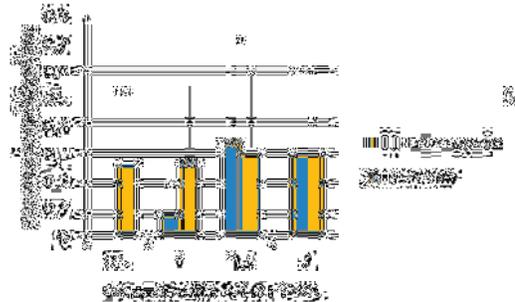


Figura 7. Frecuencia embriogénica con 2,4-D y 6-BA (0,05 mg.L⁻¹) en el genotipo SCA

Al comparar el número de embriones somáticos entre ambos explantes, se observa un mayor número de estos en los estaminodios (15 embriones), en comparación con los pétalos (12 embriones), en la combinación de 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D con 0,05 mg.L⁻¹ de 6-BA. El número de embriones somáticos disminuyó en la medida en que la concentración de 2,4-D fue más baja (Figura 8A y 8B). Los resultados demuestran la influencia que tiene el tipo de explante inicial, la citoquinina y la concentración de auxina, en el desarrollo de embriones somáticos en alta frecuencia.

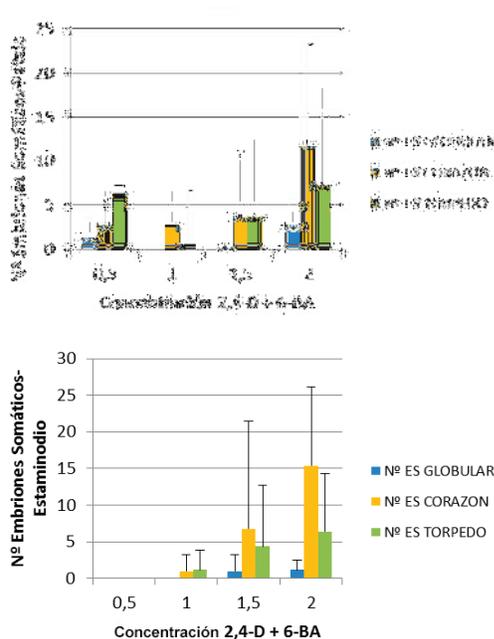


Figura 8. Embriones somáticos en pétalos (**A**) y estaminodios (**B**) con 2,4-D y 6-BA (0,05 mg.L⁻¹)

La 6-BA estimuló una mayor formación de embriones somáticos en comparación con la kinetina, según la concentración de la auxina. Los resultados coinciden con los obtenidos por Chanatásig (2004), en SCA-6, con la misma concentración de 2,4-D que se usó en la presente investigación. Quainoo y Dwomo (2012) mencionan una mayor formación de embriones somáticos y alta frecuencia embriogénica en estaminodios de cuatro genotipos de cacao, al utilizar las concentraciones de 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 5 µg.L⁻¹ de TDZ.

El análisis de componentes principales indica una alta correlación entre las variables frecuencia embriogénica; número de embriones somáticos, en etapa de corazón y torpedo; número total de embriones somáticos con la concentración de reguladores de crecimiento y tipo de explante inicial.

En los tratamientos que mostraron mayor frecuencia embriogénica, se observó mayor presencia de embriones somáticos en etapa de corazón y torpedo (Figura 9A). Esto se encontró en pétalos y estaminodios cultivados en el medio con 1,5 y 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D en combinación con 0,05 mg.L⁻¹ de 6-BA y 0,3 mg.L⁻¹ de kinetina. Los resultados

coinciden con los reportados por García *et al.* (2016). Esos autores mencionan un mayor número de embriones somáticos formados en los pétalos cultivados en presencia de ambas citoquininas, con variación en la respuesta, según el genotipo y el tipo de explante. Las variables IC14 y IC28 tuvieron una baja correlación, con las variables respuesta de embriogénesis somática en cacao. Esto indica que la formación de callo no está asociada a la formación de embriones somáticos, porque no todas las células son capaces de diferenciarse para formar estas estructuras (Figura 9A).

El primer componente principal contribuyó con el 61,3 % de la variabilidad total explicada. Las variables que más contribuyeron de forma positiva con este componente fueron la frecuencia embriogénica, número de embriones somáticos en etapa de corazón y torpedo, y el número total de embriones somáticos. De forma secundaria lo hizo el IC28 y la contribución negativa hacia el primer componente vino de la variable IC14. Con relación al segundo componente principal, este contribuye con el 16,5 % de la varianza total explicada. Según los coeficientes del segundo vector propio y de correlación, las variables que más contribuyeron de forma positiva a este componente fueron el IC14 y el IC28. Los estaminodios cultivados en 1,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 0,05 mg.L⁻¹ de 6-BA tuvieron IC28 mayores que el resto de los tratamientos. Ambos componentes explican el 77,8 % de la variabilidad.

La Figura 9B sugiere que los embriones somáticos en etapa de corazón y torpedo se formaron cuando los estaminodios se cultivaron en un medio de cultivo con 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 0,05 mg.L⁻¹ 6-BA. La respuesta de los pétalos estuvo asociada a las concentraciones de 0,5 y 1,5 mg.L⁻¹ de 2,4-D obteniéndose un mayor número de embriones somáticos en estas concentraciones. La formación de embriones en etapa globular fue mayor en los medios de cultivo suplementados con kinetina sin importar el tipo de explante inicial y la concentración de 2,4-D.

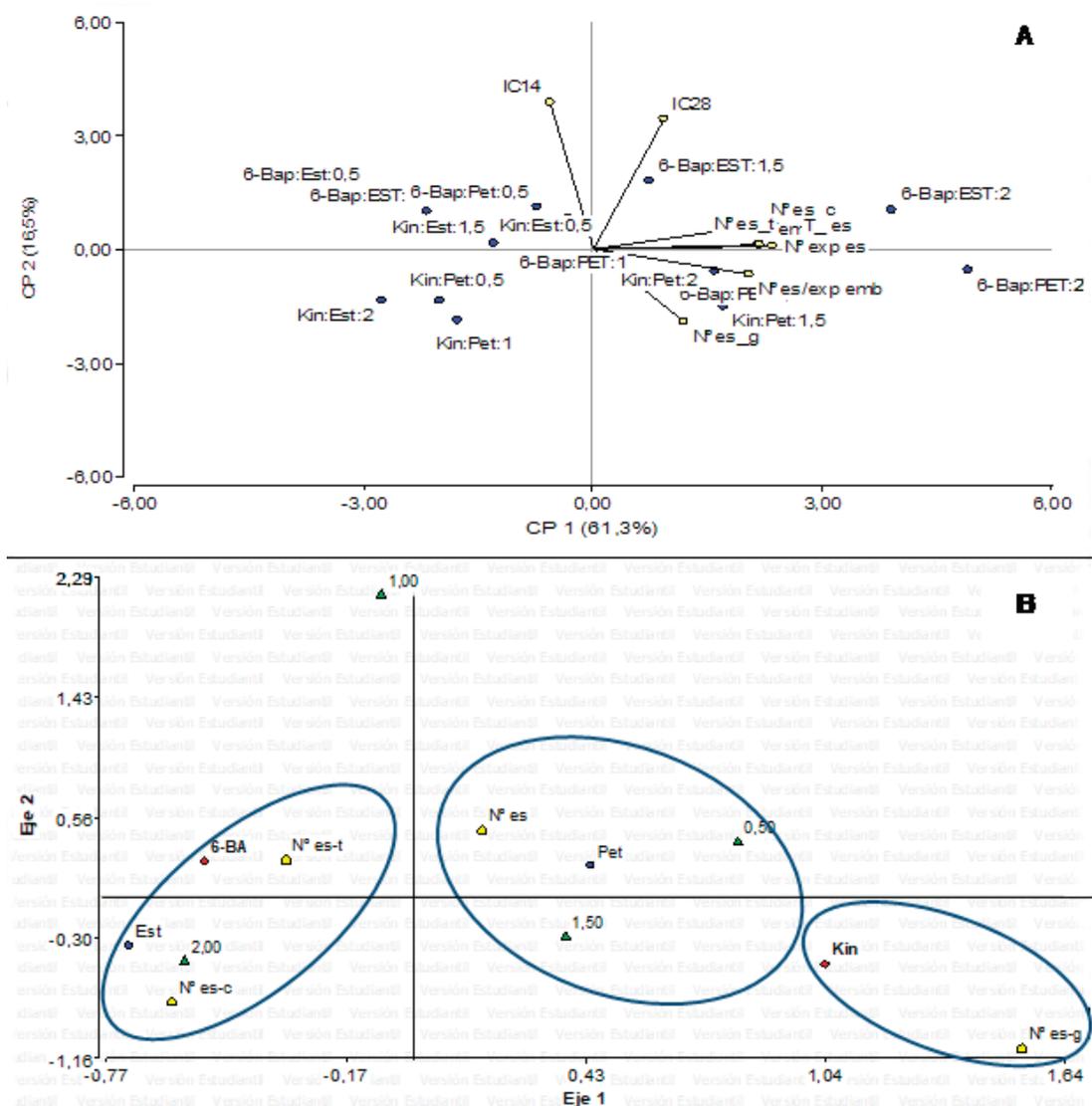


Figura 9. **A:** Análisis de componentes principales de las variables evaluadas en la embriogénesis somática en el genotipo de cacao SCA-6. **B:** Análisis de correspondencias múltiples para las variables tipo de explante, fuente de citocinina, concentración de 2,4-D y etapa de desarrollo del embrión somático en SCA-6. **6-BA:** 6-benciladenina, **Est:** estaminodio, **es:** embriones somáticos, **Nº es-c:** número de embriones somáticos en etapa corazon, **Nº es-g:** número embriones somáticos en etapa globular, **Nº es-t:** número embriones somáticos etapa torpeda, **IC14:** índice de desarrollo de callo a los 14 días de cultivo, **IC28:** índice de callo a los 28 días de cultivo, **Kin:** kinetina, **pet:** pétalo.

Con relación a la conversión de los embriones somáticos a plántulas, se logró la germinación de aproximadamente 56 embriones somáticos en el genotipo SCA-6, en el mismo medio de cultivo sin reguladores de crecimiento. En las Figuras 10A, 10B y 10C, se muestra el proceso de germinación de un embrión somático de

cacao; en la Figura 10D se muestran embriones del genotipo SCA-6 germinados, después de un mes de permanencia en el medio de cultivo sin reguladores. Estos embriones se caracterizaron por tener una coloración blanquecina, con cotiledones pequeños y de color blanco, y produjeron raíces con hipocótilos largos (Figura 10D).

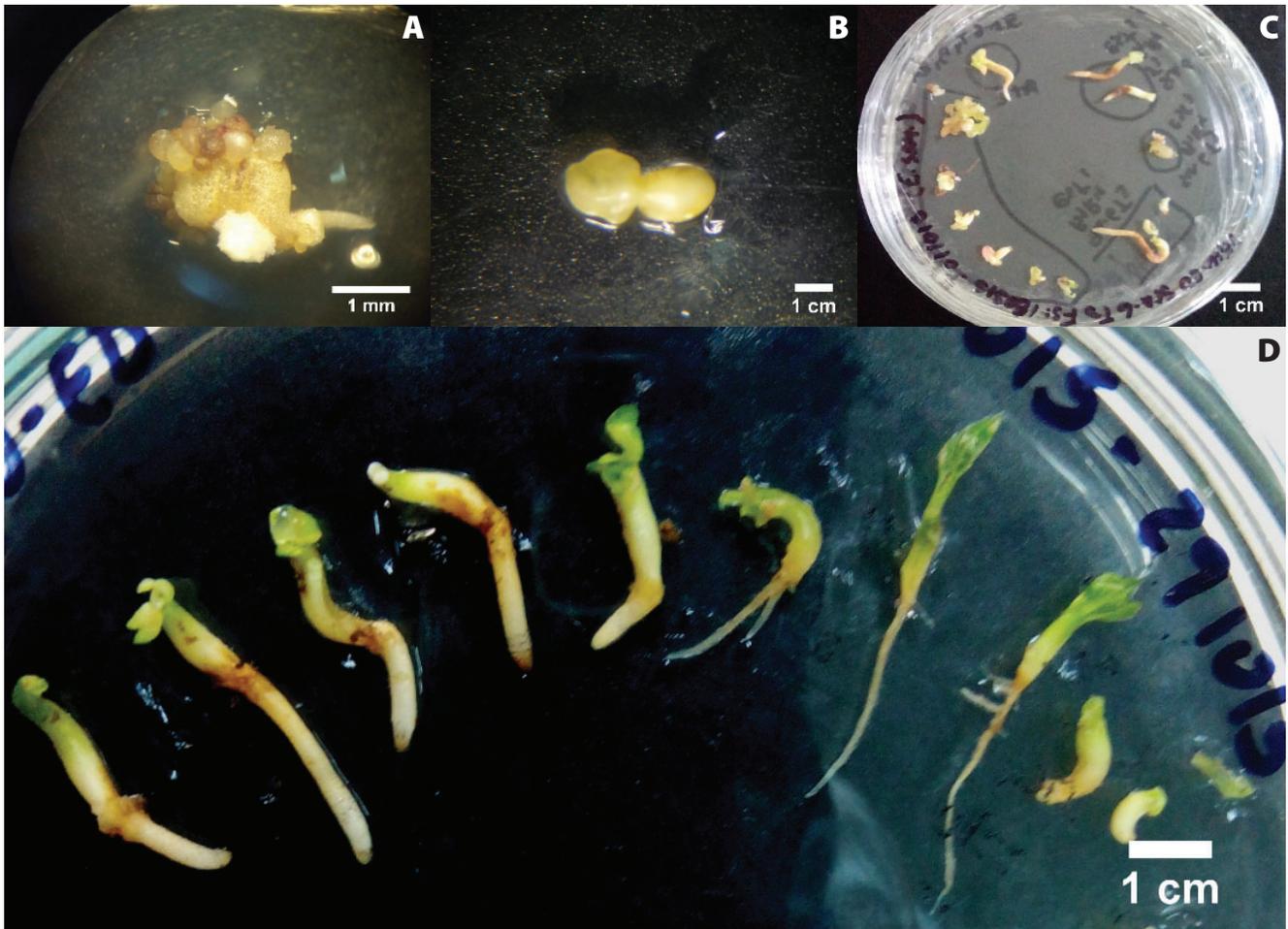


Figura 10. **A:** Callo con estructuras similares a embriones somáticos y presencia de raíces en el genotipo CNM-4 (3,5X). **B:** Embrión somático en etapa de torpedo del genotipo SCA-6 (3,5X). **C:** Proceso de germinación de embriones somáticos de cacao en medio de cultivo sin reguladores de crecimiento. **D:** Inicio de conversión de embriones somáticos a plántula en SCA-6.

CONCLUSIONES

Se logró inducir la embriogénesis somática en cacao a partir de explantes florales en los genotipos SCA-6 y CNM-4. El genotipo SCA-6 fue el único que formó embriones somáticos en distintas etapas de desarrollo. El genotipo CNM-4 sólo formó embriones somáticos en etapa globular y en el OC-60 solo hubo formación de callo.

Las concentraciones de 2,4-D (1,5 y 2 mg.L⁻¹) en combinación con 0,3 mg.L⁻¹ de kinetina indujeron una mayor cantidad de embriones somáticos en los pétalos de SCA-6. La mayor cantidad de embriones formados en los estaminodios ocurrió

con 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D combinado con 0,5 mg.L⁻¹ de 6-BA, en el mismo genotipo.

La oxidación fenólica fue un factor limitante en el desarrollo de los embriones somáticos en el genotipo CNM-4.

Se observó una respuesta diferencial en el proceso de embriogénesis somática en cacao con influencia del genotipo y el tipo de explante.

LITERATURA CITADA

- Bai B, Su YH; Yuan, J; Zhang, XS. 2013. Induction of somatic embryos in *Arabidopsis* requires local *YUCCA* expression mediated by the down-regulation of ethylene biosynthesis (en línea). *Molecular Plant* 6(4): 1247–1260. Consultado: 05 feb. 2017. Disponible en: <https://bit.ly/3lalwQ6>
- Buah, JN; Danso, E; Taah, KJ; Abole, EA; Bediako, EA; Asiedu, J; Baidoo, R. 2010. The effects of different concentrations cytokinins on the *in vitro* multiplication of Plantain (*Musa* sp.) (en línea). *Biotechnology* 9(3): 343-347. Consultado: 28 ene. 2017. Disponible en: <https://bit.ly/3j34nHpf>.
- Bustami, MU; Werbrouck, S. 2018. Somatic Embryogenesis in elite indonesian cacao (*Theobroma cacao* L.). In: Jain, S; Gupta, P. (eds.) *Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants*. Forestry Sciences. Cham, Switzerland, Springer. Vol 85: 73-81. (en línea). Consultado: 01 jun. 2018. Disponible en: <https://bit.ly/34qFGR7>
- Castellarin, SD; Gambetta, GA; Wada, H; Shackel, KA; Matthews, MA. 2011. Fruit ripening in *Vitis vinifera*: spatiotemporal relationships among turgor, sugar accumulation, and anthocyanin biosynthesis (en línea). *Journal of Experimental Botany* 62 (12): 4345-4354. Consultado 08 de sep. 2018. Disponible en: <https://bit.ly/319jGAo>
- Celestino, C; Hernández, I; Carneros, E; López-Vela, D; Toribio, M. 2005. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Investigación Agraria: Sistema y Recursos Forestales* 14(3): 345-357.
- Chatanásig, CI. 2004. Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.), con resistencia a enfermedades fungosas. Tesis M.Sc. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 86p.
- Conover, WJ. 1999. *Practical Nonparametric Statistics*. 3ed. John Wiley & Sons, Inc., New York. 584p.
- Dai, ZW; Meddar, M; Renaud, C; Merlin, I; Hilbert, G; Delrot, S; Gomès, E. 2014. Long-term *in vitro* culture of grape berries and its application to assess the effects of sugar supply on anthocyanin accumulation (en línea). *Journal of Experimental Botany* 65 (16): 4665-4677. Consultado 08 sep. 2017. Disponible en: <https://bit.ly/3gkmCGP>
- Díaz-López, AA; Sánchez, D; Valera-Leal, J; Vegas García, AL. 2015. Formación de embriones somáticos en cinco cultivares de *Theobroma cacao* L. cultivados en Venezuela (en línea). *Biotecnología Vegetal* 15 (1): 27-34. Consultado 19 ago. 2018. Disponible en: <https://bit.ly/34IKZBx>
- Di Rienzo, JA; Casanoves, F; Balzarini, MG; González, L; Tablada, M; Robledo, CW. 2016. *Infostat* (en línea, programa informático). Córdoba, Argentina. Universidad Nacional de Córdoba. Consultado 12 feb. 2016. Disponible en: <https://bit.ly/3gksaB0>
- Driver, JA; Kuniyuki, AH. 1984. *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock. *Hortscience* 19:507-509.
- Gallego, AM; Henao, AM; Urrea, AI; Atehortúa, L. 2016. Polyphenols distribution and reserve substances analysis in cocoa somatic embryogenesis (en línea). *Acta Biológica Colombiana* 21(2): 335-345. Consultado 28 ago. 2016. Disponible en: <https://bit.ly/31fLF9A>.
- Garate-Navarro, MA; Arévalo-Gardini, E. 2017. Induction of somatic embryogenesis from cocoa farmer field collection of ICT – Peru (en línea). *International Annals of Science* 2(1): 6-11. Consultado: 16 jun. 2018. Disponible: <https://bit.ly/2FJtBfD>.
- García, C; Correa, F; Findley, S; Almeida, AA; Costa, M; Motamayor, JC; Schnell, R; Marelli, JP. 2016. Optimization of somatic embryogenesis procedure for commercial clones of *Theobroma cacao* L. (en línea). *African Journal of Biotechnology* 15(36): 1936-1951. Consultado: 03 mar. 2017. Disponible en: <https://bit.ly/3gow4bT>.

- García, C; Marelli, JP; Motamayor, JC; Villela, C. 2018. Somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. (en línea) En: Loyola-Vargas V; Ochoa-Alejo N. (eds) Plant cell culture protocols, Methods in Molecular Biology 1815: 227-245. New York, United States. Human Press. Consultado: 01 oct. 2018. Disponible en: <https://bit.ly/34qdJZL>.
- Gómez, R. 1998. Embriogénesis somática. En: Alvarado, Y; Gómez, R; Jiménez, E; Orellana, P. (eds.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara, Cuba. Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). v.1. p. 57-79.
- Guo, B; Haider, B; Zeb, A; Xu, LL; Wei, YH. 2011. Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. African Journal of Biotechnology 10(45): 8984-9000.
- Henao, AM; Vásquez, T; Ospina, TM; Atehortúa, L; Urrea, AI. 2018. Evaluation of the potential of regeneration of different Colombian and commercial genotypes of cocoa (*Theobroma cacao* L.) via somatic embryogenesis (en línea). Scientia Horticulturae 229: 148-156. Consultado 31 may. 2018. Disponible en: <https://bit.ly/32gcp9i>
- Jheng, FY; Do, YY; Liauh, YW; Chung, JP; Huang, PL. 2006. Enhancement of growth and regeneration efficiency from embryogenic callus cultures of *Oncidium 'Gower Ramsey'* by adjusting carbohydrate sources. Plant Science 170: 1133-1140.
- Klem, M; Balla, J; Machackova, BI; Eder, J; Prochazka, S. 2004. The uptake and Metabolism of Benzylaminopurine in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and Cucumber (*Cucumis sativus* L.) explants. Plant Growth Regulator 31(1):135-142.
- Kouassi, KM; Kaia, J; Kouame, C; Tah, MG; Koffi, EK. 2017. Comparing the effect of plant growth regulators on callus and somatic embryogenesis induction in four elite *Theobroma cacao* L. genotypes (en línea). Hortscience 52(1):142-145. Consultado: 23 jun. 2018. Disponible en: <https://bit.ly/3aKWaEW>.
- Li, Z; Traore, A; Maximova, S; Guiltinan, M. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using Thidiazuron. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant 34: 293-299.
- Lloyd, G; McCown, B. 1981. Commercially feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Combined Proceedings, International Plant Propagators Society 30: 421-427.
- Magyar-Tábori, K; Dobránszki, J; Teixeira da Silva, JA; Bulley, SM; Hudák, I. 2010. The role of cytokinins in shoot organogenesis in Apple (en línea). Plant Cell Tiss Organ Cult. 101:251-267. Consultado: 28 ene. 2018. Disponible en: <https://bit.ly/2EmEEee>
- Monsalve, LS; Garcia, CY; Sigarrosa, A. 2005. Obtención de embriones somáticos primarios de *Theobroma cacao* en clones de interés regional para el Departamento Norte de Santander, Colombia. Revista de la Universidad Francisco de Paula 1: 21-29.
- Quainoo, AK; Dwomo, BI. 2012. The effect of TDZ and 2,4-D concentrations on the Induction of Somatic Embryo and Embryogenesis in Different Cocoa Genotypes. Journal of Plant Studies 1 (1): 72-78.
- Quintero, ML; García, LN. 2010. La producción de cacao en Venezuela: Hacia una nueva ruralidad. Actualidad Contable FACES 13(20): 114-123.
- Quintero, ML; Anido, JD; Azuaje, A. 2017. El consumo de cacao en Venezuela y en el mundo desde una perspectiva sostenible (1960-2014) (en línea). Agroalimentaria 23(45): 23-49. Consultado 18 mar 2018. Disponible en: <https://bit.ly/3heRZ6N>
- Quiñones-Galvez, J; Hernández de la Torre, M; Quirós Molina, Y; Capdesuñer Ruiz, Y; Trujillo Sánchez, R. 2016. Factores que controlan el contenido de fenoles en el cultivo de callos de *Theobroma cacao* (en línea). Cultivos Tropicales 37: 118-126. Consultado 20 ago. 2018. Disponible en: <https://bit.ly/2FCWIKH>

- Quiroz-Figueroa, F; Mendez-Zeel, M; Larque-Saavedra, A; Layola-Vargas, V. 2001. Picomolar concentrations of salicylates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in *Coffea Arabica* tissue culture. *Plant Cell Reports* 20: 679-684.
- Ramos, G.; A. Gómez. 2002. Propagación del cacao: Injerto parche. Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Mérida. Maracay, Venezuela. INIA. 26p. (Serie D, N°2).
- Su, YH; Zhao, XY; Liu, YB; Zhang CL; O'Neill, SD; Zhang, XS. 2009. Auxin-induced *WUS* expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis* (en línea). *The Plant Journal* 59(3): 448–460. Consultado: 05 feb. 2017. Disponible en: <https://bit.ly/3glcY6u>
- Velásquez, R; Sandrea, Y; Betancourt, C; Mata, J. 2006. Embriogénesis somática en cultivares de cacao venezolano. *Agronomía Tropical* 56(1):61-74.
- Williams, EG; Maheswaran, G. 1986. Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behaviour of Cells as an Embryogénie Group. *Annals of Botany* 57: 443-462.

Identificación de marcadores microsatélites asociados a la concentración de Fe y Zn en el grano de la caraota en familias F_{2:3}

Gino Campos Tirado^{1*}, Margaret Gutiérrez¹, Catalina Ramis², Luis Angulo Graterol², Zuleyvi Henríquez¹

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Centro Nacional de Investigaciones Agropecuaria (CENIAP). Maracay, Aragua, Venezuela. ²Universidad Central de Venezuela (UCV), Facultad de Agronomía (FAGRO). Maracay, Aragua, Venezuela. Correo electrónico: ing.gino.campos@gmail.com

RESUMEN

El incremento de micronutrientes en los granos alimenticios, con técnicas de fitomejoramiento, es una estrategia en la prevención y manejo de las deficiencias de estos en la población mundial. El objetivo de este estudio fue identificar la asociación entre marcadores de tipo microsatélites (SSR) y la concentración de hierro (Fe) y Zinc (Zn), como también la herencia de estos caracteres en caraota. Se evaluaron 77 familias, provenientes de cruces simples de la población IPR-Tiziu//I-2581 en F_{2:3}, con los SSR BM-143, BM-181, BM-183, AG-1, BMd-001 y BMd-028. Se verificó la segregación para cada SSR e identificaron los QTL, por el método un marcador a la vez, con el programa MapDisto; con significación P<0,05, LOD mínimo de 3,0 y r máximo 0,3. Los caracteres mostraron distribución continua, que corresponde a herencia de tipo cuantitativa. Se observaron familias con valores intermedios, mayores y menores que sus parentales, lo que indica una expresión fenotípica transgresiva. Los SSR BM-181, BM-183, BMd-001 y BMd-028 presentaron segregación Mendeliana ¼:½:¼, para las 77 familias evaluadas y los SSR BM143 y AG-1 mostraron distorsión en la segregación. Se detectaron cuatro QTL asociados a la concentración de estos minerales, dos para la concentración de Fe mostrados con los SSR BM-183 (cromosoma 7) con F = 3,10 y BMd-001 (cromosoma 3) con F = 3,56; y dos QTL para Zn, en los SSR BM-183 y BMd-001, para un F de 3,31 y 3,41 respectivamente. La detección de estos QTL facilita la selección de familias con alto valor nutricional, con miras a la biofortificación del cultivo.

Palabras clave: ADN genómico, fitomejoramiento, QTL, marcadores genéticos, *Phaseolus vulgaris* L.

Identification of microsatellite markers associated Fe and Zn concentration in the grain of the common bean in F_{2:3} families

ABSTRACT

The increase of micronutrients in food grains, with plant breeding techniques is a strategy in the prevention and management of their deficiencies in the world population. The objective of this study was to identify the association between microsatellite markers and the concentration of Fe and Zn, as well as the inheritance of these characters in common bean. A total of 77 families for the F_{2:3} population of the single cross IPR-Tiziu//I-2581 were evaluated; using the SSRs BM-143, BM-181, BM-183, AG-1, BMd-001 and BMd-028. The segregation was verified for each microsatellite and the QTLs were identified by single marker analysis, one at a time, with MapDisto Program, using significance level of P<0,05 corresponded to a minimum LOD of 3,0 and r maximum of 0,3. The characters showed continuous distribution, corresponding to quantitative inheritance; and intermediate families and / or major or minor families are shown, which indicates transgressive phenotypic expression. The SSRs BM-181, BM-183, BMd-001 and BMd-028 had Mendelian segregation ¼:½:¼ and the SSRs BM-143 and AG-1 showed distortion in the segregation. Four QTL associated with Fe and Zn concentration were detected, two for the Fe variable detected in the primers BM-183 (chromosome 7) with F = 3.10 and BMd-001 (chromosome 3) with F = 3.56; and two QTL for Zn, in the SSRs BM-183 and BMd-001 (chromosome 3), for an F of 3.31 and 3.41 respectively. These QTLs detected, facilitates the selection of lines with high nutritional value, with a view to achieving the biofortification of the crop.

Key words: Genomic DNA, plant breeding, QTL, genetic markers, *Phaseolus vulgaris* L.

Recibido: 20/06/2018 - Aprobado: 20/12/2018

INTRODUCCIÓN

La malnutrición afecta cerca de la tercera parte de la población mundial, con énfasis en mujeres y niños de hogares de escasos recursos. Esto constituye un problema de salud pública en el ámbito global. Las deficiencias de micronutrientes, como el hierro (Fe) y el zinc (Zn), son los más prevalentes y afectan al menos 2.000 millones de personas (OMS 2018). La población con insuficiencia de estos minerales manifiesta un alto índice de anemia, bajo desarrollo cognitivo, retraso en el crecimiento y respuestas negativas en el sistema inmunitario, entre otras afectaciones (Abbaspour *et al.* 2014). Venezuela no escapa de esos problemas con un incremento del número de personas subnutridas, que alcanzó 4,2 millones para el trienio 2014-2016 (FAO 2017).

La baja disponibilidad de alimentos básicos de calidad para la población, conlleva a una deficiencia de micronutrientes, como el Fe y el Zn, esenciales para el desarrollo del individuo. Una de las estrategias para la prevención y manejo de las esas deficiencias, en la dieta de la población humana, es la producción y disponibilidad de cultivos biofortificados. Las metodologías para la obtención de estos cultivos se fundamentan en el incremento de la concentración de nutrientes, con técnicas de fitomejoramiento tradicional y uso de herramientas biotecnológicas (Tofiño-Rivera y Tofiño-Rivera 2013).

La caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) es un rubro importante en los programas de biofortificación de cultivos, porque es una leguminosa de alto consumo alimenticio en la población mundial. Esta constituye una de las mayores fuentes vegetales de Fe, Zn y proteínas en muchos países, principalmente en los continentes de África y América (Izquierdo *et al.* 2018, Tofiño-Rivera *et al.* 2016). En Venezuela, la caraota es uno de los alimentos de la canasta básica, con un consumo per cápita de 6,9 kg.año⁻¹ (FEDEAGRO 2017). Esto la ubica como un rubro estratégico para el desarrollo de un programa de biofortificación, como aporte al déficit nutricional, en el país.

Los valores de referencia para la concentración de Fe en el grano de la caraota varían de 50 a 80 ppm; valores inferiores o igual a 50 ppm se

consideran bajos, mientras que por encima de 80 ppm se consideran biofortificados (Brigide *et al.* 2014, Mukamuhirwa *et al.* 2015). Los valores de Zn varían entre 20 y 36 ppm, por encima de este último se consideran biofortificados. En la mayoría de los cultivares comerciales de caraota el valor de este micronutriente es inferior o igual a 20 ppm (Brigide *et al.* 2014, Mukamuhirwa *et al.* 2015).

Diversos estudios realizados en países consumidores de este rubro, resaltan la importancia de los programas de biofortificación en caraota y la evaluación participativa de líneas avanzadas en diferentes condiciones ambientales. En Zimbabue y Malawi, en el 2010, se liberaron variedades con concentraciones de Fe y Zn superiores a los valores de referencia (Tofiño *et al.* 2011). En México, se liberó la variedad de frijol negro Guanajuato biofortificado, tomando en cuenta variables de rendimiento agronómico y tipo de grano aceptado por los consumidores (Acosta *et al.* 2008). En Panamá, se consideraron criterios agronómicos y nutricionales en la selección de genotipos biofortificados promisorios (Rodríguez *et al.* 2009). En Cuba, se incluyeron criterios de consumo, como color de grano, forma, sabor y tiempo de cocción (Chaveco *et al.* 2006). En Colombia, se desarrollaron pruebas de adaptación de líneas de caraota biofortificadas con alta concentración de micronutrientes (Monserrate 2008).

Venezuela se cataloga como centro de diversidad de caraota, con parte de esta variabilidad en los cultivares locales y nativos de numerosas zonas agroecológicas del país (Gutiérrez y Rincón 2011). Esto representa una ventaja, para la incorporación de genotipos con alto valor nutricional, en los programas de mejoramiento genético, ya sea como parentales o selección directa de genotipos sobresalientes. El país cuenta con un germoplasma de caraota con caracterización nutricional, para los caracteres concentración de Fe y Zn en el grano. En más de 200 cultivares se identificaron genotipos que contienen dos veces más Fe y 40 % más de Zn, que los cultivares comerciales y las líneas avanzadas de los programas de mejoramiento genético existentes (Granito *et al.* 2006, Granito *et al.* 2009, Campos-Tirado 2018).

En los cultivos, la mayoría de las características heredables de importancia económica, como componentes de rendimiento, tolerancia a estrés y calidad nutricional, resultan de la acción conjunta de varios genes.

Poco se sabe del número, posición cromosómica, magnitud del efecto e interacciones de las regiones del ADN que controlan la expresión de la concentración de Fe y Zn en el grano de la caraota (Izquierdo *et al.* 2018). Estas características, son afectadas por el ambiente, que junto con la interacción genotipo-ambiente reducen la eficiencia en la selección de los referidos caracteres.

Las selecciones fenotípicas, por sí solas, no conducen a las ganancias genéticas necesarias para que la biofortificación sea exitosa (Vasconcelos *et al.* 2017). Se requiere de herramientas genómicas, para que los mejoradores alcancen las concentraciones de Fe y Zn objetivo en el grano de la caraota. Una de las técnicas disponibles para esas evaluaciones son los QTL (Quantitative Trait Loci, por sus siglas en inglés), es decir, loci controladores de características cuantitativas. Estos son eficaces en el proceso de selección de genotipos o líneas recombinantes y reducen el tiempo para la obtención de cultivares mejorados en su calidad nutricional (Blair *et al.* 2011, Izquierdo *et al.* 2018).

El desarrollo de cultivares de caraota, con altas concentraciones de Fe y Zn en el grano, por métodos de mejoramiento genético, con apoyo de herramientas biotecnológicas, permite la disponibilidad de alimentos con calidad nutricional. Esto es una alternativa que beneficiaría a las familias venezolanas; en especial, aquellas comunidades de acceso limitado de alimentos con alta calidad nutricional.

El objetivo de la presente investigación fue identificar la asociación entre marcadores microsatélites y la concentración de Fe y Zn en el grano de la caraota en familias $F_{2:3}$ (Tercera generación filiar sin selección); con miras a la biofortificación del cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron 77 familias de caraota en generación $F_{2:3}$ proveniente de una población originada del cruce simple entre los genotipos IPR-Tiziu (I-2909) e I-2581. Ambos genotipos corresponden a accesiones del Banco de Germoplasma de caraota, de la Unidad de Conservación de Recursos Fitogenéticos del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícola (INIA), Centro Nacional de Investigaciones Agropecuaria (CENIAP), Aragua, Venezuela.

IPR-Tiziu, es un cultivar comercial introducido de la República Federativa del Brasil. Se originó en el programa de mejoramiento genético del Instituto Agronómico de Paraná (IAPAR), con validación del Registro Nacional de Cultivares en Rio Grande do Sul y liberado en el 2007; su genealogía es IAPAR-LP91-117/IACUma. El genotipo I-2581 es un cultivar local que se colectó en el estado Táchira, con el código DP-06-06-119. Su nombre común en la zona es "caraota negra criolla capachera". Estos dos genotipos se usaron como parentales por sus contrastes para las concentraciones de Fe y Zn en el grano y sus valores de productividad, descritos por Campos-Tirado (2018). El IPR-Tiziu se caracteriza por una alta concentración Fe y bajo de Zn en el grano e I-2581, por alto en Zn y bajo en Fe. Para la evaluación se usaron los parentales como testigos.

Ubicación de los experimentos

La siembra se realizó en el Lote F-02 del Campo Experimental del INIA-CENIAP. Ubicado a una altura de 455 m.s.n.m., 10°17'14.0"N y 67°36'02.0"O. Durante el ciclo del cultivo, periodo diciembre 2014 - febrero 2015, la precipitación fue de 0,79 mm en promedio quincenal; la humedad relativa promedio de 70 %, con temperatura máxima de 33 °C y mínima de 17 °C. El suelo de textura predominante franco, con 51,8 % de arena, 33 % de limo y 15,2 % de arcilla; con pH de 5,29 y 2,06 % de materia orgánica.

Para el manejo agronómico del cultivo, se realizaron cuatro pases de rastra y, posteriormente, se prepararon surcos de 5 m de largo y 0,75 m entre surco.

En la siembra, se colocaron dos semillas por punto, transcurrido los 12 días se entresacaron para dejar una densidad de 5 plantas por metro lineal. Al momento de la siembra se aplicó fertilizante de fórmula completa 15-15-15, a razón de 300 kg.ha⁻¹ y reabono a los 25 días después de la siembra, con urea en una proporción de 50 kg.ha⁻¹.

Para el control de malezas, se aplicó pendimetalin, como herbicida pre-emergente, en dosis de 3 L.ha⁻¹, al momento de la siembra. Antes de la floración se realizó una limpieza manual.

Para suplir la demanda de agua del cultivo se aplicó riego complementario, con una lámina de agua suficiente para mojar adecuadamente el terreno, cuando fue necesario. Se utilizó equipo de riego por aspersión. La cosecha se realizó por planta individual en la madurez (R9).

Los análisis de concentración de Fe y Zn en el grano, de las familias y los testigos, se realizaron en el Laboratorio General de Suelo-Agua-Planta del Instituto de Edafología de la Universidad Central de Venezuela (UCV), Facultad de Agronomía (FAGRO), Maracay, Aragua. La evaluación molecular se hizo en el Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA) de la UCV- FAGRO.

Análisis de la concentración de Fe y Zn en el grano

Se tomaron muestras al azar de 10 semillas por familia y por los testigos. Se lavaron con agua destilada estéril y después se secaron en un horno, a 45 °C durante 2 días (Granito *et al.* 2006). Las muestras crudas se molieron y se obtuvo 1 g del tejido vegetal por genotipo. Para obtener la ceniza, se incineraron a 550 °C por un periodo de 5 horas y se dejó enfriar; se le añadió 5 mL de una mezcla (5:2) de ácido nítrico-ácido clorhídrico, se filtró y se llevó a 15 mL con el ácido. Se determinó el contenido de Fe y Zn por medio de espectroscopía de emisión atómica, a 248 nm para Fe y 213 nm para Zn.

Para las variables concentración de Fe y Zn en el grano, se verificó la normalidad de la distribución de los datos mediante la prueba de Shapiro y Wilks (1965). Se efectuaron los cálculos de estadística descriptiva de las 77 familias F_{2:3}. Se

realizaron histogramas de distribución de frecuencias absolutas. Para los análisis se usó una hoja de Excel (Microsoft) y el programa estadístico InfoStat versión 2017 (Di Rienzo *et al.* 2017).

Análisis molecular

Para la extracción del ADN genómico, se tomaron muestras de semillas de los parentales IPR-Tiziu e I-2581 y las 77 familias F_{2:3}. El tejido se molió y maceró con nitrógeno líquido y se extrajo el ADN, con tampón CTAB (2 %), según la metodología de Gepts y Koinange (1992). Se verificó la integridad y cantidad del ADN en geles de agarosa al 0,8 %, con bromuro de etidio (0,5 mg.mL⁻¹), como agente intercalante entre las bases del ADN. Se utilizó ADN de concentración conocida (Fago Lambda) a 50 y 100 ng.μL⁻¹ para estimar la concentración obtenida. Con base a la información de la concentración, se prepararon concentraciones finales de 2,5 ng.μL⁻¹ de ADN para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). La concentración final de los componentes de la mezcla de reacción de PCR-SSR se presenta en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Composición de una reacción PCR (20 μL)

Componente	Concentración
albúmina de suero bovino (BSA)	1mg.mL ⁻¹
tampon Tris-HCl	5X
MgCl ₂	25mM
polimerasa GoTaq®	5U.μL ⁻¹
desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP)	10 mM
ADN molde	2,5 ng.μL ⁻¹
cebadores específicos	25 mM
agua purificada c.s.p. 20 μL	1X

La amplificación se realizó bajo las condiciones del Laboratorio de Genética Molecular del CIBA-UCV descritas por Castañeda *et al.* (2014), con seis marcadores moleculares de tipo microsatélites, que resultaron polimórficos entre los parentales IPR-Tiziu e I-2581 (Cuadro 2). Las condiciones de amplificación de la PCR-SSR se presentan en el Cuadro 3.

La electroforesis se efectuó en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 6 %, en condiciones de 1.301 voltios, 90 vatios y 69 miliamperios por 45 minutos aproximadamente. Los productos de amplificación fueron revelados en solución de nitrato de plata (Castañeda *et al.* 2014). Se realizó el análisis de los alelos para cada una de las 77 familias en F_{2:3} y sus parentales, a partir de las observaciones de los geles para cada uno de los SSR evaluados.

Posteriormente, se elaboró una matriz genotípica en una hoja de cálculo Excel (Microsoft) con los perfiles electroforéticos visualizados en los geles de poliacrilamida; para cada una de las 77 familias en F_{2:3} y cada uno de los SSR. Los homocigotos se le designaron las letras “aa” y “bb” y los heterocigotos “ab”. Se verificó la segregación mendeliana (1:2:1), para cada cebador, con el uso del programa MapDisto v2.0 Beta 104-2010 (Lorieux 2012), a través de la prueba de Bondad

Cuadro 3. Perfil termico de las reacciones PCR

Fase PCR	T (°C)	t (s)	
Desnaturalización	92	180	
34 ciclos	Desnaturalización	92	15
	Hibridación	(45 - 55) específica cebador	60
	Extensión	72	15
Extensión Final	72	300	

de Ajuste Ji- cuadrado (X^2) con una probabilidad $P < 0,05$. Luego de verificar la segregación mendeliana y dependiendo del número de SSR polimórficos, se determinaron los grupos de ligamientos entre los SSR; finalmente, la asociación entre los SSR y la concentración de Fe y Zn en el grano de la caraota, con los parámetros *LOD* mínimo de 3.0 y un *r* máximo 0,3.

Para estos QTL se utilizó la función de Kosambi y el método de mapeo simple (Zeng 1994). Se usaron los valores cuantitativos de los caracteres

Cuadro 2. Marcadores moleculares tipo microsatélites (SSRs) polimórfico entre los parentales IPR-Tiziu e I-2581 y utilizados para la evaluación de las 77 familias F_{2:3}.

SSRs (locus)	C	Motivo	Directo / Reverso
BM-143	2	(GA) ₃₅	GGGAAATGAACAGAGGAAA / ATGTTGGGAACCTTTTAGTGTG
BM-181	3	(CT) ₁₇	ATGCTGCGAGTTAATGATCG / TGAGGAGCAAACAGATGAGG
AG1	3	(GA) ₈ GGTA(GA) ₅ GGGGACG(AG) ₄	CATGCAGAGGAAGCAGAGTG / GAGCGTCGTCGTTTCGAT
BM-d001	3	(AT) ₉	CAAATCGCAACACCTCACAA / GTCGGAGCCATCATCTGTTT
BMd-028	5	(GT) ₄	TGCATCAACTTTAGGAGCTTG / TCTTGTCTTATCAGCAGGTGGA
BM183	7	(TC) ₁₄	CTCAAATCTATTCAGTGGTCAGC / TCTTACAGCCTTGCAGACATC

Fuente: Blair *et al.* (2010) y Blair *et al.* (2011)

evaluados y el genotipo para cada marcador microsatélites. Se consideró la existencia de un QTL, si el valor fenotipo de una variable es asociada con el locus de un marcador, para un *LOD Score* > 3.0. El método *LOD Score*, es el logaritmo en base 10 de la razón entre el valor de la función de máxima verosimilitud para r y el valor de la función para segregación independiente (Morton 1995).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de la concentración de Fe y Zn en el grano

Para los valores de la concentración de Fe y Zn en el grano de la caraota, se observó asimetría positiva y curtosis negativas (Cuadro 4). Esto señala que la mayor parte de las familias se orientan hacia los parentales de baja concentración de estos dos minerales. Se muestra un coeficiente de variación alto, para la concentración de Fe y Zn, de 30,65 % y 33,97 %, respectivamente. Eso indica, una alta variabilidad entre las familias para estos caracteres, con rangos de 10,5 mg.kg⁻¹ a 169,8 mg.kg⁻¹ de Fe y 10,3 mg.kg⁻¹ a 89,7 mg.kg⁻¹ de Zn. Esos valores se ubican dentro de los esperados, con base a investigaciones realizadas en poblaciones de caraota (Blair *et al.* 2013, Teixeira *et al.* 2015).

Los valores de la concentración de Fe y Zn en el grano, para las 77 familias evaluadas, mostraron variación continua (Figura 1), con una distribución normal en ambas variables. Esto corresponde a una herencia de tipo cuantitativa, de caracteres poligénicos (Blair *et al.* 2013, Teixeira *et al.* 2015). Se muestran familias con valores intermedios y familias con valores mayores o menores, que los

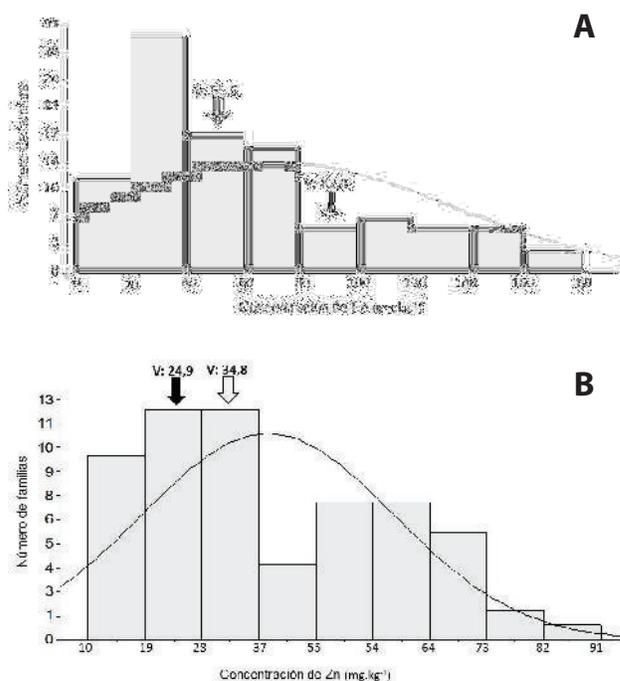


Figura 1. Distribución fenotípica de la concentración de Fe (A) y Zn (B) de familias en F_{2:3} del cruce IPR-Tiziu/I-2581. La flecha negra indica la ubicación de la media del cultivar IPR-Tiziu y la blanca del cultivar I-2581. V: valor promedio del carácter evaluado para los parentales.

parentales, lo que indica una expresión fenotípica transgresiva. El 31 % de las familias superan al parental con alto contenido de Fe y 34 % superior al parental con alto contenido de Zn. Esto demuestra que en la población se encuentra una proporción de individuos disponibles para el proceso de selección de genotipos, de alto valor nutricional, bajo un esquema de mejoramiento genético (Blair *et al.* 2013, Teixeira *et al.* 2015).

Cuadro 4. Medias y otros estadísticos descriptivos del contenido de Fe y Zn en el grano en las 77 familias F_{2:3} y los parentales: IPR-Tiziu e I-2581.

Variable	n	Media	S	CV	Valor mínimo	Valor máximo	Asimetría	Kurtosis
Fe (mg/kg)	77	65,12	19,96	30,65	10,5	169,8	0,88	-0,68
Zn (mg/kg)	77	31,98	10,86	33,97	10,3	89,7	0,72	-0,89

Hierro (Fe), Zinc (Zn), desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV)

Los resultados de este estudio concuerdan con reportes de Blair *et al.* (2010, 2011) para las concentraciones de Fe y Zn en el grano en líneas recombinantes, provenientes de las poblaciones G14519//G4825 y G21242//G21078. Los autores observaron en la primera población, rangos de 35,4 mg.kg⁻¹ a 97,1 mg.kg⁻¹ de Fe y 16,6 mg.kg⁻¹ a 49,5 mg.kg⁻¹ de Zn; en la segunda población, rangos entre 28 mg.kg⁻¹ a 95,1mg.kg⁻¹ de Fe y 16,9 mg.kg⁻¹ a 37 mg.kg⁻¹ de Zn. Posteriormente, Blair *et al.* (2013) obtuvieron rangos de 20 mg.kg⁻¹ a 263 mg.kg⁻¹ de Fe y 17 mg.kg⁻¹ a 54,5 mg.kg⁻¹ de Zn, en grano de caraota, de 138 líneas recombinantes provenientes de la población Cerinza// (Cerinza//Cerinza/G10033). Todo eso coincide con variaciones continuas de las concentraciones de Fe y Zn en el grano de la caraota, en las líneas recombinantes de las diferentes poblaciones evaluadas, provenientes de parentales contrastantes para estos caracteres.

Zemolin *et al.* (2016) obtuvieron patrones diferenciados y continuos en la concentración de estos minerales, en el grano de recombinantes, de las poblaciones IAC-Boreal//Light-Red-Kidney y Ouro-Branco//Light-Red-Kidney. Esas poblaciones provenientes de cruces controlados entre genotipos contrastantes de caraota. Los rangos de Zn que observaron, van desde 10,75 mg.kg⁻¹ a 37,5 mg.kg⁻¹ y de Fe de 24,75 mg.kg⁻¹ a 102,4 mg.kg⁻¹ en generación F₂.

Análisis molecular

Para la prueba de bondad de ajuste, Ji- cuadrado (X²), los SSR BM-181, BM-183, BMd-001 y BMd-028 presentaron la segregación esperada (1:2:1), sin rechazo de la hipótesis nula. La segregación de las familias F_{2:3} corresponde a las proporciones mendelianas 1/4:1/2:1/4. Mientras que, los SSR BM-143 y AG-1 presentaron una distorsión respecto a la segregación 1/4:1/2:1/4 y se rechazó la hipótesis nula. De los dos SSR que no siguieron la segregación esperada, BM-143 resultó significativo para P<0,05 y AG-1 altamente significativo para P<0,05. En ambos casos, se favoreció los alelos del parental IPR-Tiziu (Cuadro 5).

La tasa de distorsión se puede relacionar con diversas causas, como desviaciones estadísticas, errores en el genotipado de la población segregante o la no amplificación del total de los individuos por error en la PCR (Semagn *et al.* 2006). Otros autores, hacen referencia que la distorsión se debe al incremento en la divergencia genética entre los parentales, irregularidades meióticas en la transmisión de los factores genéticos, selección gamética o cigótica y apareamiento preferencial entre genomas homólogos (Nybom *et al.* 2004).

También, factores biológicos como selección natural durante la fertilización, crecimiento de la planta, gametogénesis y desarrollo de semillas, pueden ocasionar distorsión en la segregación

Cuadro 5. Evaluación de la segregación esperada (1/4:1/2:1/4) para cada microsatélite (SSR) en las familias F_{2:3}.

SSR (locus)	N	aa	ab	bb	X ² 1/4:1/2:1/4	P
BM-143	33	15	13	5	7,55	0,02299*
BM-181	51	10	31	10	2,37	0,30536 ns
BM-183	59	10	30	19	2,76	0,25124 ns
AG1	55	6	16	33	36,13	0,00000***
BMd001	49	9	23	17	2,80	0,24710 ns
BMd028	59	10	31	18	2,32	0,31317 ns

Homocigotos a (aa), homocigotos b (bb), heterocigotos (ab). P<0,05.

(Garris *et al.* 2003). El tipo de cruzamiento y parentales es un factor de gran importancia, sobre todo cuando se involucra en la cruce de un materiales locales o silvestres (Blair *et al.* 2006).

De los cuatro SSR evaluados que presentaron segregación esperada, sólo en dos se detectó asociación con los caracteres concentración de Fe y Zn, en el grano de la caraota, para un $LOD\ Score > 3.0$. En el Cuadro 6, se observa la asociación significativa entre los SSR BM-183 (Cromosoma 7) y BMd-001 (Cromosoma 3) con las variables concentración de Fe y Zn en el grano de la caraota. Estos resultados coinciden con estudios anteriores, donde se han identificado QTL asociados a las concentraciones de Fe y Zn en el grano de la caraota (Pérez-Vega *et al.* 2010).

Blair *et al.* (2010) evaluaron 110 líneas recombinantes de la población G14519//G4825 y detectaron QTL en los grupos de ligamiento b02; b03; b04; b07; b08 y b11, asociados a la concentración de Fe y Zn en el grano. Esto, a partir de marcadores moleculares de tipo SSR y RAPD. Posteriormente, Blair *et al.* (2011) detectaron nueve QTL para la concentración de estos minerales en el grano, con marcadores moleculares de tipo SSR y RAPD, en una población (G21242//G21078) de 100 líneas recombinantes.

Blair *et al.* (2013) analizaron la asociación de los SSR con la concentración de Fe y Zn en el grano de 138 líneas recombinantes de caraota,

provenientes de la población Cerinza//Cerinza//Cerinza/G10033), donde detectaron 7 QTL en los grupos de ligamientos b01; b02; b07 y b11.

Los caracteres cuantitativos son un desafío en el fitomejoramiento, por la complejidad genética que los rigen y la dificultad de apilar numerosos alelos que los controlan. Entre estos, la concentración de Fe y Zn en el grano de la caraota (Izquierdo *et al.* 2018). A pesar de esa amplia variabilidad y el efecto ambiental, el componente genético resulta importante para el incremento de la concentración de esos dos minerales en el grano de la caraota (Izquierdo *et al.* 2018).

Existe una correlación positiva demostrada, para el incremento simultaneo de las concentraciones de Fe y Zn en el grano de la caraota (Teixeira *et al.* 2015, Zemolin *et al.* 2016, Izquierdo *et al.* 2018); que puede estar relacionada con el movimiento similar del Fe y Zn a través de la planta, porque varios de los mismos genes están involucrados en el transporte de estos dos minerales (Izquierdo *et al.* 2018).

Lo antes descrito, es la importancia de detectar la asociación de regiones del ADN con la concentración de Fe y Zn en el grano. Los QTL detectados, en el presente estudio, facilitarán la identificación de familias en generación $F_{2:3}$, que porten alelos favorables para la alta concentración de estos minerales en el grano de la caraota. Esto garantiza un proceso de selección más eficiente, al reducir el número de familias que avanzarán en cada ciclo de ese proceso; se disminuirá el tiempo para el desarrollo de líneas con alto valor nutricional, para la obtención de cultivares biofortificados.

CONCLUSIONES

Se reconoce la herencia de tipo cuantitativa y una expresión fenotípica transgresiva, para los caracteres de concentraciones de Fe y Zn, en el grano de la caraota de 77 familias en $F_{2:3}$. Por la distribución continua, de la concentración de ambos minerales, y la obtención de familias con valores intermedios, valores mayores y menores, que los parentales.

Cuadro 4. Valores de la prueba de F para los QTL putativos relacionados a componentes de rendimiento y contenido de Fe y Zn en el grano en las familias $F_{2:3}$.

SSR (locus)	Fe (mg.kg ⁻¹)	Zn (mg.kg ⁻¹)
BM-181	0,23	0,13
BM-183	3,10*	3,31*
BMd-001	3,56*	3,41*
BMd-28	1,22	1,41

Asociación significativa (*), Hierro (Fe) y Zinc (Zn).

Se identificó la asociación entre los SSR BM-183 y BMD-001 y la alta concentración de Fe y Zn, en el grano de la caraota, en las 77 familias en F_{2:3} del cruce entre los genotipos contrastante IPR-Tiziu e I-2581. Estos QTL asociados a la concentración de Fe y Zn, facilita la selección de líneas con alto valor nutricional, con miras a la obtención de cultivares biofortificados.

LITERATURA CITADA

- Acosta, G; Mendoza, F; Aguilar, B; Esquivel, G; Rodríguez, R; Guzmán, S. 2008. Negro Guanajuato, nueva variedad de frijol para el centro de México. *Revista Agricultura Técnica en México* 34:107-111.
- Abbaspour, N; Hurrell, R; Kelishadi, R. 2014. Review on iron and its importance for human health. *Journal of Research in Medical Sciences* 19(2):164-174.
- Blair, M; Izquierdo, P; Astudillo, C; Grusak, M. 2013. A legume biofortification quandary: variability and genetic control of seed coat micronutrient accumulation in common beans. *Frontiers in Plant Science. Plant Physiology* 4:14 p.
- Blair, M; Astudillo, C; Rengifo, J; Beebe, S; Graham, R. 2011. QTL analyses for seed iron and zinc concentrations in an intra-gene pool population of Andean common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 122(3): 511-521.
- Blair, M; Medina, J; Astudillo, C; Rengifo, J; Beebe, S; Machado, G; Graham, R. 2010. QTL for seed iron and zinc concentration and content in a Mesoamerican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) population. *Theoretical and Applied Genetics*. 121(6): 1059-1070.
- Blair, M; Iriarte, G; Beebe, S. 2006. QTL analysis of yield traits in an advanced backcross population derived from a cultivated Andean wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cross. *Theoretical Applied Genetics* 112: 1149-1169.
- Brigide, P; Canniatt-Brazaca, S; Silva, M. 2014. Nutritional characteristics of biofortified common beans. *Food Science Technology* 34(3):493-500.
- Campos-Tirado, GL. 2018. Asociación entre marcadores microsatélites y la concentración de Fe y Zn en el grano de la caraota (*Phaseolus vulgaris* L.), con miras a la biofortificación del cultivo. Tesis de doctorado. Maracay, Venezuela, INIA-ESAT. 114 p.
- Castañeda, R; Ramis, C; Pérez, D. 2014. Asociación entre marcadores microsatélites y el gen de resistencia a la bacteriosis común en familias F_{2:4} de *Phaseolus vulgaris* L. *Agronomía Tropical* 64(3-4):133-141.
- Chaveco, O; Padrón, M; Permuy, N; Ruiz, B; Pachon, H; Beebe, S; Selva, L. 2006. Biofortificación del frijol común con hierro y zinc una alternativa en la estrategia de diversificación alimentaria en Cuba (en línea). *Agrosalud*. Consultado 10 feb. 2016. Disponible en <https://bit.ly/2YIZ5yM>.
- Di Rienzo, J; Casanoves, F; Balzarini, M; González, L; Tablada, M; Robledo, C. 2017. InfoStat versión 2017, Grupo InfoStat. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en <https://bit.ly/3j4Haol>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Italia). 2017. Iniciativa de América Latina y Caribe sin hambre (en línea). Consultado 20 feb. 2017. Disponible en <https://bit.ly/31jdrSH>
- FEDEAGRO (Confederación de Asociaciones de Productores Agropecuarios, Venezuela). 2017. (en línea). Consultado 25 ene. 2018. Disponible en <https://bit.ly/31kvNTf>.
- Garris, A; Mccouch, S; Kresovich, S. 2003. Population structure and its effect on haplotype diversity and linkage disequilibrium surrounding the xa5 locus of rice (*Oryza sativa* L.). *Genetics* 165:759-769.
- Gepts, P; Koinange, E. 1992. Hybrid Weakness in Wild *Phaseolus vulgaris* L. *The Journal of Heredity* 83(2):135-139.
- Granito, M; Guinand, J; Pérez, D; Pérez, S. 2009. Valor nutricional y propiedades funcionales de *Phaseolus vulgaris* L. procesada: un ingrediente potencial para alimentos. *Interciencia* 34(01):64-70.

- Granito, M; Pérez, D; Guinand, J. 2006. Composición química y nutricional de variedades de (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas en Venezuela. *Agronomía Tropical* 56(4):513-522.
- Gutiérrez, M; Rincón, C. 2011. Caracterización de la variabilidad genética mediante el uso de marcadores RAPDs, de un grupo de genotipos nativos y comerciales de caraota en Venezuela. *Agronomía Tropical* 61(1):73-83.
- Izquierdo, P; Astudillo, C; Blair, M; Iqbal, A; Raatz, B; Cichy, K. 2018. Meta-QTL analysis of seed iron and zinc concentration and content in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 131:1645-1658.
- Lorieux, M. 2012. MapDisto. Fast and efficient computation of genetic linkage map. *Molecular Breeding* 30:1231-1235.
- Monserate, F. 2008. Análisis del proceso de biofortificación de variedades de frijol Andino de tipo comercial calima en Colombia (en línea). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. Consultado 17 abr. 2017. Disponible en <https://bit.ly/3aOJl6Y>
- Morton, NE. 1995. LODs past and present. *Genetics* 140:7-12.
- Mukamuhirwa, F; Tusiime, G; Mukankusi, M. 2015. Inheritance of high iron and zinc concentration in selected bean varieties. *Euphytica* 205(2):349-360. <https://bit.ly/3ho8bT7>
- Nybom, H; Esselink, G; Werlemark, G; Vosman, B. 2004. Microsatellite DNA marker inheritance indicates preferential pairing between two highly homologous genomes in polyploidy and hemisexual dog-roses, Rosa L. Sect. Caninae DC. *Heredity* 92:139-150.
- OMS (Organización Mundial de la Salud, Suiza). 2018. Nutrición (en línea). Consultado 25 sep. 2018. Disponible en <https://bit.ly/2YoxZHm>
- Pérez-Vega, E; Pañeda, A; Rodríguez, C; Campa, A; Giraldez, R; Ferreira, J. 2010. Mapping of QTL for morpho-agronomic and seed quality traits in a RIL Population of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 120:136-138.
- Rodríguez, E; Lorenzo, E; Melgar, A; Palacios, E; Gonzales, F; Quintero, A. 2009. Biofortificación del frijol común en Panamá con micronutrientes (en línea). En: Seminario de Biofortificación en Panamá. Consultado 02 mar. 2018. Disponible en <https://bit.ly/32dX5tR>
- Semagn, K; Bjornstad, A; Ndjiondjop, N. 2006. An review of molecular markers methods for plant. *African Journal of Biotechnology* 5(25):2540-2568.
- Shapiro, S; M. Wilk. 1965. An analysis of variance test for normality. *Biometrika* 52(3-4):591-611.
- Teixeira, R; Lima, D; Abreu, A; Ramalho, M. 2015. Implications of early selection for grain colour on iron and zinc content and productivity of common bean. *Plant Breeding*. 134:193-196.
- Tofiño-Rivera, A; Pastrana-Vargas, I; Melo-Ríos, A; Beebe, S; Tofiño-Rivera, R. 2016. Rendimiento, estabilidad fenotípica y contenido de micronutrientes de frijol biofortificado en el Caribe seco colombiano. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 17(3):309-329.
- Tofiño-Rivera, A; Tofiño-Rivera, R. 2013. Contribución de variedades biofortificadas a la seguridad alimentaria. Saarbrücken, Alemania: Editorial Académica Española. 84 p.
- Tofiño-Rivera, A; Tofiño-Rivera, R; Cabal, D; Melo, A; Camarillo, W; Pachón, H. 2011. Evaluación sensorial de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) mejorado nutricionalmente en el norte del departamento del Cesar, Colombia. *Perspectiva en Nutrición Humana* 13(2):60-71.
- Vasconcellos, R; Oraguzie, O; Soler, A; Arkwazee, H; Myers, J; Ferreira, J; Song, Q; McClean, P; Miklas, P. 2017. Meta-QTL for resistance to white mold in common bean. *PLoS ONE*. 12: e0171685.
- Zemolin, A; Ribeiro, N; Casagrande, C; Da Silva, M; Arns, F. 2016. Genetic parameters of iron and zinc concentrations in Andean common bean seeds. *Acta Scientiarum. Agronomy* 38(4):439-446.
- Zeng, Z. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics*.136: 1457-1468.

Insectos asociados al cultivo del cacao depositados en el Museo de Insectos de Interés Agrícola (MIIA) del INIA - Venezuela

Carlos Ramos*; Rafael Paul Montilla Coronado

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP), Unidad de Protección Vegetal. Maracay, Aragua, Venezuela. *Correo electrónico: carlos.ramosinia@gmail.com

RESUMEN

La actualización de la información entomológica y su publicación periódica aporta datos, para el seguimiento de insectos de importancia económica en la agricultura. Con el objetivo de actualizar la información de los insectos asociados al cultivo de cacao, depositados en el Museo de Insectos de Interés Agrícola (MIIA), se revisó la colección. Este museo pertenece al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP), Venezuela. En la revisión, la colección de insectos se reordenó por grupo taxonómico, por orden, género y especie. La información que contenían las etiquetas se registró en una hoja de cálculo de MS Excel®, también se realizó un registro fotográfico de cada especie. En total, se contabilizaron 1.201 ejemplares que representan 151 especies, agrupadas en ocho órdenes, 36 familias y 34 géneros. Se encontraron 28 especies determinadas, distribuidas en Coleoptera (15), Hemiptera (5) y Lepidoptera (8). Como insectos plagas primarias del cacao se registraron a *Carmentia foraseminis*, *Carmentia theobromae*, *Monalonion dissimulatum*, *Steirastoma brevis*, *Xyleborus ferrugineus*, *Xyleborus horridus* y *Xyleborus vespatorius*. Entre otros insectos fitófagos, sin importancia económica, están *Halysidota annulosa*, *Xylopsocus capucinus*, *Sinoxylon* sp., *Taurodemus* sp., *Rhabdopterus venezuelensis*, *Rhabdopterus victorianus*, *Litostylus diadema*, *Ozineus arietinus*. Se encontró a *Calliephialtes* sp. (Hymenoptera: Ichneumonidae), un parasitoida importante de *Carmentia* spp. Como insectos plaga de granos de cacao se identificaron a *Araecerus fasciculatus*, *Hypothenemus* sp., *Lasioderma* sp., *Tribolium* sp. y *Gymnandrosoma* sp. La información taxonómica de cada espécimen, con el registro fotográfico, se incorporó a la base de datos digital del MIIA.

Palabras clave: biodiversidad, especies, insecta, taxa, *Theobroma cacao*.

Insects associated with the cultivation of cocoa deposited in the Museum of Insects of Agricultural Interest (MIIA) of INIA - Venezuela

ABSTRACT

The updating of the entomological information and its periodic publication allows providing data for the monitoring of insects of economic importance. In order to update the information of the insects associated with the cultivation of cocoa, deposited in the Museum of Insects of Agricultural Interest (MIIA), the collection was reviewed. This museum belongs to the Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP), Venezuela. In the review, the insect collection was reordered by the taxonomic group, by order, genus and species. The information contained in the labels was recorded in an MS Excel® spreadsheet; a photographic record of each species was also made. In total, 1,201 specimens were counted, representing 151 species grouped into eight orders, 36 families and 34 genera. 28 determined species were found, distributed in Coleoptera (15), Hemiptera (5), and Lepidoptera (8). *Carmentia foraseminis*, *Carmentia theobromae*, *Monalonion dissimulatum*, *Steirastoma brevis*, *Xyleborus ferrugineus*, *Xyleborus horridus* and *Xyleborus vespatorius* were registered as primary cocoa pests. Among other phytophagous insects without economic importance are *Halysidota annulosa*, *Xylopsocus capucinus*, *Sinoxylon* sp., *Taurodemus* sp., *Rhabdopterus venezuelensis*, *Rhabdopterus victorianus*, *Litostylus diadema*, *Ozineus arietinus*. On the other hand, *Calliephialtes* sp. (Hymenoptera: Ichneumonidae), an important parasitoid of *Carmentia* spp. was registered. As insect pests of cocoa beans were identified *Araecerus fasciculatus*, *Hypothenemus* sp., *Lasioderma* sp., *Tribolium* sp. y *Gymnandrosoma* sp. The taxonomic information of each specimen, with the photographic record, was organized and incorporated into the MIIA digital database.

Key words: biodiversity, insect, species, taxa, *Theobroma cacao*.

Recibido: 20/07/2018 - Aprobado: 20/12/2018

INTRODUCCIÓN

Entre los factores bióticos que limitan la producción agrícola, se encuentran los insectos fitófagos. De allí que, el estudio de las relaciones o interacciones entre cultivo e insectos son importantes para la elaboración de estrategias de control preventivas o curativas, que contribuyan a una producción sostenible.

El conocimiento de los insectos que afectan el cultivo de cacao (*Theobroma cacao*) es necesario, por la importancia del rubro. Su producción, según Cartay (1992) y Quintero *et al.* (2017), ofrece diversas oportunidades económicas, distintas de lo estrictamente agrícola. Estas son impulsadas por los activos históricos, culturales e incluso paisajísticos, que juegan un papel trascendente en el desarrollo local rural.

El cacao se cultiva desde la época de la colonia (De la Cruz y Pereira 2009, Rojas-López 2012, Ramírez 2015) en áreas rurales de difícil acceso, con escasa diversificación económica y con limitación de servicios básicos. Su comercialización representa una fuente importante de ingreso y empleo (directo e indirecto), para numerosas familias de bajos recursos económicos (CCI 2001, Quintero *et al.* 2010). Los múltiples usos del cacao, tanto para la industria agrícola (Guerrero *et al.* 2012), como para la farmacéutica y de cosméticos, hacen que el cultivo tenga mucha demanda (Kalvatchev *et al.* 1998, Quintero y Díaz 2004).

Se siembra en las regiones Nororiental, Norcentro-Costera y Suroccidental de Venezuela (Gómez y Azocar 2002; Reyes y Capriles 2000, Quintero *et al.* 2010). El manejo agronómico se caracteriza por ser orgánico y agroecológico, que crea un microclima muy particular (González 1999), y un efecto protector de la biodiversidad. Según Ramos (2014), esto se afianza más en este agroecosistema que en tierras con otros usos agroforestales. En tal sentido, el cultivo del cacao genera condiciones agroecológicas particulares, que favorecen el desarrollo de insectos fitófagos y entomófagos. Estos aspectos bioecológicos requieren de estudio y evaluación, que generen información de la historia de las relaciones entomológicas, muy valiosa para el desarrollo de

innovaciones que permitan mejorar el manejo del cultivo.

Por lo mencionado anteriormente, destaca el papel que juegan las colecciones científicas. Estas son centros de preservación, resguardo y difusión, que ayudan a construir el entendimiento científico de las riquezas naturales y bioecológicas que estudia; así como, a descubrir los beneficios sociales que se desprendan de estos (Cristín y Perrilliat 2011, Tapia-Rojas *et al.* 2017). En ese sentido, son valiosas fuentes de referencia para diversos estudios en taxonomía, sistemática, ecología, fisiología, genética, conservación, monitoreo de cambios ambientales ocasionados por el calentamiento global, la contaminación, y otras perturbaciones ambientales, entre otros (Tapia-Rojas *et al.* 2017, Vargas 2016, Montaña *et al.* 2012).

El Museo de Insectos de Interés Agrícola (MIIA), como colección científica, constituye una fuente de información entomológica agrícola de la región tropical. Entre sus propósitos está, catalogar todos los especímenes de insectos depositados en la colección; ofrecer información de los insectos plagas y benéficos según el cultivo en el que se colectaron.

El presente trabajo, forma parte de una serie que tiene como meta abordar técnicamente las diferentes colecciones y ponerlas al servicio público por los medios electrónicos de divulgación científica disponibles.

Este trabajo recoge la revisión y registro de los diferentes especímenes de insectos colectados en plantas de cacao, con el fin de ofrecer una lista actualizada de la entomofauna asociada a este cultivo en Venezuela.

METODOLOGÍA

Se revisó el material entomológico asociado al cultivo de cacao, que se encuentra depositado en la colección del MIIA, de la Unidad de Protección Vegetal (UPV), Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP), del INIA-Venezuela. Esta Unidad se encuentra ubicada en la sede administrativa del INIA, en Maracay, Aragua, Venezuela.

El material entomológico de cacao se reordenó por grupo taxonómico, que incluyó orden de insecto, género y especie. La información escrita en las etiquetas de cada espécimen se revisó y registró en una tabla diseñada en MS Excel®. Se consultaron las bases de datos entomológicos disponibles en la red: Global Biodiversity Information Facility (GBIF 2001), Barriga-Tuñón (2009), Chrysomelidae@miza (2016). Se revisó y verificó el estatus taxonómico de las especies determinadas en la colección. Los especímenes no determinados o que se tuviera duda sobre su determinación, se enviaron a taxónomos especialistas del Museo del Instituto de Zoología Agrícola (MIZA), de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela (UCV). Otros se determinaron por los investigadores del Laboratorio de Entomología de la UPV del CENIAP.

Se tomaron fotografías, en vista dorsal y lateral, de cada una de las especies asociadas al cultivo, que se encontraron en la colección, para el registro. Se utilizó una cámara digital marca Canon® D40, con lente Zoom Canon 1:3.6-5.6 58Ø 18-55 mm, que se le acopló una base para lentes macro, marca Leitz Wetzlar Photar®, según el tamaño de los ejemplares. Para insectos menores de 2 mm de longitud, se utilizó un lente 1:2.5/25; para los comprendidos entre 2 y 5 mm, el lente se correspondió a 1:2.8/50 y para los de talla entre 5 y 10 mm, el lente usado fue de 1:5.6/120.

Se estableció una escala para la toma de fotos de los especímenes seleccionados. Para esto, se fijó

el zoom de la cámara al valor máximo otorgado por el lente (55 mm) y la calidad de la imagen a nivel medio (2816px x 1880px). Con esa misma configuración, se realizó una fotografía a una lámina de papel milimetrado de 1 cm² con cada uno de los lentes macro disponible. La escala se colocó sobre la foto, de manera digital, creando un vector sobre la imagen milimetrada. Esto correspondió al lente utilizado para cada espécimen, con la longitud necesaria para representar un milímetro o un centímetro, según el tamaño del ejemplar fotografiado.

Las macrofotografías se obtuvieron con el software de edición de imágenes, Adobe PhotoShop CS5® en ambiente Windows. Con éste, se aplicó el apilado de imágenes (focus stacking) y edición digital, para corrección de colores e incorporación de la escala respectiva al lente macro. Las fotografías se almacenaron en la base de datos del MIIA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el material entomológico resguardado en las cajas entomológicas, se contabilizó un total de 1.201 ejemplares, agrupados en ocho órdenes, 36 familias y 34 géneros. Se encontraron 28 especies determinadas (Cuadro 1), que se distribuyen en los órdenes Coleoptera (15), Hemiptera (5) y Lepidoptera (8).

Entre los lepidópteros considerados plagas primarias del cacao, se nombran a *Carmenta foraseminis* Eichlin (Figura 1 A-B),

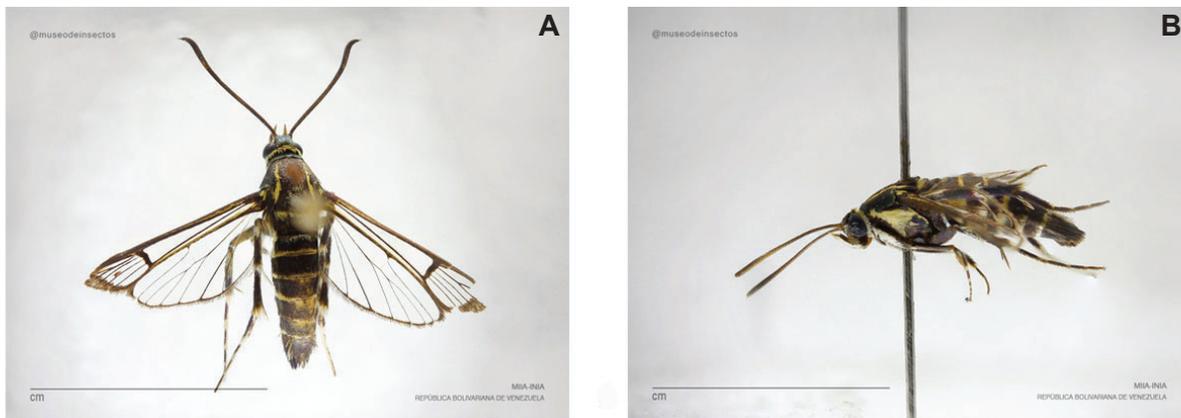


Figura 1. A-B: *Carmenta foraseminis*.

Cuadro 1. Especies determinadas de insectos asociados al cultivo cacao depositados en la colección del MIIA del INIA-Venezuela.

Orden	Familia	Especie	
Coleoptera	Anthribidae	<i>Araecerus fasciculatus</i> (De Geer)	
	Bostrichidae	<i>Micrapate brunnipes</i> (Fabricius)	
		<i>Xylopsocus capucinus</i> (Fabricius)	
		<i>Ozineus arietinus</i> Bates	
	Cerambycidae	<i>Psapharochrus circumflexus</i> (Jacquelin du Val)	
		<i>Steirastoma brevis</i>	
	Chrysomelidae	<i>Ledesmolina auricollis</i>	
		<i>Rhabdopterus victorianus</i> Bechyné	
		<i>Rhabdopterus venezuelensis</i> Jacoby	
		<i>Neobrotica oblongopunctata</i> Jacoby	
		<i>Litostylus diadema</i> Fabricius	
		Curculionidae	<i>Xyleborus ferrugineus</i>
			<i>Xyleborus horridus</i>
			<i>Xyleborus vespatorius</i>
Trogossitidae		<i>Cylidrella mollis</i> Dajoz	
Hemiptera		Coreidae	<i>Pachylis laticornis</i> (Fabricius)
	Miridae	<i>Monalonion dissimulatum</i>	
	Pentatomidae	<i>Pharypia pulchella</i> Drury	
		<i>Mecistorhinus tripterus</i> Fabricius	
	Flatidae	<i>Leptormenis relictus</i> (Fabricius)	
Lepidoptera	Arctiidae	<i>Halysidota annulosa</i> Walker	
	Crambidae	<i>Agathodes designalis</i> Guenée	
	Oecophoridae	<i>Stenoma strigivenata</i> (= <i>Anadasmus porinodes</i>)	
	Pterophoridae	<i>Platyptilia nubila</i> Hübner	
	Pyralidae	<i>Sylepta prorogata</i> Hampson	
	Saturniidae	<i>Dirphia lichyi</i> Lemaire	
	Sessidae	<i>Carmenta theobromae</i>	
<i>Carmenta foraseminis</i>			

C. theobromae (Busck) (Sessidae) (Figura 2 A-B), y *Stenoma strigivenata* Butter (= *Anadasmus porinodes* (Meyrick)) (Oecophoridae).

Estas plagas, en estados inmaduros, realizan perforaciones en las mazorcas de cacao. Esto favorece la entrada de patógenos, que

ocasionan la pudrición interna del fruto y daño de los granos (Delgado 2005, Rodríguez *et al.* 2013, Vásquez *et al.* 2015). También, se registra a *Sylepta prorogata* Hampson (Pyralidae), cuyas larvas atacan hojas tiernas, que causan daño por defoliación y enrollamiento (Bovi *et al.* 1977, Rogg 2000) y *Monalonion dissimulatum*

Dist. (Hemiptera: Miridae), que se conoce como chinche amarilla (Figura 2 C-D). Las ninfas, como los adultos se alimentan de las ramas, chupones, frutos tiernos y mazorcas maduras del cacao (Ramírez y Rodríguez 1999). De las mazorcas maduras succionan la savia e inyectan toxinas que necrosan los tejidos, y pueden causar la desecación de frutos (Moya *et al.* 2005; Ramírez y Rodríguez 1999). *Steirastoma brevis* Villiers

(Coleoptera: Cerambycidae), también es una plaga primaria que se conoce como la gota del cacao (Figura 2 E-F). El adulto se alimenta de la corteza y de ramas jóvenes, donde deja cicatrices visibles (Plantwise 2018); la larva lo hace subcortical, creando túneles irregulares y en espiral. Las ramas y tallos se debilitan, pueden resquebrajarse por fuertes vientos y, posteriormente, secarse (Coto y Saunders 2004).

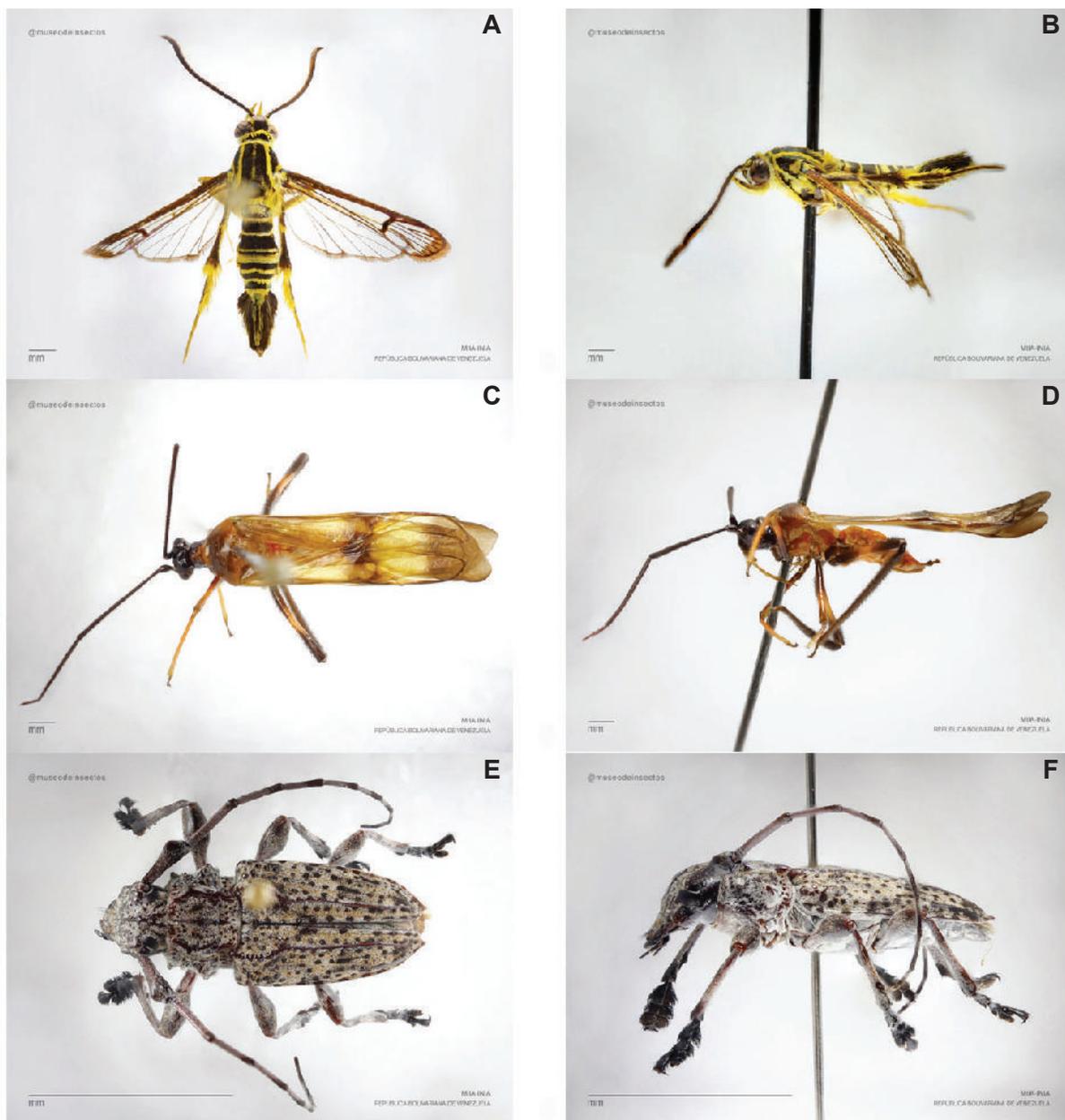


Figura 2. A-B: *Carmenta foraseminis*, C-D: *Monalonion dissimulatum*, E-F: *Steirastoma brevis*

Otros coleópteros de importancia son los “coquitos escopeteros” *Xyleborus ferrugineus* Fabricius, *X. horridus* Eichhoff y *X. vespatorius* Schedl, (Curculionidae) (Figura 3 A-F). Estos destacan, porque establecen simbiosis con los hongos de la necrosis del cacao o mal del machete (*Ceratocystis fimbriata* Ellis & Halst.), así, son vectores de enfermedades (Goitía y Rosales 2001; Navarro y Liendo 2010).

En la colección se encuentran otros insectos que son señalados como fitófagos del cultivo, pero sin un registro científico como plagas del cacao. Entre estos: *Halysidota annulosa* (Lepidoptera: Arctiidae) (Figura 4 A-B) y los coleópteros *Xylopsocus capucinus*, *Sinoxylon* sp. (ambos Bostrichidae)(Figura 4 C-F) y *Taurodemus* sp. Wood (Curculionidae) (Figura 4 G-H).

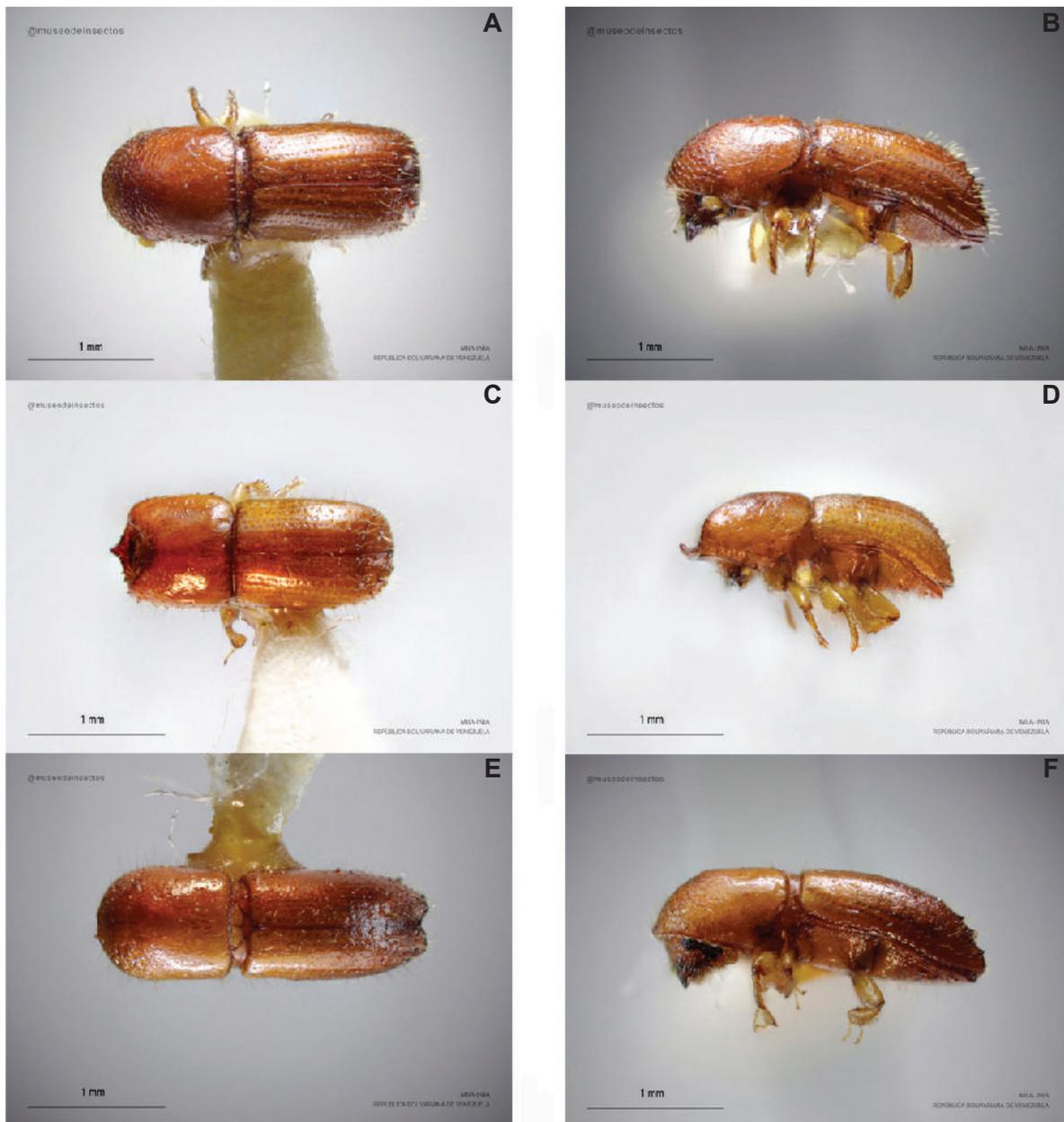


Figura 3. A-B. *Xyleborus ferrugineus*, C-D. *Xyleborus horridus*, E-F. *Xyleborus vespatorius*

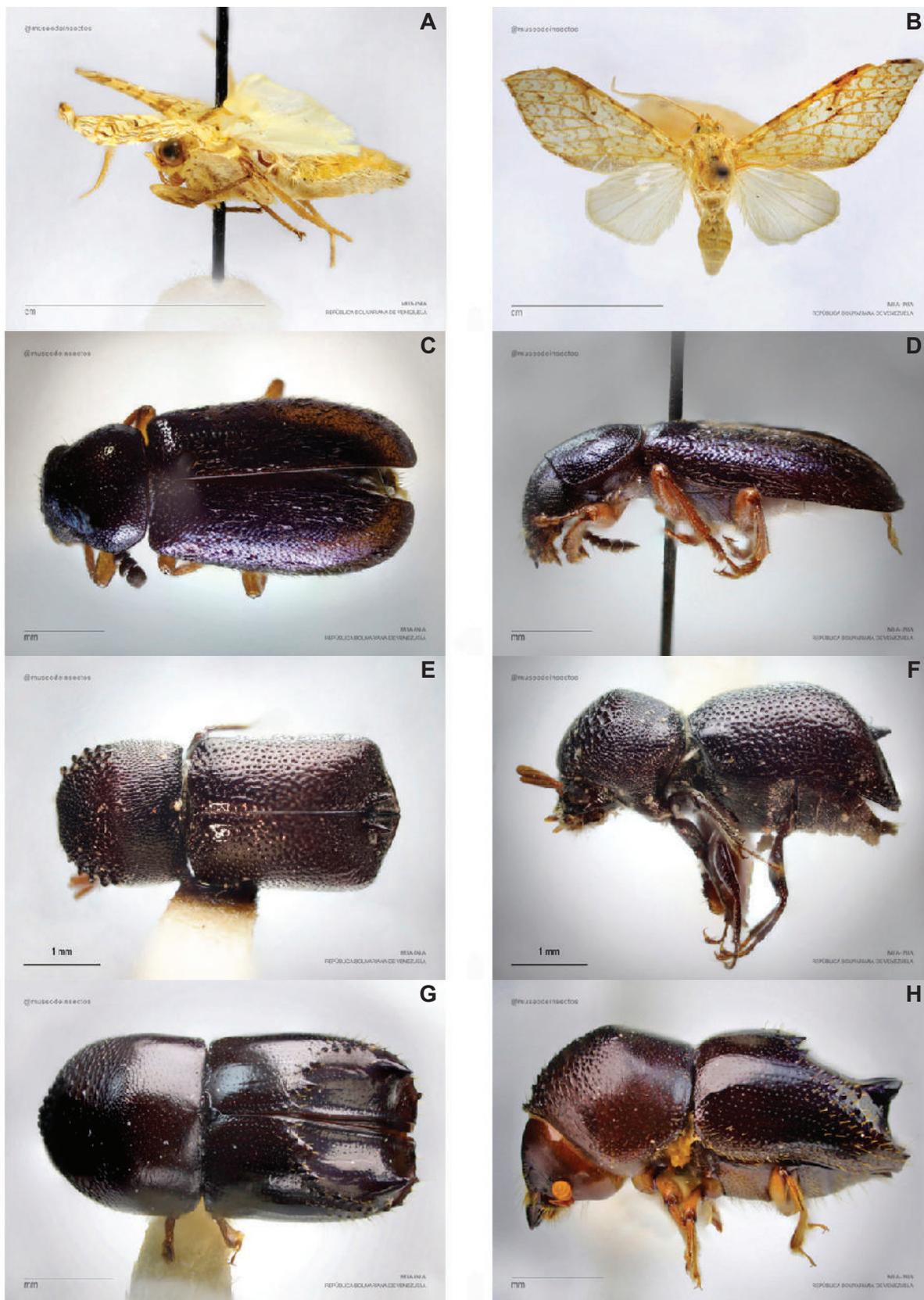


Figura 4. A-B: *Halysidota annulosa*, C-D: *Xylopsocus capucinus*, E-F: *Sinoxylon* sp., G-H: *Taurodemus* sp.

De igual forma, se resguardan especímenes que se capturaron de manera ocasional, durante las distintas actividades de colecta del MIAA, que por sus hábitos alimenticios no representan problema para la producción. Entre estos, se mencionan a los coleópteros *Rhabdopterus venezuelensis* (Figura 5 A-B) y *R. victorianus* (Chrysomelidae) (Figura 5 C-D); *Litostylus diadema* (Curculionidae) (Figura 5 E-F) y *Ozineus arietinus* (Cerambycidae)

(Figura 6 A-B); *Calliephialtes* sp. Ashmead (Hymenoptera: Ichneumonidae), que es un parasitoides importante de *Carmenta* spp. (García y Montilla 2010) (Figura 6 C-D).

Como insectos plaga del grano de cacao, se señalan los coleópteros *Araecerus fasciculatus* (Anthribidae) (Figura 6.E-F) y *Hypothenemus* sp. (Curculionidae)(Figura 6 G-H).

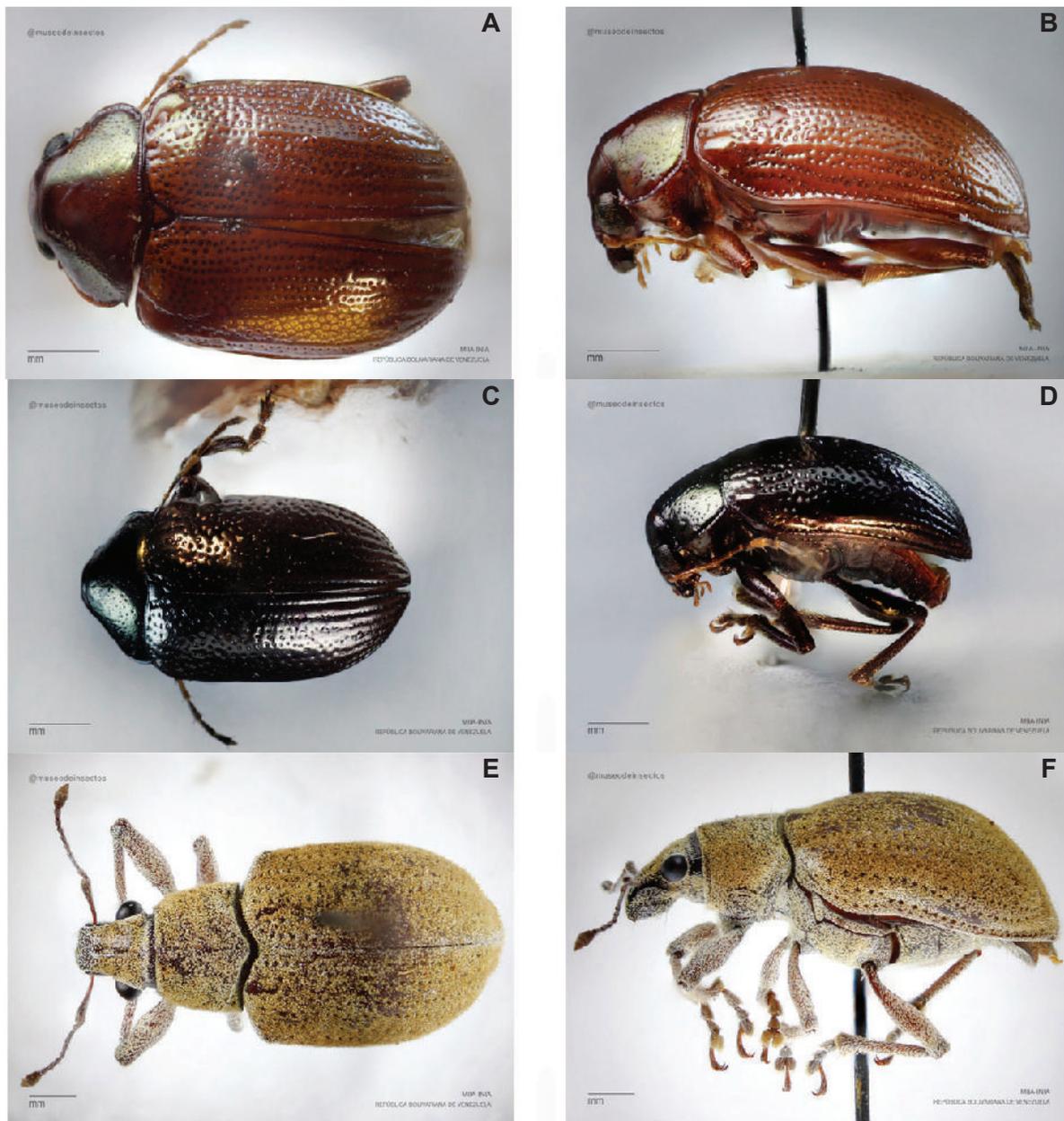


Figura 5. A-B: *Rhabdopterus venezuelensis*, C-D: *Rhabdopterus victorianus*., E-F: *Litostylus diadema*.

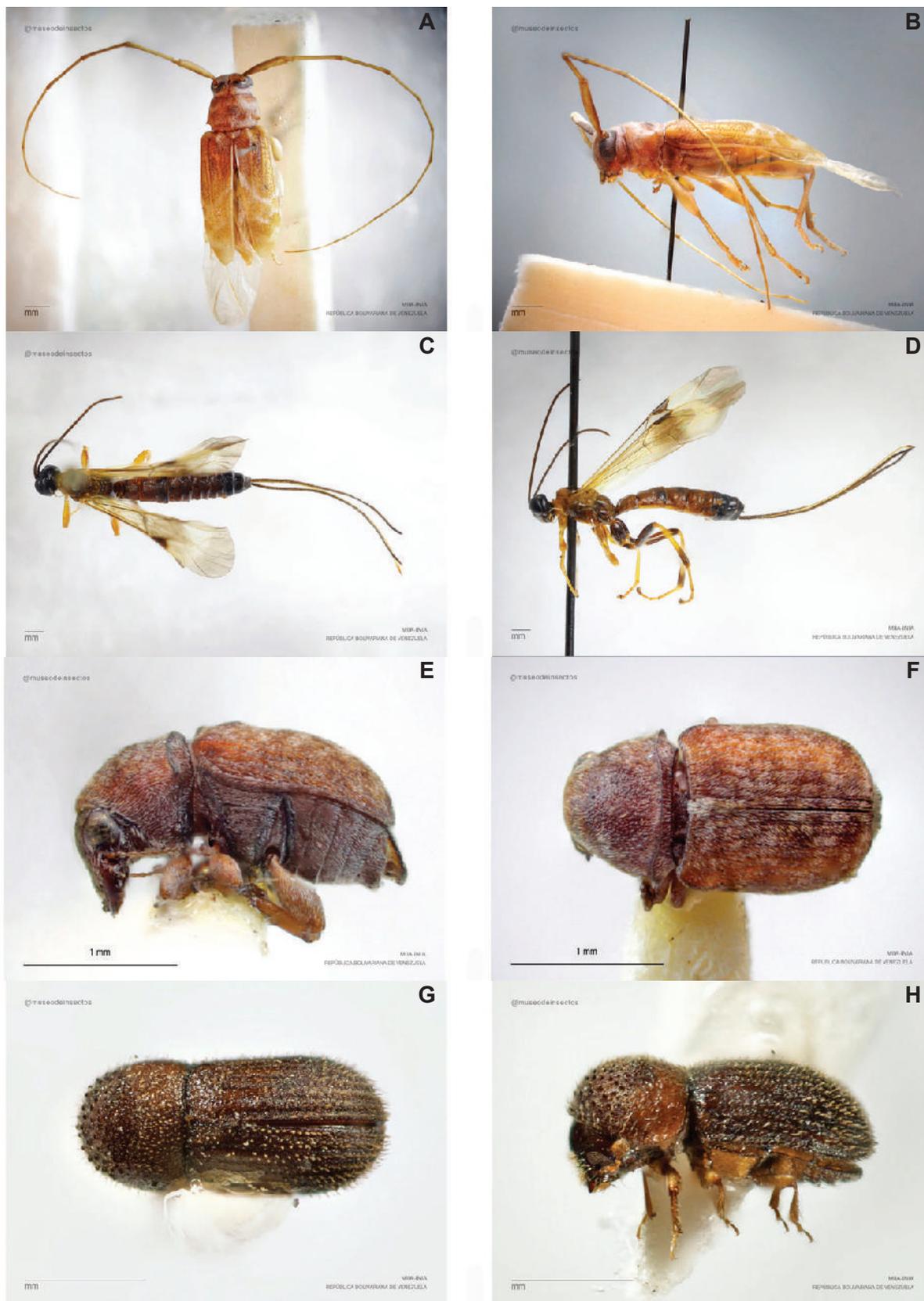


Figura 6. A-B: *Ozineus arietinus*, C-D: *Calliephialtes* sp., E-F: *Litostylus diadema*, G-H: *Hypothenemus* sp.

De la misma forma, se incluye a *Lasioderma* sp. Stephens (Anobiidae)(Figura 7 A-B); *Tribolium* sp. W. S. Macleay (Tenebrionidae)(Figura 7 C-D) y al lepidóptero *Gymnandrosoma* sp. (= *Ecdytolopha*) Dyar (Tortricidae). Los adultos y larvas de estos géneros durante su alimentación construyen túneles en la semilla, que son puntos de entrada de otros organismos que causan pudriciones (Plantwise 2018; Cabrera-Asencio *et al.* 2018).

En el Cuadro 2 se presenta el número de especímenes identificados por taxa. Del total de especímenes de Coleoptera (77), sólo seis están identificados a nivel del taxa orden. El resto corresponde a 27 determinados hasta género, 29 hasta familia, y 15 que se llegó completar a especie. En Hemiptera ocho especímenes están identificados a nivel de orden, cuatro a familias, un género y cinco hasta especies determinadas. La misma explicación se aplica para Hymenoptera y Lepidoptera. Los especímenes de Diptera, Embioptera, Neuroptera y Orthoptera están

identificados sólo a nivel de orden. Los porcentajes mostrados en el Cuadro 2 expresan la proporción con relación al total de especímenes.

En el MIIA, del total de 1.201 ejemplares que tiene la colección de los insectos asociados al cacao, sólo 151 especímenes están identificados en algún taxa. Esto indica, la necesidad de especialistas en los grupos para la determinación específica de los taxones, como los que se detallan en el Cuadro 3.

Desde un punto de vista de distribución geográfica, los registros de insectos asociados al cacao provienen de seis estados del país: Aragua (84,5 %), Barinas (0,3 %), Carabobo (9 %), Mérida (2,8 %), Miranda (1,9 %) y Sucre (1,5 %). Existen otros estados (Apure, Yaracuy, Delta Amacuro, Amazonas, entre otros) donde se reportan áreas sembradas de cacao (Quintero *et al.* 2010), de las que no se tiene información entomológica del cultivo; aunque el registro más antiguo de colecta en el país, de las áreas sembradas con cacao, data desde 1940.

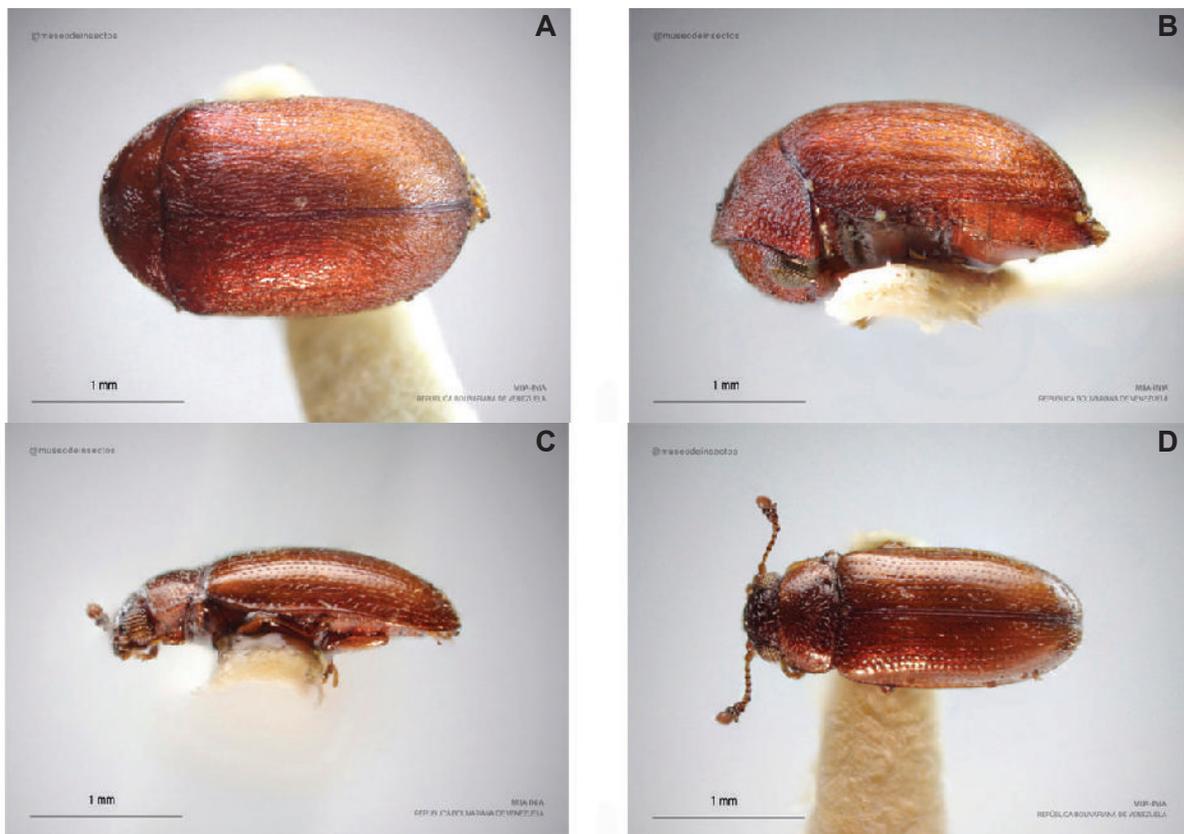


Figura 7. A-B: *Lasioderma* sp, C-D: *Tribolium* sp.

Cuadro 2. Número de especímenes de insectos asociados al cultivo cacao, depositados en la colección del MIIA del INIA Venezuela, según la taxa de clasificación determinada.

Total de especímenes	Taxa								
	Orden	%	Familia	%	Genero	%	Especie	%	
Coleoptera	77	6	7,8	29	37,7	27	35,1	15	19,5
Hemiptera	18	8	36,4	4	27,3	1	0,0	5	36,4
Hymenoptera	8	7	87,5	0	0,0	1	12,5	0	0,0
Lepidoptera	34	18	52,9	3	8,8	5	14,7	8	23,5
Diptera	11	11	100	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Embioptera	1	1	100	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Neuroptera	1	1	100	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Orthoptera	1	1	100	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Total	151	53	35,2	36	23,8	34	22,5	28	18,5

De la información contenida en las etiquetas de cada espécimen, se evidenciaron tres periodos de salidas de campo y ejecución de proyectos de investigación. Cada período separado por al menos una década, en el que no ocurrió ninguna colecta (1941-1954, 1968-1971 y 1996-2007). Se encuentra en curso, un cuarto periodo de nueve años de receso en el ingreso de nuevos registros.

Las colectas en todas las áreas cultivadas con cacao en el país, debe ser comprendida como una necesidad de carácter estratégico, porque puede aportar información e insumos para impulsar la seguridad agroalimentaria. Además, representan una oportunidad para el desarrollo de proyectos de investigación agrícola; mantiene actualizada la vigilancia fitosanitaria del país; permite al MIIA relacionarse con otras instituciones y profesionales de la investigación agrícola; así como, incorporar tecnologías de la información y comunicación de vanguardia, que fortalezcan la calidad de los datos resguardados y facilitar su disposición a los usuarios, a través de canales electrónicos.

CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo son una contribución al conocimiento de la entomofauna asociada al cultivo del cacao. El registro de la información obtenida da una visión del estado actual de la colección MIIA, tanto en números de especies, como de las áreas geográficas donde se colectaron los especímenes relacionados al rubro cacao.

Existe la necesidad de impulsar proyectos de investigación, en el área entomológica, para actualizar y ampliar el registro de insectos asociados al cacao, con la inclusión de nuevas localidades y zonas de siembra del cultivo. Se evidenció la necesidad de entomólogos especialistas, en los grupos taxonómicos de insectos con una identificación incompleta.

AGRADECIMIENTO

A la Dra. Vilma Savini y al Dr. Luis José Joly, Docentes-Investigadores, especialistas en Coleoptera del Museo de Insectos de Zoología Agrícola (MIZA), de la Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía (UCV-FAGRO), por su colaboración en la identificación de algunas especies de coleópteros.

Cuadro 3. Cantidad de morfotipos (en paréntesis) por orden, familia y género, depositados en el MIIA, que requieren de especialistas para su determinación.

Orden	Familia	Género
	Anobiidae (3)	<i>Lasioderma</i> (1)
	Anthribidae (1)	<i>Araecerus</i> (1)
	Bostrichidae (1)	<i>Sinoxylon</i> (2)
	Cerambycidae (2)	
	Chrysomelidae	<i>Neobrotica Jacoby</i> (1)
	Cleridae (1)	<i>Necrobia Olivier</i> (1)
	Coccinellidae (1)	
	Corylophidae (1)	
	Cucujidae (3)	<i>Cryptoteles Ganglbauer</i> (1)
		<i>Brachyomus Lacordaire</i> (1)
		<i>Cnestus Sampson</i> (1)
		<i>Cryptorhynchus Illiger</i> (1)
		<i>Euplatypus Wood</i> (2)
Coleoptera (6)		<i>Hypothenemus Westwood</i> (1)
	Curculionidae (7)	<i>Ips De Geer</i> (1)
		<i>Sampsonius Eggers</i> (1)
		<i>Taurodemus</i> (3)
		<i>Xyleborus Eichhoff</i> (6)
		<i>Xylosandrus Reitter</i> (1)
	Elateridae (3)	
	Nitidulidae (2)	<i>Carpophilus Stephens</i> (1)
	Staphylinidae (1)	
	Tenebrionidae (2)	<i>Tribolium</i> (1)
	Trogossitidae (1)	
Diptera (11)		
Embioptera (1)		
	Miridae (2)	
	Pentatomidae (1)	
Hemiptera (5)	Clastopteridae	<i>Clastoptera Germar</i> (1)
	Flatidae (1)	
Hymenoptera (7)	Ichneumonidae	<i>Calliephialtes</i> (1)
	Lycaenidae (1)	
	Noctuidae	<i>Spodoptera Guenée</i> (1)
	Phycitidae (1)	
	Sessidae	<i>Synanthedon Hübner</i> (1)
Lepidoptera (18)	Stenomidae (1)	
	Tineidae	<i>Symmologa Meyrick</i> (1)
		<i>Amorbia Clemens</i> (1)
	Tortricidae	<i>Gymnandrosoma</i> (1)
Neuroptera (1)		
Orthoptera (1)		

LITERATURA CITADA

- Barriga-Tuñón, JE. 2009. Coleoptera neotropical (en línea). Consultado 20 ene. 2018. Disponible en <https://bit.ly/3j4YpGc>.
- Bovi, O; Coral, F; Parra, J. 1977. Insetos associados ao cacauero no litoral do estado de São Paulo (en línea). *Bragantia* (36):15-18. Consultado 01 nov. 2018. Disponible en <https://bit.ly/3ava6BS>
- Cartay, R. 1992. Historia de la alimentación del Nuevo Mundo (en línea). Caracas: Fundación Polar, 2ª edición. Editorial futuro, C. A. 436 p. ISBN: 980-6100-29-8. Consultado 15 mar. 2018. Disponible en <https://bit.ly/2Y10CVN>.
- Cabrera-Asencio, I; Vélez, A; Henríquez, S; Santiago-Blay, J. 2018. *Melicoccus bijugatus* Jacquin (Sapindaceae), *quenepa*: a new host plant record for the Citrus Fruit Borer, *Gymnandrosoma aurantianum* Lima, 1927 (Lepidoptera: Tortricidae) and the genus *Gymnandrosoma* in Puerto Rico (en línea). *Life: The Excitement of Biology* 1(1):3-15. Consultado 25 sep. 2017. Disponible en <https://bit.ly/39fVHln>
- CCI (Centro de Comercio Internacional, Suiza). 2001. Cacao: Guía de prácticas comerciales (en línea). 188 p. Consultado 01 feb. 2018. Disponible en <https://bit.ly/33lub5p>.
- Chrysomelidae@miza. 2016. Chrysomelidae@miza (en línea). Consultado 25 feb. 2018. Disponible en <https://bit.ly/31nNiCl>.
- Coto, D; Saunders, J. 2004. Insectos plagas de cultivos perennes con énfasis en frutales en América Central (en línea). Turrialba, Costa Rica. CATIE. Serie Técnica. Manual técnico n 52. 420 p. Consultado 01 feb. 2018. Disponible en <https://bit.ly/3boyTaR>.
- Cristín, A; Perrilliat, MC. 2011. Las colecciones científicas y la protección del patrimonio paleontológico (en línea). *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* 63(3):421-427. Consultado 01 feb. 2018. Disponible en <https://bit.ly/3bo6JNk>
- De La Cruz, E; Pereira, I. 2009. Historias, Saberes y Sabores en torno al cacao (*Theobroma cacao* L.) en la subregión de Barlovento, estado Miranda (en línea). *SAPIENS* 10(2):97-120. Consultado 01 feb 2018. Disponible en <https://bit.ly/2UwXrrw>.
- Delgado, N. 2005. Caracterización morfológica de los Sesiidae (Insecta: Lepidoptera) perforadores del fruto del cacao (*Theobroma cacao* L.), presentes en la región costera del estado Aragua, Venezuela. *Entomotropica* 20(2):97-111.
- García, JL; Montilla, R. 2010. Himenópteros parasitoides de insectos asociados a las plantaciones de cacao, en la región costera del estado Aragua, Venezuela. *Agronomía Tropical* 60(1):91-97.
- GBIF (Global Biodiversity Information Facility, Dinamarca). 2001. (en línea, sitio web). Consultado 15 ene. 2018. Disponible en <https://bit.ly/3aMmoXx>.
- Goitia, W; Rosales, CJ. 2001. Relación entre la incidencia de escolítidos y la necrosis del cacao en Aragua, Venezuela (en línea). *Manejo Integrado de Plagas* 62:65-71. Consultado 25 sep. 2017. Disponible en <https://bit.ly/3ajwHRP>.
- Gómez, A; Azocar, A. 2002. Áreas potenciales para el desarrollo del cultivo cacao en el estado Mérida. *Agronomía Tropical* 52(4):403-425.
- González, E. 1999. El Cacao en Venezuela. Serie: Papeles de FUNDACITE (en línea). 46 p. Consultado 1 feb. 2018. Disponible en: <https://bit.ly/3hiBRkE>.
- Guerrero, D; Girón, C; Madrid, A; Mogollón, C; Quiroz, C; Villena, D. 2012. Diseño de la línea de producción de chocolate orgánico (en línea). Repositorio institucional PIRHUA – Universidad de Piura. Piura, Perú. 111 p. Consultado 19 marzo 2018. Disponible en <https://bit.ly/3l74eom>
- Kalvatchev, Z; Garzaro, D; Guerra, F. 1998. *Theobroma cacao* L.: Un nuevo enfoque para nutrición y salud (en línea). *Agroalimentaria* (6):23-25. Consultado 26 jun. 2018. Disponible en <https://bit.ly/2UEpN3d>.

- Montaño, C; Meza, A; Días, L. 2012. La colección entomológica Cebuc y su potencial como colección de referencia de insectos acuáticos (en línea). Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural. Universidad de Caldas 16(2):173-184. Consultado 04 may. 2017. Disponible en <https://bit.ly/2JiASBu>.
- Moya, A; Gómez, A; Ramos, G. 2005. La chinche amarilla del cacao. INIA Divulga (5):5-6.
- Navarro, R; Liendo, R. 2010. Fluctuación poblacional de Scolytidae (Insecta: Coleoptera) en cacao del estado Aragua, Venezuela. Agronomía Tropical 60(3):255-261.
- Plantwise. 2018. Plantwise Knowledge Bank (en línea, sitio web). Consultado 19 nov. 2017. Disponible en <https://bit.ly/2UfVa53>.
- Quintero, M; Díaz, K. 2004. El mercado mundial del cacao (en línea). Agroalimentaria 9(18):47-59. Consultado 16 nov. 2017. Disponible en <https://bit.ly/2wsqAMH>
- Quintero, M; García, L. 2010. La producción de cacao en Venezuela: Hacia una nueva ruralidad. Actualidad Contable FACES 13(20):114-123. Consultado 29 jun. 2018. Disponible en <https://bit.ly/3ak0KZU>.
- Quintero, M; Anido, J; Azuaje, A. 2017. El consumo de cacao en Venezuela y en el mundo desde una perspectiva sostenible (1960-2014). Agroalimentaria 23(45):23-49.
- Ramírez, A; Rodríguez, L. 1999. Plagas de cultivos tropicales II. Plagas y enfermedades del cacao (en línea). Tegucigalpa, Honduras. 12 p. Consultado 24 ago. 2017. Disponible en <https://bit.ly/3dvK2J5>.
- Ramírez, LA. 2015. El cultivo del cacao venezolano a partir de Maruma. Historia Caribe (en línea). Vol X (27):69-101. Universidad del Atlántico Barranquilla, Colombia. Consultado 30 jun. 2018. Disponible en <https://bit.ly/3aTcaEX>
- Ramos, D. 2014. Consideraciones ambientales y viabilidad socioeconómica del sistema productivo del cacao. El caso de los agricultores de Pueblo Bello, Departamento del César (en línea). Tesis de Maestría Gestión Ambiental. Bogotá, Colombia, Pontificia Universidad Javeriana. Consultado 6 ago. 2017. Disponible en <https://bit.ly/2UwYwQ6>
- Reyes, H; Capriles de Reyes, L. 2000. El Cacao en Venezuela. Moderna Tecnología para su cultivo. Editado por Chocolates el Rey. Caracas, Venezuela. 270 pp. ISBN 980-07-6189-6 / 980-07-6189-6-8. 78 p.
- Rodrigues, VL; Sppagiari, CA; Valente, FI; Lenzi, JC. 2013. *Carmenta foraseminis* (Lepidoptera: Sesiidae), nova broca de frutos de cacau no Brasil. Revista de Agricultura 88(1):70-75.
- Rogg, H. 2000. Manual: Manejo integrado de plagas en cultivos de la Amazonía Ecuatoriana (en línea). Escuela Superior Politécnica Ecológica Amazónica (ESPEAm). Quito, Ecuador. 183 p. ISBN 9978-41-628-5. Consultado 5 jul. 2018. Disponible en <https://bit.ly/31lcj0V>
- Rojas-López, J. 2012. La producción de cacao en la Venezuela de la segunda mitad del siglo XVIII: ¿Grandes o modestas plantaciones?. Derecho y Reforma Agraria (38):89-109.
- Tapia-Rojas, AM; López-Olguín, J; Pérez-Torres, BC; Jiménez-García, D; Juárez-Ramón, D; Tapia-Rojas, MA. 2017. Importancia de la colección entomológica del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Sistemática y Morfología. Entomología Mexicana, 4:832-836.
- Vargas, M. 2016. Insecta of Costa Rica (INBio). Version 1.7. Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio), Costa Rica (en línea, sitio web). Consultado 4 may. 2017. Disponible en <https://bit.ly/3heQ0iR>.
- Vásquez, Y; Muñoz, Y; Muriel, S; Hernández-Baz, F. 2015. Ocurrencia de los barrenadores *Carmenta foraseminis* Eichlin y *Carmenta theobromae* (Busck) (Lepidoptera: Sesiidae) en *Theobroma cacao* L., en el Departamento de Antioquia-Colombia. Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle 16(1):34-38.

Nota Técnica

Rendimiento de clones de papa con resistencia a la candelilla tardía

Norkys Marilyn Meza^{1*}, Beatriz Margarita Daboín-León², Daunarima Renaud-Rodríguez¹, Raizza del Carmen Riveros²

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). El Cují, Lara, Venezuela. ²Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Trujillo, Venezuela. *Correo electrónico: norkysmeza@gmail.com

RESUMEN

El cultivo de la papa representa el cuarto más importante en el mundo. Su producción es limitada por la candelilla tardía [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary], una enfermedad devastadora. Con el objetivo de evaluar la severidad de ataque de la candelilla tardía y el rendimiento de clones de papa, con resistencia a la enfermedad, se realizó un ensayo en el estado Trujillo, Venezuela. Se utilizaron cinco clones de papa procedentes del Centro Internacional de la Papa (CIP) y dos variedades de uso comercial. El ensayo se estableció en un diseño experimental de bloques completos al azar, con cuatro repeticiones. Se determinó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) y el rendimiento (kg.ha⁻¹). Se realizó un análisis estadístico y prueba de media para el rendimiento. Los valores del ABCPE de los clones, oscilaron entre 88 y 429, con el menor mostrado por el clon 397079-6. Las variedades testigo tuvieron los valores del ABCPE de 455 para Tibisay y 4.462 en Granola, está última con alta severidad por ser susceptible a la enfermedad. En el análisis del rendimiento de tubérculos (kg.ha⁻¹), se observó diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre los materiales genéticos evaluados. El clon 397079-6 resultó promisorio, con valor bajo del ABCPE por la baja severidad de la enfermedad, y rendimiento de 22.980 kg.ha⁻¹, seguido del clon 393612-1 (128 ABCPE y 22.530 kg.ha⁻¹). Estos clones presentan potencialidades y son una alternativa para nuevas variedades de papa en Venezuela.

Palabras clave: cultivo, enfermedad, *Phytophthora infestans*, *Solanum tuberosum*.

Yield of potato clones with late candelilla resistance

ABSTRACT

Potato cultivation represents the fourth most important in the world. Its production is limited by the late candelilla [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary], which is a devastating disease. In order to evaluate the severity of the late candelilla and the yield of potato clones, a trial was carried out at Trujillo State, Venezuela. Five potato clones from the Centro Internacional de la Papa (CIP) and two varieties of commercial potatoes were used. The trial was established in a randomized complete block experimental design with four replications. The area under the disease progress curve (AUDPC) and the yield (kg.ha⁻¹) were determined. Statistical analysis and mean test for yield were performed. The AUDPC values of the clones ranged from 88 to 429, with the lowest shown by clone 397079-6. The control varieties had AUDPC values of 455 for Tibisay and 4,462 in Granola, the latter with high severity for being susceptible to the disease. In the analysis of the tuber yield (kg.ha⁻¹), significant differences ($P \leq 0.05$) were observed between the genetic materials evaluated. Clone 397079-6 was promising, with a low AUDPC value due to the low severity of the disease, and a yield of 22,980 kg.ha⁻¹, followed by clone 393612-1 (128 AUDPC and 22,530 kg.ha⁻¹). These clones have potentialities and are an alternative for new potato varieties in Venezuela.

Key words: culture, disease, *Phytophthora infestans*, *Solanum tuberosum*

Recibido: 29/09/2017 - Aprobado: 14/08/2018

INTRODUCCIÓN

En el trópico, el desarrollo del cultivo de papa se ve afectado, por factores bióticos y abióticos. Entre los factores bióticos, las enfermedades son causantes de severas pérdidas en el cultivo, como la candelilla tardía o tizón tardío (González *et al.* 2017). Esta enfermedad, producida por el hongo [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary], causa entre 70 y 80 % de reducción de los rendimientos, en las siembras de todas las zonas del rubro en Venezuela. En condiciones favorables de temperatura, por encima de 10 °C y humedad relativa de 75 %, esa reducción puede llegar al 100 %. Con porcentajes más bajos de infección, la cosecha puede resultar no apta para el almacenamiento (Yeen *et al.* 2014; Chowdappa *et al.* 2015).

La candelilla tardía de la papa es una enfermedad endémica en las áreas de papa localizadas en los países de la zona andina tropical. Según Fry *et al.* (2015), se reportó por primera vez en 1590. Desde allí se llevó a Europa en tubérculos, durante la época de la colonia. Entre 1845 y 1847 todos los campos cultivados de papa, en especial los de Irlanda, se destruyeron por esta devastadora enfermedad. Esto ocasionó en Europa la mayor hambruna de todos los tiempos. A partir de esas fechas, los agricultores que siembran papa conocen la enfermedad (Kamoun *et al.* 2015).

La resistencia de la planta, a sus patógenos, depende de la capacidad de la planta para reconocerlos al inicio de la infección. Las plantas contrarrestan el ataque con barreras físicas o por medio de reacciones bioquímicas, que producen sustancias tóxicas para el patógeno o crean condiciones que inhiben su desarrollo. La resistencia de este tipo ocurre cuando una o más de estas sustancias alcanzan una concentración suficiente para inhibir el avance de la infección (Robledo-Esqueda *et al.* 2012).

Maffei *et al.* (2005) estudiaron la resistencia a la candelilla tardía, en clones promisorios de papa, en condiciones del estado Trujillo, Venezuela, con el uso del método de área bajo la curva. Los autores encontraron valores del área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE)

bajos, lo que indicó que los materiales genéticos presentaron tolerancia a la enfermedad.

La candelilla tardía de la papa se transmite por semilla. Esto destaca la importancia del uso de materiales genéticos resistentes a la enfermedad, en la producción de semilla de papa. El objetivo de este trabajo fue evaluar la severidad de ataque de la candelilla tardía y el rendimiento de cinco clones de papa con genes de resistencia a la enfermedad, en el estado Trujillo, Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se estableció en el Campo Experimental La Cristalina, situado en la parroquia Monseñor Carrillo, municipio Trujillo, estado Trujillo. Este campo de producción de papa se encuentra ubicado a 2.800 m de altitud, con 09°17'17" N y 70°22'36" O. La zona se caracteriza por poseer temperaturas promedios mínimas y máximas de 9 y 16 °C, respectivamente y 80 % de humedad relativa.

Se evaluaron cinco clones promisorios de papa de la población B: 393612-1; 391047-34; 391002-6; 393079-6 y 399101-1, provenientes del Centro Internacional de la papa (CIP). Los clones con resistencia a la candelilla tardía, compuestos por genes de *S. tuberosum* subespecie *tuberosum* y *S. tuberosum* subespecie *andigena* proveniente de Perú y Bolivia (Meza *et al.* 2018). Como testigos se utilizaron las variedades de papa Tibisay y Granola, la primera posee resistencia, mientras que Granola es susceptible a la enfermedad (Porrás y Gallardo 2011).

La siembra del ensayo se efectuó en forma manual. El área experimental estuvo conformada por 28 parcelas, con un área efectiva de 4,80 m² cada una. Cada parcela constituyó una unidad experimental, con cuatro hileras de 3 m de longitud, espaciadas a 0,80 x 0,30 m. Se sembraron 10 tubérculos por hilera.

Para evaluar el daño de la enfermedad causada por *P. infestans* en los clones de papa, se utilizó la escala de valores propuesta por el CIP (Henfling 1987), que se muestra en el Cuadro 1. Esta escala comprende un rango de valores que describen el porcentaje de daño (severidad) en las hojas de

Cuadro 1. Escala de valores para determinar el porcentaje de daño por *Phytophthora infestans*, utilizada por el Centro Internacional de la Papa (CIP) Henfling (1987).

Valores *CIP	Área foliar dañada por <i>P. infestans</i> (%)	Características visuales
1	0	Ausencia total del daño.
2	5	Pocas plantas afectadas, no más de dos lesiones en un radio de diez metros o en una hilera de una misma longitud.
3	10	Hasta diez lesiones pequeñas por planta.
4	25	Casi todos los folíolos con aguda lesión.
5	50	Todas las plantas están afectadas y cerca de la mitad del follaje ha sido destruido, el campo aparece moteado y color café.
6	75	Tres cuartas partes de cada planta están destruidas, el follaje no es ni del todo color café ni del todo color verde.
7	95	El cultivo ha perdido densidad y está más abierto.
8	97	Solo un poco de folíolos verdes.
9	100	Tallos y hojas muertas.

*CIP: Centro Internacional de la Papa.

la planta, que varía desde 1 (ausencia de daño) hasta 9 (totalmente dañado).

Las evaluaciones de la infección por el patógeno se efectuaron a intervalos semanales, a partir de los 45 días después de la siembra; para esto, se tomaron las 20 plantas de las dos hileras centrales. Con las lecturas semanales de la severidad o porcentaje de daño se determinó el ABCPE, según la fórmula propuesta por Shaner y Finney (1977):

$$ABCPE = \sum_{i=1}^n \left[\frac{(X_{i+1} + X_i)}{2} \right] (T_{i+1} - T_i)$$

Donde:

ABCPE = área bajo la curva de progreso de la enfermedad.

X_i = proporción de área foliar dañada por la enfermedad o severidad (expresada en porcentaje).

$(T_{i+1} - T_i)$ = tiempo en días entre dos lecturas.

n = número total de observaciones.

Se determinó el número y biomasa de tubérculos por planta por cada tratamiento, para estimar el rendimiento, que se expresó en Kg·ha⁻¹.

El diseño de los experimentos fue de bloques completos al azar, con siete tratamientos (cinco clones y dos variedades testigos) y cuatro repeticiones. A la variable rendimiento se le realizó análisis de varianza (ANAVAR) y las medias de los tratamientos se compararon según Tukey, con una significancia de $P < 0,05$. Los análisis se efectuaron con el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2017).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con relación a la evaluación de la severidad de la candelilla tardía, durante el ciclo de siembra en el campo, la enfermedad se manifestó seis semanas después de la emergencia de las plantas. En la Figura 1 se presenta el ABCPE de los clones y variedades de papa evaluados. Los valores de

los clones, oscilaron entre 88 y 429, con el menor mostrado por 397079-6. Las variedades testigo tuvieron los valores de 455 para Tibusay (resistente) y 4462 en Granola (susceptible).

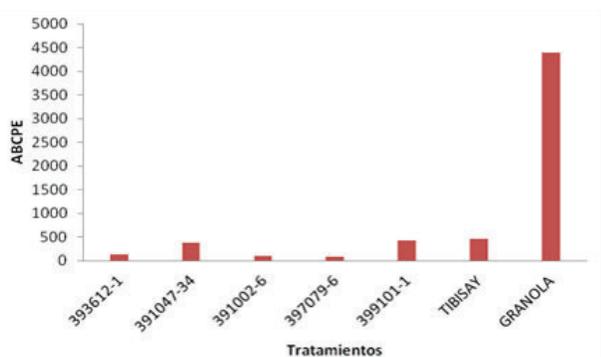


Figura 1. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE), en clones y variedades de papa, evaluada en el Campo Experimental La Cristalina, municipio Trujillo, Trujillo, Venezuela. Periodo: agosto 2011 - enero 2012.

Todos los clones presentaron menor ABCPE con respecto al testigo susceptible, variedad Granola, lo que muestra menor severidad de la enfermedad. Esto, probablemente, por el origen genético de los clones (Meza *et al.* 2018), que cuentan con la presencia de genes de resistencia a *P. infestans*. Este aspecto coincide con lo mostrado por García *et al.* (2016), al evaluar los cultivares de papa Zone Red, Amany, Noha, Loane, Rain Bow, Actrice y Gold Rush que resultaron los más resistentes a la enfermedad.

La evaluación del rendimiento promedio (kg. ha⁻¹), de tubérculos, mostró diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre los materiales genéticos (Cuadro 2). El clon 397079-6 presentó el mayor rendimiento (22.980 kg. ha⁻¹), estadísticamente igual al clon 393612-1 (22.530 kg. ha⁻¹). El clon 391047-34 tuvo una posición intermedia y el resto presentó los menores rendimientos en conjunto con las variedades testigos.

Los materiales genéticos que mostraron mayores valores de ABCPE presentaron menor rendimiento; mientras que, los materiales con menor

Cuadro 2. Rendimiento promedio de tubérculos de clones y variedades de papa evaluados en el Campo Experimental La Cristalina, municipio Trujillo, Trujillo, Venezuela. Periodo: agosto 2011 - enero 2012.

	Tratamientos (materiales genéticos)	Rendimiento (kg. ha ⁻¹)
Clones	393612-1	22.530 a
	391047-34	17.960 ab
	391002-6	15.790 b
	397079-6	22.980 a
	399101-1	17.870 b
Variedades	Tibusay	14.660 b
	Granola	12.900 b

Letras iguales significan que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($\alpha = 0,05$).

valor se consideraron resistentes, como el clon 397079-6 que mostró valores de 88 ABCPE y de 22.980 kg. ha⁻¹ (Cuadro 2 y Figura 1). Aunque los demás clones tuvieron un comportamiento variable, estos resultaron ser superiores a los materiales testigos. Los valores promedios nacionales de rendimiento de papa están en el orden de 15.000 kg. ha⁻¹.

Los daños causados por la candelilla tardía se vieron reflejados en el rendimiento, destacándose el clon 397079-6 como más resistente en comparación con el testigo Granola, seguido del clon 393612-1 (22.530 kg. ha⁻¹). Esto coincide con lo reportado por Niño *et al.* (2010), quienes evaluaron la variedad Granola a 2.415 m de altitud y encontraron un rendimiento de 11.000 kg. ha⁻¹ por daño de la candelilla tardía. Landeo (2008) evaluó durante cinco campañas agrícolas 313 clones promisorios de papa, y determinó que el grado de daño por tizón tardío para cada uno de los clones fue variable. Eso fue debido principalmente, a las condiciones de humedad y temperatura en las localidades donde se establecieron las evaluaciones.

González *et al.* (2011) evaluaron y seleccionaron clones de papa con altos niveles de resistencia

horizontal a la candelilla tardía, durante los años 2006, 2007 y 2008, en condiciones del estado Mérida, Venezuela. En ese estudio se utilizó la escala visual recomendada por el CIP, con la que se calculó el ABCPE. Los resultados indicaron que la mayoría de los clones presentaron alto nivel de resistencia (ABCPE = 0 - 9,75) y las variedades testigos confirmaron su susceptibilidad (ABCPE = 208,75 - 347,17). Rodríguez *et al.* (2008) seleccionaron clones de papa con resistencia horizontal a la candelilla tardía, por los valores de ABCPE entre 0 a 10.000, donde el mayor porcentaje de clones mostraron baja severidad a la enfermedad.

CONCLUSIONES

Los cinco clones evaluados presentaron menor ABCPE con respecto al testigo susceptible, variedad Granola. Esto demuestra su menor severidad de la enfermedad, por la resistencia a la candelilla tardía de la papa.

El clon 397079-6 resultó promisorio, con valor bajo del ABCPE y rendimiento de 22.980 kg.ha⁻¹, seguido del clon 393612-1. Estos clones presentan potencialidades y son una alternativa como nuevas variedades, previa evaluación en otras zonas productoras de papa en Venezuela.

LITERATURA CITADA

- Chowdappa, P; Kumar, N; Madhura, J; Mohan, S; Mylers, K; Fry, W; Cooke, DE. 2015. Severe outbreaks of late blight on potato in South India caused by recent changes in the *Phytophthora infestans* population. *Plant Pathology* 64:191-199.
- Di Rienzo, J; Casanoves, F; Balzarini, M; González, L; Tablada, M; Robledo, C. 2017. InfoStat versión 2017 (en línea). Grupo InfoStat. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Consultado el 23 ago 2017. Disponible en <https://bit.ly/3kp3R7e>
- Fry, WE; Birch, PR; Judelson, HS; Grunwald, NJ; Danies, G; Everts, KL; Gevens, AJ; Gugino, BK; Johnson, DA; Johnson, SB; McGrath, MT; Myers, KL; Ristaino, JB; Roberts, PD; Secor, G; Smart, CD. 2015. Five reasons to consider *Phytophthora infestans* a reemerging pathogen. *Phytopathology* 105(7):966-981.
- García, D; Morales, A; Molina, O. 2016. Estudio de *Phytophthora Infestans* (Mont.) de Bary en 30 cultivares de papa (*Solanum tuberosum* L.) y su relación con las variables climáticas. *Revista Agricultura Tropical* 2(2):57-62
- González, L; Niño, L; Gastelo, M; Suárez, F. 2011. Evaluación y selección de clones de papa con resistencia a candelilla tardía en el estado Mérida, Venezuela. *Revista Latinoamericana de la Papa* 16(1):142-149.
- González, L; Varga, A; Niño L. 2017. Mejoramiento genético de la papa (*Solanum tuberosum* L.) en Venezuela. *Revista Latinoamericana de la Papa* 21(1):121-128.
- Henfling, J. 1987. El tizón tardío de la papa *Phytophthora infestans*. 2a ed. rev. Lima, Perú. Centro Internacional de la Papa. 25 p.
- Kamoun, S; Furzer, O; Jones, JDG; Judelson, H; Shad, A; Dalio, RJD; Guha, S; Schena, L; Zambounis, A; Panabières, F; Cahill, D; Ruocco, M; Figueiredo, A; Chen, X; Hulvey, J; Stam, R; Lamour, K; Gijzen, M; Tyler, BM; Grünwald, N; Mukhtar, S; Tomé, DFA; Tör, M; Van Den, AG; Mcdowell, J; Daayf, F; Fry, W; Lindqvist-Kreuzer, H; Meijer, HJG; Petre, B; Ristaino, J; Yoshida, K; Birch, PRJ; Govers, F. 2015. The top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 16(4):413-434.
- Landeo, J. 2008. Developing horizontal resistance to late blight in potato. Program Report 1995-1996. International Potato Center. Lima. pp: 122-126.
- Maffei, M; Quintero, J; García, R; Zambrano, J; Materano, W; Valera, A. 2005. Comparación de dos metodologías para la cuantificación de daños causados por candelilla tardía (*Phytophthora infestans* Mont. De Bary) en papa (*Solanum tuberosum* L.). *Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture* 49:72-76.
- Meza, NM; Ramírez-Guerrero, HO; Daboín-León, BM. 2018. Evaluación de características de

- calidad de clones promisorios y variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) Revista Facultad Agronomía (LUZ) 35(2):152-167.
- Porras Y, EE; Gallardo, M. 2011. Caracterización agronómica de materiales genéticos de papa en la localidad Loma de Cubiro, estado Lara, Venezuela. *Agronomía Tropical* 61(2):105-111.
- Niño, L; González, L; Prieto, L; Acevedo, E; Suárez, F. 2010. Producción de tubérculos semillas a partir de progenies de semilla sexual de papa en Pueblo Llano, estado Mérida. *Agronomía Tropical* 60(1):49-54.
- Robledo-Esqueda, MN; Lozoya-Saldaña, H; Colinas-León, MT. 2012. Inducción de defensa en papa (*Solanum tuberosum* L.) contra *Phytophthora infestans* Mont. de Bary por fungicidas. *Interciencia* 37(9):689-695.
- Rodríguez, D; Alcalá de M, D; Escalona, F. 2008. Selección inicial de clones de papa por resistencia a la candelilla tardía y rendimiento. *Bioagro* 20(1):29-35.
- Shaner, G; Finney, RE. 1977. The effect of nitrogen fertilization of the expression of slow mildewing resistance in knox wheat. *Phytopathology* 67:1051-1056.
- Yeen, H; Champa, W; Kalischuk, M; Ron, D; Dirk, P; Lawrence, K. 2014. Evolution and management of the irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* in Canada and the United States. *American Journal of Potato Research* 91:579-593.

INSTRUCCIONES AL AUTOR

REVISTAS CIENTÍFICAS DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGRÍCOLAS

Las revistas científicas del INIA, *Agronomía Tropical* y *Zootecnia Tropical*, se fundaron con el propósito de fomentar y mantener el intercambio de información entre los investigadores. Se divulgan resultados de la investigación e innovación en el campo de las ciencias agrícolas animales y vegetales, tanto por el INIA como por otras instituciones, nacionales e internacionales.

Agronomía Tropical inicia su publicación en el año 1951, mientras que *Zootecnia Tropical*, está vigente desde el año 1983. Ambas publican trabajos originales que presentan nuevos conceptos o tecnologías en el área agrícola.

Agronomía Tropical aborda las áreas temáticas: recursos fitogenéticos, protección vegetal, economía agrícola, edafología, biotecnología agrícola vegetal, tecnología de alimentos, ingeniería agrícola y sistemas de producción agrícola vegetal.

Zootecnia Tropical se enfoca en las áreas de producción, salud, genética y reproducción animal de especies de interés zootécnico, tecnología de alimentos de origen animal, pastos, forrajes, acuicultura marítima y continental, entre otros temas de interés.

TIPO DE CONTRIBUCIONES

Las revistas *Agronomía Tropical* y *Zootecnia Tropical* publican cuatro categorías de contribuciones: artículos científicos, notas técnicas, artículo de revisión y trabajos especiales. Los artículos científicos y notas técnicas pueden tener un enfoque cuantitativo o cualitativo.

Artículo científico. Documento no mayor a 25 páginas, donde se presentan resultados originales e inéditos. También serán aceptados datos o resultados presentados en resúmenes de congresos o seminarios, a condición de que el artículo completo no aparezca en las memorias del mismo.

Nota técnica. Documento de corta extensión con un máximo de 10 páginas, que describe técnicas experimentales, equipos, fenómenos naturales, especies nuevas o resultados parciales de un trabajo de interés. El texto tendrá las mismas secciones del artículo científico.

Artículo de revisión y trabajo especial. Documento que presenta reportes y estadísticas de un área temática actualizada de interés colectivo, de orden científico-técnico, con relevancia nacional o internacional en el cual el autor presenta un análisis crítico sobre un tema prioritario o emergente. Este será solicitado por el Comité Editorial a especialistas de trayectoria profesional y experiencia demostrada. Será sometido a las normas de revisión para un artículo científico y su extensión no debe ser mayor a 25 páginas, incluyendo cuadros y figuras.

REMISIÓN DE ARTÍCULOS

La revista *Agronomía Tropical* recibirá las contribuciones de los autores a través de los formularios presentados en el portal OJS de la revista. Las contribuciones podrán ser presentadas en español, inglés o portugués, acompañadas de una Carta de Originalidad, firmada por todos los autores.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Autoría. Se incluirán como autores a las personas que hayan realizado contribuciones en la formulación del ensayo, diseño experimental, obtención de data cruda, aplicación del método estadístico, análisis de datos, interpretación de resultados, así como redacción del manuscrito o investigación bibliográfica.

Originalidad. Los trabajos sometidos para arbitraje y probable publicación deben ser inéditos, por lo tanto, se presentará una carta de fe donde el (los) autor(es) manifiestan que el mismo no ha sido enviado a otra(s) revista(s).

Integridad. La alteración de resultados y el plagio (alusión de resultados de otros investigadores sin dar crédito con la cita bibliográfica correspondiente) se considera inadmisibles y no ético.

Conflicto de intereses. Los autores presentarán por escrito, no mantener vínculos de interés comercial o personal en la investigación que dio origen al manuscrito sometido.

PROCESO EDITORIAL

Los trabajos recibidos serán evaluados inicialmente por el Comité Editorial, aquellos trabajos que superen la evaluación preliminar serán arbitrados por tres especialistas en el área de conocimiento, mediante el método de "doble ciego". Una vez que el autor reciba las observaciones de los evaluadores, tiene un plazo de 30 días para incorporar las modificaciones sugeridas en el texto y remitir la versión corregida a la revista.

Transcurridos 30 días sin recibir respuesta de los autores, el Comité Editorial retirará el trabajo. Es importante destacar que el arbitraje es una orientación para aceptar o rechazar el documento y el Comité Editorial se reserva el derecho de seleccionar los artículos que cumplan con los criterios de calidad y pertinencia establecidos por la revista.

El Comité Editorial tiene la potestad de ajustar el artículo para mantener la uniformidad de estilo de la revista, después de la edición y corrección de estilo, los autores recibirán la prueba de galera, la cual debe ser cuidadosamente revisada y devuelta al editor en un término máximo de una semana. Los trabajos que no superen la evaluación preliminar o el proceso de arbitraje serán devueltos a los autores, con notificación de no publicable en la revista. Las apelaciones deben presentarse ante el Editor Jefe, quien revisará la apelación conjuntamente con el Comité Editorial y emitirá un dictamen en un plazo de dos semanas.

FORMATO.

Los borradores deben ser escritos utilizando los procesadores de textos, como Libre Office Writer o Microsoft Office Word®. Las páginas serán numeradas consecutivamente en el lado inferior derecho, al igual que cada línea del texto, con inicio desde el título; fuente Arial tamaño 12; interlineado 1,5; márgenes a 2,5 cm por los cuatro lados.

En relación con los encabezamientos, el título de la contribución es el único de primer orden, se escribirá centrado en negrilla con la primera letra en mayúscula. Los títulos principales de sección (segundo orden): Resumen, Introducción, Materiales y métodos, Resultados y discusión, Conclusiones, Agradecimientos y Literatura citada, se indicarán centrados en negrilla y mayúsculas. El título de tercer orden, alineado a la izquierda, en negrilla y sólo la letra inicial en mayúscula; el texto continuará debajo del título. El título de cuarto orden, alineado a la izquierda, en negrilla seguido de un punto y sólo la letra inicial en mayúscula, el texto continuará en la misma línea

Los cuadros se presentarán en el mismo archivo del texto, acompañados del respectivo título, ubicado en la parte superior, el cual debe ser concreto y expresar el contenido del mismo, en letra Arial tamaño 11; identificados progresivamente con números arábigos, con orden de aparición inmediatamente después del párrafo donde se menciona por primera vez. El contenido de los cuadros no debe ser duplicado en las figuras. El encabezado de las columnas debe ser conciso e indicar claramente las unidades en que se expresa el contenido. El significado de las abreviaturas utilizadas se desarrollará como pie de cuadro. Cuando se presenten resultados numéricos, deben ir acompañados del nombre de la prueba estadística realizada. Los cuadros serán elaborados utilizando aplicaciones tales como Libre Office

Writer, Microsoft Office Word®, Libre Office Calc o Microsoft Office Excel®; y no ser presentados en forma de imagen escaneada.

Las figuras se refieren a cualquier ilustración que se incluya en el trabajo como: gráficos, dibujos, fotografías, esquemas, mapas u otras representaciones, indicadas consecutivamente en el texto. El título se debe colocar en la parte inferior, en letra Arial tamaño 11. Las fotografías se deben presentar en formato JPEG, y los gráficos, mapas, dibujos otras representaciones se presentarán en formato PNG. Además de los cuadros y figuras insertados en el texto, deben enviarse los archivos originales en el formato en el que fueron elaborados. Todos los cuadros y figuras deben estar indicados en el texto. La resolución mínima para todas las figuras es 300 ppp.

Título. Se presentará en español, inglés o portugués, con su respectiva traducción, cónsono con el idioma del manuscrito. Identifica y describe el contenido del trabajo, sin abreviaturas, con un máximo de 20 palabras. Los nombres científicos se incluirán solo para especies poco comunes o cuando sea indispensable.

Autor(es) y afiliación (es). Nombres y apellidos completos en minúsculas a excepción de las iniciales. Cuando los autores publican con dos apellidos, deben estar separados con un espacio, salvo aquellos apellidos extranjeros o que por tradición utilicen el guion. Se acompañarán con números en superíndices para identificar la institución a la que pertenece(n) el(los) autor(es) y correos electrónicos. Se incluirá el nombre completo de la institución y sus siglas entre paréntesis, ciudad y país. El autor de correspondencia se identificará con un asterisco.

Resumen, Abstract o Resumen. Párrafo entre 200 y 250 palabras, claro y comprensible. Los estudios con enfoque cuantitativo deben indicar brevemente: problema y justificación, objetivo(s), métodos experimentales, resultados y conclusiones, sin exceder el uso de valores numéricos. Para estudios con enfoque cualitativo se deben indicar: objeto de estudio, propósito, metodología, resultados y aproximaciones. El idioma del resumen será como se indica a continuación:

Idioma del trabajo	Idioma del resumen
Español	Español e Inglés
Inglés	Inglés y Español
Portugués	Portugués, Inglés y Español

Palabras clave. Se recomiendan términos simples o compuestos (máximo seis), que permitan identificar el contenido del artículo y que no hayan sido usados en el título. Para seleccionar las palabras clave se sugiere consultar y usar los descriptores del tesoro multilingüe de agricultura (AGROVOC), creado por la FAO u otro similar. Se deben incluir los nombres científicos de los organismos biológicos como palabras clave. Disponible en: <http://aims.fao.org/es/agrovoc>

Introducción. Constituye una breve referencia de los antecedentes que motivaron la realización de trabajo; igualmente pueden incluirse la revisión de literatura con las investigaciones más recientes que aporten ideas fundamentales para la realización del trabajo. También incluirá el objetivo del mismo.

Materiales y Métodos o Metodología. Esta sección debe ser clara y precisa, de manera suficiente para permitir la repetitividad del ensayo. Para estudios con enfoque cuantitativo, seguir un ordenamiento lógico de las técnicas empleadas y los materiales utilizados. Los procedimientos analíticos y estadísticos utilizados tienen que ser citados como referencias bibliográficas, describiendo solo las modificaciones o lo novedoso. Las investigaciones de campo deberán incluir una breve descripción agroclimática de la localidad donde se efectuó el trabajo. Cuando las contribuciones tengan un enfoque cualitativo se debe indicar el marco teórico que describe brevemente conceptos y modelos

que orientaron la investigación; así como métodos, técnicas y procedimientos de acopio de la información, al igual que de procesamiento y validación de datos.

Resultados y discusión o Resultados y hallazgos. El contenido debe ser coherente con los objetivos señalados en la introducción. Es necesario detallar los resultados en orden lógico y de forma objetiva y secuencial. La información cuantitativa se podrá presentar en cuadros y figuras. La literatura citada no debe exceder de tres autores por idea a discutir.

Conclusiones o Aproximaciones. Deben responder al problema de la contribución. Indicar, de manera breve y precisa, los hallazgos más relevantes de la investigación, es decir, aquellos que constituyan un aporte significativo para el avance del campo temático explorado, además de brindar orientación para futuras investigaciones. Las conclusiones o aproximaciones no deben ser ambiguas, ni basarse en suposiciones.

Agradecimientos. Se incluirán los reconocimientos a aquellas personas que hayan realizado contribuciones sustanciales al trabajo, como: técnicos, productores, comunidades y revisores, entre otros. Igualmente, para reconocer a las instituciones que financiaron la investigación parcial o totalmente. El párrafo de esta sección debe ser breve, hasta un máximo de 10 líneas.

Literatura citada. Debe ser actualizada, con excepción de trabajos clásicos que se requiera incluir. Se debe ajustar al documento "Redacción de referencias bibliográficas: normas técnicas para ciencias agroalimentarias/IICA, CATIE" (2016). 5a ed. Disponible en: <http://repositorio.iica.int/bitstream/11324/6570/1/BVE18029707e.pdf>

A continuación, se presentan algunos ejemplos de las referencias más utilizadas:

Artículo en revista científica

Nery, FC; Paiva, R; Silva, DPC; Campos, ACAL; Chalfun-Júnior, A; Campos, JMS. 2011b. Nuclear DNA integrity of cryopreserved embryonic axes of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Acta Horticulturae* 908:139-142.

Artículo de una revista digital

Fajardo, L; Lovera, M; Arrindell, P; Aguilar, VH; Hasmy, Z; Cuenca, G. 2015. Morphotype-based characterization of arbuscular mycorrhizal fungal communities in a restored tropical dry forest, Margarita island-Venezuela (en línea). *Revista de Biología Tropical* 63(3):859-870. Consultado 24 jul. 2015. Disponible en <http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/15940/20146>.

Libros

Balzarini, M; Di Rienzo, JA; Tablada, M; González, L; Bruno, C; Córdoba, M; Robledo, W; Casanoves, F. 2011. Introducción a la bioestadística: aplicaciones con InfoStat en agronomía. Córdoba, Argentina, Brujas. 383 p.

Capítulo de libro de un autor en su propia obra

Toledo, JM; Schultze-Kraft, R. 1985. Metodología para la Evaluación Agronómica de Pastos Tropicales. In *Manual para la Evaluación Agronómica*. Cali, Colombia, RIEPT- CIAT. p. 91-110.

Capítulo de libro cuyo autor no es el editor del documento

Panta, A; Zea, B; Sánchez, D; Tay, D; Roca, W. 2013. Crioconservación de recursos genéticos de tubérculos y raíces andinos en el Perú. In *González-Arno, MT; Engelmann, F (eds.). Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe*. San José, Costa Rica, IICA. p. 175-196.

Para ampliar la información le recordamos consultar las normas de redacción de referencias bibliográficas del IICA-CATIE, 5ª edición.

CONSIDERACIONES DE ESTILO

- La redacción del manuscrito será en voz activa y se debe utilizar la forma impersonal o tercera persona del singular.
- Restringir el uso del gerundio, utilice esta forma verbal únicamente para demostrar dos acciones que se realizan a la vez.
- Las palabras cuadro y figura se escriben, en el texto, con la primera letra en mayúscula.
- Las siglas deben ser escritas en mayúscula y entre paréntesis en su primera aparición en el texto y antecedidas por el término completo al que se refiere, a excepción de las unidades de medida.
- Los nombres de las variedades, cultivares e híbridos deberán acompañarse de comillas simples sólo cuando se mencionen por primera vez en el resumen, abstract o cuerpo del artículo. Esto siempre y cuando no le anteceda la palabra variedad o cultivar, en cuyo caso no se utilizarán.
- Los suelos deben ser identificados taxonómicamente; si el nombre de la serie no es conocido, deberá señalarse la familia.
- Los nombres de productos comerciales deben evitarse, utilizándose el nombre genérico o principio activo. En caso de ser estrictamente necesario, su uso debe acompañarse por el símbolo®.
- Los símbolos no tienen plural ni llevan punto (.) después de estos, y solo se escriben en mayúsculas aquellos derivados de nombre propios (Celsius, Kelvin, Joule, entre otros). Las siglas tampoco tienen plural, esto se mostrará con las palabras acompañantes, ejemplo: los SNP.
- Los decimales se deben separar con coma (,) y las unidades de mil o millón se expresarán con punto (.).

Nomenclatura. Se recomienda el uso del Sistema Métrico Decimal (SI) para la expresión de las unidades. Para los trabajos, los autores utilizarán las convenciones del International Code of Botanical Nomenclature, el International Code of Nomenclature of Bacteria, y el International Code of Zoological Nomenclature. Para la nomenclatura química se utilizará la International Union of Pure and Applied Chemistry, así como la Commission on Biochemical Nomenclature.

Para la nomenclatura de genes y proteínas, se recomienda utilizar los símbolos internacionalmente aceptados; los símbolos específicos pueden ser obtenidos en la base de datos de genes de Pubmed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Las normas de nomenclatura para ganado y otras especies están disponibles en <http://www.genenames.org>, mientras que para ratones y ratas están disponibles en <http://www.informatics.jax.org/mgihome//nomen/strains.shtml>.

En cuanto a los polimorfismos nucleotídicos simples (SNP), deben ser identificados con su número de referencia único (rs) o el número de presentación (ss), como se indica en la base de datos pública dbSNP <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>.

En referencia a la nomenclatura de las mutaciones y otras variaciones en la secuencia de ADN, favor visitar www.hgvs.org/ página oficial de la Genome Variation Society (HGVS).

A continuación, se presenta una lista de abreviaturas y símbolos para la expresión de términos y unidades de medida de uso común:

Término	Símbolo	Término	Símbolo
Metros sobre el nivel del mar	m.s.n.m.	Población total	N
Índice de conversión	IC	Probabilidad	P
Peso al nacer	PN	Coefficiente de variación	CV
Peso al destete	PD	Coefficiente de correlación	r
Bloques multinutricionales	BM	Coefficiente de determinación	R ²
Consumo de materia seca	CMS	Desviación estándar	DE
Energía digestible	ED	Error experimental	EE
Energía metabolizable	EM	Grados de libertad	GL
Fibra ácido detergente	FAD	Heredabilidad	h ²
Fibra de detergente neutra	FDN	Materia Orgánica	MO
Ganancia diaria de peso	GDP	Materia Seca	MS
Aminoácido	aa	Nitrógeno no proteico	NNP
Ad libitum	Ad lib	Proteína Cruda	PC
Ácido Graso Volátil	AGV	Cantidad de sustancia	mol
Partes por millón	ppm		

Unidad	Símbolo	Unidad	Símbolo
Gramo	g	Hora	h
Kilogramo	kg	Minuto	min
Gramos por kilogramo	g.kg ⁻¹	Segundo	s
Miligramos	mg	Porcentaje	%
Kilocalorías	kcal	Por mil	‰
Kilogramo por hectárea	kg.ha ⁻¹	Hectárea	ha
Kilómetro	km	Tonelada	t
Litro	L	Tonelada por hectárea	t.ha ⁻¹
Gramos por litro	g.L ⁻¹	Grados Celsius	°C
Mililitros	mL	Grados Fahrenheit	°F
Mililitros por litro	mL.L ⁻¹	Grados Kelvin	°K
Metro	m	Joule	J
Metro cuadrado	m ²	Milímetro	mm
Metro cúbico	m ³	Micrometro	µm
Decímetro	dm	Miliequivalente	meq
Centímetro	cm	Caloría	cal