

**ALTERNATIVAS PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA MALEZA
INVASORA, *Hyparrhenia rufa*: HONGOS FITOPATÓGENOS Y GANADO
CAPRINO**

Por

VERÓNICA L. RIVERA ANDÚJAR

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en

PROTECCIÓN DE CULTIVOS

**UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2012**

Aprobado por

Abner Rodríguez Carías, Ph. D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Roberto Vargas Ayala, Ph. D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Lydia I. Rivera Vargas, Ph. D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Hipólito O’Farrill Nieves, Ph. D.
Director Interino del Departamento

Fecha

Jaime A. Acosta, Ph. D.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

ABSTRACT

Hyparrhenia rufa commonly known as Jaragua grass is an aggressive weed that has invaded cropland in Puerto Rico. To reduce the possible use of herbicide, several strategies have been proposed for its control such as the use of phytopathogenic fungi and small ruminants.

The study was divided into two sections: (I) Identification and pathogenicity of fungi with potential for biological control of *Hyparrhenia rufa* and (II) Nutrient content and use of *Hyparrhenia rufa* in diets for goats. Fungal isolates of *Curvularia* sp., *Sphaeropsis* sp., *Phoma sorghina* and *Fusarium* sp. were identified and evaluated under laboratory, greenhouse and field conditions being *Fusarium* sp. the most virulent producing large ellipsoidal foliar lesions. As a possible food for goats were observed marked variations in the nutrient content of *H. rufa* through the years. Given the higher content of crude protein from August to October, this time of year could be the most suitable for hay production or grazing of this invasive species. As an integral part of the diet in goats, including 20% *Hyparrhenia rufa* hay with 80% tropical grass hay did not affect total forage consumption and digestibility of dry matter, crude protein and neutral detergent fiber. The goats consumed 10% of *Hyparrhenia rufa* hay offered value that could represent the ideal replacement level in diets for goats based on tropical grass hay.

RESUMEN

Hyparrhenia rufa conocida comúnmente como pasto Jaragua, es una maleza agresiva que ha invadido terrenos cultivables en Puerto Rico. Para disminuir la posible utilización de herbicidas, se han propuesto varias estrategias para su control, tales como el uso de hongos fitopatógenos y ganado caprino.

Este estudio se dividió en dos secciones: (I) Identificación y patogenicidad de hongos con potencial para el control biológico de *Hyparrhenia rufa* y (II) Contenido de nutrientes y utilización de *Hyparrhenia rufa* en dietas para ganado caprino. Los aislados de los hongos *Curvularia* sp., *Sphaeropsis* sp., *Phoma sorghina* y *Fusarium* sp. fueron identificados y evaluados bajo condiciones de laboratorio, invernadero y campo siendo *Fusarium* sp. el más virulento al producir las lesiones foliares largas y elipsoidales. Como posible alimento para ganado caprino se observaron variaciones marcadas en el contenido de nutrientes de *H. rufa* a través del año. Dado el mayor contenido de proteína bruta de agosto a octubre, esta época del año podría ser la más apropiada para la producción de heno o el pastoreo de esta especie invasora. Como parte integral de la dieta en caprinos, la inclusión a 20% de heno de *Hyparrhenia rufa* con 80% heno de gramíneas tropicales no afectó el consumo total de forraje ni la digestibilidad de materia seca, proteína bruta y fibra detergente neutro. Los caprinos consumieron 10% del heno de *Hyparrhenia rufa* ofrecido valor que podría representar el nivel de sustitución ideal en dietas para caprinos basadas en heno de gramíneas tropicales.

A mi Dios por ser el sendero que ilumina mi camino;

*A mis padres Bárbara Andújar y Carlos Rivera los seres que son mi mejor ejemplo y
mi inspiración a seguir;*

A mi hermano Michael Rivera, porque con tu cariño y dulzura alegras mis días;

A mi compañero Oslec Arocho por ser mi apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a Dios porque si todo se ha logrado y hoy he llegado hasta aquí es Gracias a él. A mis padres Bárbara Andújar y Carlos Rivera por que con su dedicación y enseñanza lo que un día sembraron con mucho amor hoy está rindiendo frutos, Gracias a ustedes. A mi hermano Michael Rivera por estar conmigo en las buenas y en las malas. A mi compañero Oslec Arocho porque me has apoyado y acompañado en cada una de las decisiones que he tomado.

Agradezco al Dr. Abner A. Rodríguez Carías por toda su ayuda, enseñanza, dedicación y amistad todos estos años. Gracias a la oportunidad que me brindó de realizar investigación como estudiante subgraduada. De esta oportunidad nació el deseo y la motivación de continuar estudios graduados.

A la Dra. Lydia I. Rivera Vargas por su ayuda, consejos y sembrar en mí la semilla del conocimiento desde mi bachillerato. Agradezco enormemente por aceptarme como su estudiante graduada y por brindarme su confianza y amistad todo este tiempo.

Al Dr. Roberto Vargas Ayala por su ayuda, consejos y por aceptar ser miembro de mi comité. A el Dr. Hipólito O’Farril Nieves por su ayuda en las correcciones.

Mi querida amiga la Srta. Dainette A. Vázquez por tu apoyo y comprensión en toda esta investigación. Por tu amistad y cariño sincero todos estos años. A mis compañeros y amigos Enrique M. Martínez y Elena Latoni por su amistad y ayuda en los experimentos.

A los Agrónomos Víctor González, Luis Collazo y Evelio Hernández y el Sr. José Ariel Muñoz por que con su ayuda este trabajo fue todo un éxito. Al Sr. Edwin Más por su colaboración y su valiosa información. Al Sr. Héctor Rodríguez Pastrana por su colaboración en esta investigación y a todo el personal de la Estación Experimental Agrícola de Lajas, Puerto Rico. A todo el personal del Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales en especial a las secretarias Jeannette Morales y Floripe Cancel por su cálida sonrisa y su ayuda durante mi investigación.

Gracias al Proyecto T-STAR 127 del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) que financió esta investigación.

Mil Gracias a todos los que de una forma u otra me brindaron su ayuda para que todo este trabajo pudiera ser completado. Les estaré eternamente agradecida.

TABLA DE CONTENIDO

ABSTRACT	ii
RESUMEN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
TABLA DE CONTENIDO	vii
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
JUSTIFICACIÓN	1
OBJETIVOS	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
CAPITULO I. IDENTIFICACIÓN Y PATOGENICIDAD DE HONGOS CON POTENCIAL PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE <i>Hyparrhenia rufa</i>	9
INTRODUCCIÓN	10
MATERIALES Y MÉTODOS	12
1.1 Estudiar e identificar hongos patógenos de <i>H. rufa</i> en la Estación Experimental Agrícola en Lajas, P.R.	12
1.1.1 Evaluación del área	12
1.1.2 Aislamiento e identificación de hongos asociados a <i>Hyparrhenia</i> <i>rufa</i>	13
1.2 Evaluación de la virulencia de los hongos aislados a través de pruebas de patogenicidad en condiciones de laboratorio, invernadero y campo... ..	13
1.2.1 Preparación de inóculo	13
1.2.2 Prueba de patogenicidad en condiciones de laboratorio e invernadero	14
1.2.3 Pruebas de patogenicidad en condiciones de campo	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19

1.1 Estudiar e identificar hongos patógenos de <i>H. rufa</i> en la Estación Experimental Agrícola en Lajas, P.R.	19
1.1.1 Evaluación del área	19
1.1.2 Aislamiento e identificación de hongos asociados a <i>Hyparrhenia rufa</i>	20
1.2 Evaluación de la virulencia de los hongos aislados a través de pruebas de patogenicidad en condiciones de laboratorio, invernadero y campo...	23
1.2.1 Prueba de patogenicidad en condiciones de laboratorio e invernadero	23
1.2.2 Pruebas de patogenicidad en condiciones de campo	27
1.2.2.1 Primer ensayo experimental	27
1.2.2.2 Segundo ensayo experimental	28
CONCLUSIONES	33
CAPITULO 2. CONTENIDO DE NUTRIENTES Y UTILIZACIÓN DE <i>Hyparrhenia rufa</i> EN DIETAS PARA GANADO CAPRINO...	34
INTRODUCCIÓN.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS	36
2.1 Monitorear la presencia y determinar el contenido de nutrientes de la maleza <i>Hyparrhenia rufa</i> en la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico en Lajas	36
2.1.1 Inspección y monitoreo	36
2.2 Consumo voluntario y digestibilidad de nutrientes de <i>H. rufa</i> utilizando caprinos adultos.....	37
2.2.1 Prueba de selectividad	37
2.2.2 Inclusión de <i>H. rufa</i> en dietas para ganado caprino; consumo voluntario y digestibilidad de la materia seca, proteína bruta y fibra detergente neutro.....	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
2.1 Monitorear la presencia y determinar el contenido de nutrientes de la maleza <i>Hyparrhenia rufa</i> en la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico en Lajas	40
2.1.1 Inspección y monitoreo	40

2.2 Consumo voluntario y digestibilidad de nutrientes de <i>H. rufa</i> utilizando caprinos adultos	43
2.2.1 Prueba de selectividad	43
2.2.2 Inclusión de <i>H. rufa</i> en dietas para ganado caprino; consumo voluntario y digestibilidad de la materia seca, proteína bruta y fibra detergente neutro.....	45
CONCLUSIONES	48
RECOMENDACIONES	49
LITERATURA CITADA	50

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
Cuadro 1. Severidad de los hongos evaluados en plantas de <i>Hyparrhenia rufa</i> durante las pruebas de patogenicidad en condiciones de laboratorio.....	23
Cuadro 2. Severidad de los hongos evaluados en plantas de <i>Hyparrhenia rufa</i> durante las pruebas de patogenicidad en condiciones de invernadero a los 7 y 14 días después de la inoculación.....	24
Cuadro 3. Composición química de <i>Hyparrhenia rufa</i> a través del año 2011.....	41
Cuadro 4. Consumo selectivo de <i>Hyparrhenia rufa</i> fresca versus henificada por ganado caprino.	43
Cuadro 5. Consumo voluntario y digestibilidad de la MS, PB, y FDN en dietas conteniendo mezclas de heno de gramíneas tropicales con o sin heno de <i>Hyparrhenia rufa</i>	47

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Vista general de la prueba de patogenicidad en realizada en invernadero ubicado en la Universidad de Puerto Rico-Recinto de Mayagüez.....	15
Figura 2. Vista general de los predios de <i>Hyparrhenia rufa</i> ubicados en la Estación Experimental Agrícola en Lajas, P.R.....	18
Figura 3. (A) Inóculo de cada uno de los tratamientos a evaluar y (B) tanque de CO ₂ y cilindro utilizado para la aplicación del inóculo en el ensayo de campo.....	18
Figura 4. Hongos aislados de <i>Hyparrhenia rufa</i> : Colonia (A) y conidias (B) de <i>Curvularia</i> ; Colonia (C) y picnidio con conidias (D) de <i>Sphaeropsis</i> ; Colonia (E) y conidias (F) de <i>Fusarium</i> ; y Colonia (G) y picnidio con conidias de <i>Phoma sorghina</i> . Todos los hongos fueron crecidos en agar de papa y dextrosa acidulado.....	22
Figura 5. Largo de la lesión (cm) causada por los hongos en condiciones de invernadero a los 7 y 14 días después de la inoculación.....	25
Figura 6. Lesiones causadas por <i>Curvularia</i> (A), <i>Sphaeropsis</i> (B), <i>Fusarium</i> (C) y <i>P. sorghina</i> (D) en prueba de patogenicidad realizadas en condiciones de invernadero.....	26
Figura 7. Medidas del largo de las lesiones (cm) en tejido foliar de <i>Hyparrhenia rufa</i> causadas por los hongos evaluados durante el mes de agosto de 2011.....	27
Figura 8. Lesiones causadas por los diferentes hongos evaluados en tejido foliar de <i>Hyparrhenia rufa</i> : <i>Fusarium</i> sp. (A), <i>Sphaeropsis</i> sp. (B), <i>Curvularia</i> sp. (C) y <i>Phoma sorghina</i> (D).....	29
Figura 9. Medidas del largo de la lesión (cm) en tejido foliar de <i>Hyparrhenia rufa</i> causada por los hongos evaluados durante el mes de diciembre 2011.....	30
Figura 10. Datos de temperatura y precipitación promedio a través del año 2011 en la EEA-Lajas.....	31
Figura 11. Localización del área de estudio en la Estación Experimental Agrícola en Lajas (Google Maps, 2012).....	36
Figura 12. Cambios en temperatura y precipitación promedio a través del año 2010 en la EEA-Lajas.....	42

Figura 13. Consumo selectivo mediano de <i>Hyparrhenia rufa</i> fresca por caprinos (A) y consumo selectivo bajo de <i>Hyparrhenia rufa</i> henificada por caprinos (B).....	44
Figura 14. Porcentaje del consumo diario de <i>Hyparrhenia rufa</i> por ganado caprino en relación a la materia seca.....	46

JUSTIFICACIÓN

Las malezas representan una amenaza perenne a la producción agrícola causando cuantiosas pérdidas en diversos cultivos. Estas pérdidas son estimadas en un 12% lo que equivale a \$32 billones en lo que respecta a los cultivos de Estados Unidos (Yandoc-Ables *et al.*, 2006). El daño directo de las malezas a los cultivos pudiera resumirse como la interferencia de luz, competencia por agua, nutrientes y espacio. Además, de servir como reservorio de patógenos de plantas de importancia económica lo que significa una amenaza de brote de una enfermedad (Teasdale y Cavigelli, 2010).

Hyparrhenia rufa (*H. rufa*) es una gramínea que ocupa uno de los primeros lugares como forrajera en África, Centro y Sur América (Más y García, 2006). Además, esta maleza está presente en los estados de Florida y Hawaii (USDA-NRCS, 2010) y países como: México, Costa Rica, Nicaragua, Honduras, Colombia y Ecuador, entre otros. Actualmente esta maleza ha invadido terrenos cultivables en Puerto Rico. La dificultad con esta maleza no sólo es que es capaz de invadir terrenos agrícolas, sino que una vez se establece compite con otros cultivos y contamina los suelos cultivables.

En la actualidad, las alternativas de control disponibles son: el control mecánico, físico y químico. El control mecánico, como es la remoción, es sólo temporero ya que la planta puede volver a brotar. Por lo tanto, el seguimiento para el control puede persistir y requiere de enormes esfuerzos de trabajo y tiempo. El control físico radica en la utilización de fuego o el uso de plásticos cobertores. Por último, el control químico resulta también en una solución temporera ya que necesita repetidas

aplicaciones. Son conocidas las consecuencias negativas del uso continuo de químicos en el ser humano así como en el medio ambiente (Casali *et al.*, 1998; Tessema, 2007).

Debido a la limitada información de manejo de *H. rufa* y el uso indiscriminado de plaguicidas, es importante que en Puerto Rico se evalúen otras estrategias para su control. Esta situación justifica la evaluación de métodos biológicos para el control continuo de la invasión con el propósito de reducir la posible utilización de herbicidas y evitar la contaminación al medio ambiente. El uso de métodos biológicos representa una alternativa ambientalmente amigable. Este estudio pretende identificar hongos fitopatógenos que puedan minimizar el daño ocasionado por la maleza y la utilización de la misma como alimento sustituto en dietas para ganado caprino.

OBJETIVOS

1. Estudiar e identificar hongos patógenos de *H. rufa* en la Estación Experimental Agrícola en Lajas, P.R.
2. Evaluar la virulencia de los hongos aislados a través de pruebas de patogenicidad en condiciones de laboratorio, invernadero y campo.
3. Monitorear la presencia y determinar el contenido de nutrientes de la maleza *Hyparrhenia rufa* en la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico en Lajas.
4. Determinar consumo voluntario y digestibilidad de nutrientes de *H. rufa* utilizando caprinos adultos.

REVISIÓN DE LITERATURA

Las malezas representan un gran problema para la agricultura en los Estados Unidos ya que son causantes de una reducción de 12% en el rendimiento de cultivos. Estas pérdidas representan \$33 billones por cultivo anualmente y \$267 billones entre todos los cultivos combinados (Pimentel, 2001; Pimentel *et al.*, 2005, Chutia *et al.*, 2007). El 73% de las malezas causante de estas cuantiosas pérdidas son especies invasoras, causando \$24 billones en pérdidas anuales (Pimentel, 2001; Pimentel *et al.*, 2005). En Puerto Rico se introdujo la maleza *H. rufa* conocida comúnmente como Jaraguá, Puntero o “Jaragua grass” en otras partes del mundo. En Puerto Rico se le conoce como cola de caballo. *Hyparrhenia rufa* fue introducida a Puerto Rico como una planta para forraje. La misma fue introducida en el año 1940 proveniente de Venezuela según el “Annual Report of the Agrostologist 1945-46” (1946). Según el Dr. Paul Randel esta planta fue utilizada para estudios en Puerto Rico entre la década del 1950 al 1960 (Comunicación personal, 2012). Esta maleza invasora es una gramínea nativa de África que posee tallos delgados, sus hojas son finas y ásperas y de color verde oscuro. Su inflorescencia es una panícula o panoja, con una altura de hasta 2.44 metros aproximadamente. Puede crecer tanto en lugares secos como en lugares húmedos (Más y García, 2006). Actualmente, es muy limitada la información accesible sobre las alternativas para su control.

En la agricultura, el uso de herbicidas químicos para el control de malezas ha representado una de las alternativas principales durante los pasados años. En los Estados Unidos los herbicidas representan el 80% de todos los plaguicidas que se utilizan (Harbuck *et al.*, 2009). Los herbicidas actúan de manera rápida y eficaz, por eso su uso es popular entre los agricultores. Cada año se utilizan \$4 billones en

herbicidas que son aplicados en cultivos en los Estados Unidos, de los cuales \$3 billones son utilizados para el control de plantas invasoras (Pimentel *et al.*, 2005). Los daños ocasionados a la salud y al ambiente por el uso de plaguicidas ha aumentado la preocupación entre la población. Su uso continuo puede contaminar las aguas superficiales y subterráneas e incrementar la erosión del suelo (Casali *et al.*, 1998). Además, el uso continuo de herbicidas mantiene la presión de selección, ya que las plantas susceptibles mueren mientras las plantas que son resistentes al herbicida sobreviven y vuelven a reproducirse sin ninguna competencia por las plantas susceptibles. Estas plantas resistentes dominan la población debido a su exitosa reproducción ya que se mantiene aumentando el número de plantas rápidamente. En el 1970 se reportó el primer caso de resistencia a herbicida en una maleza llamada *Senecio vulgaris*, comúnmente conocida como “senecio común”. Esto sucedió en un invernadero en Washington donde fue demostrada su resistencia a químicos pertenecientes al grupo de las triazinas (Prather *et al.*, 2000).

Entre otras alternativas o medidas para el control de malezas que resultan más amigables con el ser humano y el medio ambiente se encuentra el control biológico. El control biológico de malezas consiste en la utilización de organismos vivos para controlar o reducir la población de especies de plantas indeseables (Yang *et al.*, 2000). Esta medida ha ganado gran aceptación ya que ha resultado ser un método seguro y ambientalmente beneficioso por décadas (Chutia *et al.*, 2007). Una de las estrategias utilizadas en el control biológico es la inundativa. Los bioherbicida son utilizados para el control de malezas invasoras con patógenos nativos, aplicando dosis masivas del inóculo en el área infectada. El uso de bioherbicida ofrece muchas ventajas como: alto grado de especificidad a la maleza de interés, ya que no tiene efecto en otros

organismos que no son de interés, ausencia de desarrollo de resistencia de las malezas y de acumulación de residuos en el medio ambiente (Menaria, 2007). Actualmente, uno de los bioherbicidas registrados, DeVine® utiliza *Phytophthora palmivora* para controlar *Morrenia odorata* en cítricos en Florida (Charudattan, 2005).

En el 2001 en Korea, aislaron *Colletotrichum graminicola* de: *Echinochloa crus-galli* var. *caudata* y *E. crus-galli* var. *praticola* conocida como “Barnyard grass” (Yang *et al.*, 2000). El hongo fue evaluado como un potencial agente biocontrolador. La severidad de la enfermedad aumentó con el aumento de la densidad del inóculo. *Oryza sativa* no presentó síntomas al momento de la inoculación.

Menaria en el 2007, menciona que Collego® (*Colletotrichum gleosporides* f. sp. *Aeschynemone*) fue desarrollado como un bioherbicida registrado comercialmente para controlar *Aeschynemone virginica* una maleza encontrada en campos de arroz y soya. Este bioherbicida esta formulado en polvo seco que contiene 15% de esporas (conidias) de *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynemone* como ingrediente activo. El mismo contiene una vida útil de 18 meses. Debido al desarrollo exitoso de Collego® fue descubierto otro micoherbicida basado en *Colletotrichum* llamado Biomal®. Biomal® es utilizado para el control de la maleza *Malva pusila* conocida como “round leaved mallow” (la malva de hoja redonda) en Canadá y los Estados Unidos.

Otra de las alternativas utilizadas para controlar las malezas es su uso como alimento en pequeños rumiantes. El uso de caprinos (*Capra hircus*) como mecanismo para combatir la vegetación no deseada y que no puede ser utilizada efectivamente por otras especies ha sido evaluado exitosamente (Luginbuhl y Pietrosevoli Castagni,

2007). La utilización de animales para pastoreo puede minimizar la propagación de malezas y controlar grandes infestaciones. Los rumiantes como los vacunos, ovinos y caprinos son los animales más comunes que se utilizan para pastoreo como herramienta de manejo de malezas. Sin embargo, los caprinos pueden controlar un gran número de especies de malezas espinosas y punzantes que los vacunos y los ovinos no pueden (Curran y Lingenfelter, 2001). Un estudio realizado en Carolina del Norte donde se utilizaron caprinos y vacunos en pastoreo, encontró que la población de malezas se redujo y que las especies forrajeras deseables aumentaron con el tiempo. También se ha utilizado caprinos exitosamente para el control de malezas en general en terrenos agrícolas abandonados en Vermont (Curran y Lingenfelter, 2001).

La actividad ganadera de Cuba sufre de la invasión del marabú (*Dichrostachys cinerea*) en más del 40% de sus áreas (Reyes *et al.*, 2007). Esta leguminosa proteica es considerada la especie más agresiva e invasora de los pastizales en dicho país. Este trabajo tuvo como objetivo el control del marabú con métodos biológicos utilizando caprinos, ovinos y vacunos en áreas infestadas. Reyes *et al.* (2007) indicaron que el marabú se puede controlar biológicamente con el uso de caprinos, ovinos y vacunos. Además que los caprinos y vacunos que ingirieron el marabú obtuvieron un incremento en la producción de leche al día. Igualmente Shannon en el 2003, demostró que el uso de caprinos puede ser efectivo para el manejo de *Centaurea malucosa* mejor conocida como “spotted knapweed”. El uso de pequeños rumiantes para el pastoreo de *Centaurea malucosa* reduce la capacidad de la planta para competir con otras plantas alrededor.

Hyparrhenia rufa está entre las malezas que mayormente se encuentran en las fincas de ganado en Costa Rica. Esta es utilizada como forraje pero debido a su

disminución en el contenido de proteína cruda durante el periodo seco necesita de la suplementación. Ibrahim *et al.* (2001), indicó que aumentó el consumo de *H. rufa* al suplementar con la leguminosa tropical, *Cratylia argentea*. En Etiopía, estudios demostraron que es importante la suplementación para cumplir con los requerimientos de proteína bruta en caprinos bajo pastoreo con *H. rufa* (Betsha y Melaku, 2009). Esto compara con lo encontrado por Luginbuhl y Pietrosevoli Castagni (2007). Los autores evaluaron la digestibilidad y el balance de nitrógeno en cabras de Somalia suplementadas con maní y afrecho de trigo a diferentes niveles en animales alimentados con *H. rufa* como heno. Se encontró que al aumentar los niveles de suplementación se promovió el consumo y la digestibilidad de la materia seca, proteína cruda y la retención de nitrógeno en cabras de Somalia alimentadas con heno de *H. rufa*.

**CAPITULO 1. IDENTIFICACIÓN Y PATOGENICIDAD DE HONGOS CON
POTENCIAL PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE *Hyparrhenia rufa***

INTRODUCCIÓN

La utilización de herbicidas químicos para el control de malezas en la agricultura ha sido una herramienta esencial para la realización de las labores en la industria. Sin embargo, el uso de herbicidas puede crear efectos adversos en el medio ambiente como: contaminación del agua subterránea y superficial, residuos en los alimentos (Wei *et al.*, 2010), acidificación del suelo, y daños al ser humano entre otros (Pimentel, 2005). Buscando una alternativa más amigable con el ambiente para el manejo de malezas se ha impulsado la utilización de métodos de control biológicos. El enfoque del control biológico es el uso de enemigos naturales para suprimir el crecimiento o reducir la población de diferentes especies de malezas. El uso de patógenos de plantas para el control de malezas ha recibido un aumento de interés en las últimas tres décadas. Existen dos maneras de llevar a cabo un manejo de malezas utilizando patógenos de plantas: control biológico inoculativo y bioherbicida. El control inoculativo también conocido como control biológico clásico es el que introduce organismos exóticos como patógenos de una maleza específica mientras que el bioherbicida es el que aísla los patógenos presentes en la maleza para cultivarlos en grandes cantidades y aplicarlos como un herbicida (Chutia *et al.*, 2007).

Hyparrhenia rufa es una maleza que ha invadido gran terrenos en Puerto Rico al igual que los estados de Florida y Hawaii. La misma se ha convertido en un serio problema para los agricultores que se dedican a la producción de forrajes. Esta maleza es bien agresiva ya que compite por nutrientes y por espacio desplazando otras gramíneas de importancia. Según información que presenta la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nation) *Hyparrhenia rufa* es una planta resistente a enfermedades ya que no se han reportado patógenos hasta el momento.

Por consiguiente este estudio pretendió identificar hongos patógenos de la maleza para luego ser evaluados en condiciones de laboratorio e invernadero. Una vez logrado el inóculo en cantidades suficientes, se evaluó su potencial en condiciones de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Estudiar e identificar hongos patógenos de *H. rufa* en la Estación Experimental Agrícola en Lajas, P.R.

1.1.1 Evaluación del área

El estudio se realizó en un área con alta ocurrencia de *H. rufa* en la Subestación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico localizada en Lajas, P.R. La Subestación Experimental Agrícola de Lajas se encuentra ubicada en la región semiárida del suroeste de Puerto Rico en la Carretera 101 Km. 8.5, en el Barrio Sabana Yeguas (N 18° 0.1092 y W 67° 04.126). El suelo presente en el estudio pertenece a la serie fraternidad del Orden Vertisol. Los suelos vertisoles son aquellos donde predomina la arcilla, lo que resulta en una alta retención de agua y baja conductividad hidráulica. Sin embargo son clasificado como un suelo fértil con una grandiosa capacidad de intercambio catiónico (Román y Sotomayor, 2004).

Se examinaron diferentes órganos de la maleza invasora y se colectó tejido foliar con síntomas de patógenos. Las muestras colectadas fueron colocadas en bolsas plásticas y llevadas en nevera al laboratorio de Fitopatología del Departamento de Ciencias y Cultivos Agroambientales de la Universidad de Puerto Rico – Recinto de Mayagüez, donde fueron procesadas.

1.1.2 Aislamiento e identificación de hongos asociados a *Hyparrhenia rufa*

Los hongos fueron aislados de áreas sintomáticas de las hojas de la planta. Se describieron los síntomas y de cada tipo de síntoma se realizaron cinco cortes de aproximadamente 0.3 cm del margen de las lesiones. Las secciones del tejido fueron desinfectadas superficialmente con alcohol etílico al 70%, luego con hipoclorito de sodio (cloro comercial) al 5.25% y finalmente lavados con agua destilada estéril (cada tratamiento por un minuto). Los tejidos desinfectados fueron transferidos al medio de cultivo de agar de papa y dextrosa acidulado (PDA ac). Las placas se incubaron a 27°C y después de cuatro días, las colonias fueron purificadas e identificadas por medio de claves taxonómicas (Barnet y Hunter, 1998). Para confirmar su identificación se enviaron al CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre (Centraalbureau voor Schimmelcultures) en Holanda.

1.2 Evaluación de la virulencia de los hongos aislados a través de pruebas de patogenicidad en condiciones de laboratorio, invernadero y campo.

1.2.1 Preparación de inóculo

Las especies de hongos obtenidos del aislamiento descrito anteriormente (*Curvularia* sp., *Sphaeropsis* sp., *Fusarium* sp. y *Phoma* sp.) fueron crecidos en medio de cultivo de agar de papa y dextrosa acidulado a 27°C de 21 a 42 días para su esporulación. Se cortaron discos de agar de micelio de un diámetro de 2 mm de cada hongo para realizar las pruebas de patogenicidad.

1.2.2 Prueba de patogenicidad en condiciones de laboratorio e invernadero

Se seleccionaron plantas del campo asintomáticas en dos diferentes alturas: plantas jóvenes (entre 60.96 y 91.44 cm de altura) y plantas adultas (121.92 y 195.07 cm) para luego ser transportadas al laboratorio. Se cortaron hojas de las plantas jóvenes y adultas que luego fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio (cloro comercial) al 5.25% por un minuto y lavadas con agua destilada estéril. Las hojas desinfectadas fueron cubiertas en papel toalla estéril para remover el exceso de agua y se dejaron secar por aproximadamente 10 minutos. Para las cámaras húmedas se utilizaron cajas de plástico de 85 x 40 x 10 cm. En estas cajas previamente desinfectadas se colocaron papel toalla estéril y encima 6 platos Petri (100 x 35 cm). Las dos hojas de las plantas jóvenes y dos hojas de plantas adultas fueron ubicadas sobre los platos Petri e impedir el contacto directo con el papel humedecido. Se seleccionaron dos hojas jóvenes para las pruebas de patogenicidad una con incisión y otra sin incisión. El mismo procedimiento fue repetido para las hojas adultas. El papel toalla fue humedecido con agua des-ionizada destilada estéril. Por último, se inoculó el tejido vegetal con discos de agar de micelio de 2 mm de diámetro de cada hongo a evaluar. De la misma manera se realizó la prueba control colocando un disco de agar (PDA ac). Las pruebas se mantuvieron en el laboratorio por 8 días.

La inoculación descrita anteriormente se repitió en 30 plantas jóvenes en condiciones de invernadero (Figura 1) durante el mes de marzo de 2011. Las plantas de *H. rufa* utilizadas tenían una altura entre 91.22 y 152.4 cm. Las mismas estaban sembradas en tiestos plásticos de polietileno de 18 cm de alto y 19.5 cm de diámetro

utilizando el Pro-mix® como sustrato. El riego se realizó cada dos días y se le aplicó fertilizante (20-20-20) cada dos semanas.

Para cada tratamiento o especie de hongo a inocular se utilizaron 6 plantas de *H. rufa*, igualmente para el tratamiento control. Se tomaron dos hojas de cada planta, una para la prueba con incisión y otra sin incisión. A las hojas inoculadas se les colocaron bolsas plásticas con un algodón humedecido con agua destilada estéril. Se tomaron datos de la sintomatología observada y medidas del largo de la lesión.



Figura 1. Vista general de la prueba de patogenicidad realizada en invernadero ubicado en la Universidad de Puerto Rico-Recinto de Mayagüez.

1.2.3 Prueba de patogenicidad en condiciones de campo

El estudio fue llevado a cabo en las facilidades de la Estación Experimental Agrícola localizada en Lajas. Se realizaron dos ensayos uno durante la época lluviosa en agosto del 2011 y otra en época seca en diciembre de 2011. Los datos de temperatura y precipitación de la estación fueron recopilados de la página en Internet de NOAA (National Oceanic Atmospheric Administration, 2012). El diseño utilizado fue el de bloques completos al azar. Los bloques se repetían 3 veces y cada uno tenía 5 parcelas que equivale a los 4 tratamientos y el control para un total de 15 parcelas (3 parcelas por cada tratamiento). El tamaño de las parcelas utilizadas fue 3.66 x 3.66 metros. Las parcelas estaban separadas por pasillos de 6.07 metros de distancia. La altura de las plantas durante la aplicación en la época lluviosa fluctuó entre 1.83 y 3.96 metros, mientras que durante la segunda aplicación en la época seca su altura fluctuó entre 0.92 y 3.96 metros.

Se evaluaron los siguientes hongos en condiciones de campo: *Curvularia* sp., *Sphaeropsis* sp., *Fusarium* sp. y *Phoma* sp. Para preparar el inóculo de cada especie de hongo a evaluar se utilizó agar de papa y dextrosa acidulado. Los hongos se incubaron por 21 días. Luego se realizó un raspado el cual se suspendió en agua destilada estéril. La suspensión de conidias final fue homogenizada en la licuadora y ajustada utilizando un hemacitómetro hasta lograr una concentración final de 10^6 conidias/ml. Cada suspensión fue transportada en botellas de polipropileno (Nalgene®) de una capacidad de 2 galones cada uno. *Sphaeropsis* sp. y *Phoma* sp. no produjeron conidias al momento de la preparación del inóculo bajo condiciones de laboratorio, por lo que, el inóculo utilizado fue una suspensión micelial. Ambas inoculaciones fueron realizadas con un sistema de asperjar utilizando tanques de CO₂

ajustado a una presión constante de 40 PSI (2.81 kg/cm²). Este tanque de CO₂ estaba conectado a un cilindro de acero inoxidable (Figuras 2 y 3) de tres galones (R & D Sprayers, Modelo 107-BG). La pistola rociadora (Valley Industries, Modelo SG-2200 “Flash” Turbo Spray Gun) con una boquilla de 1.8 mm utilizada para asperjar fue calibrada para aplicar 48 ml de bioherbicida por segundo. Cada aplicación por parcela tuvo una duración de 60 segundos. Las aplicaciones fueron realizadas en horas de la tarde cuando la intensidad de los rayos de sol había bajado.

Se tomaron datos de la sintomatología observada y del largo de la lesión a los 7, 14 y 21 días después de la inoculación para determinar la severidad de los tratamientos. Estos datos se tomaron en cinco puntos de la parcela siguiendo la forma de una X. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con el programa Infostat® (2009) mediante pruebas de ANOVA y de LSD para detectar alguna diferencia mínima significativa entre los tratamientos. Además se utilizó una escala de severidad que fluctuó de 1 a 4, donde 1 correspondía a una severidad de 0 a 25%; 2 de 26 a 50%; 3 de 51 a 75% y 4 de 76 a 100%. Por último, se colectaron muestras de tejido en bolsas plásticas para re-aislar los hongos inoculados en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Ciencias y Cultivos Agroambientales y de esta forma completar los postulados de Koch.



Figura 2. Vista general de los predios de *Hyparrhenia rufa* ubicados en la Estación Experimental Agrícola en Lajas, P.R.

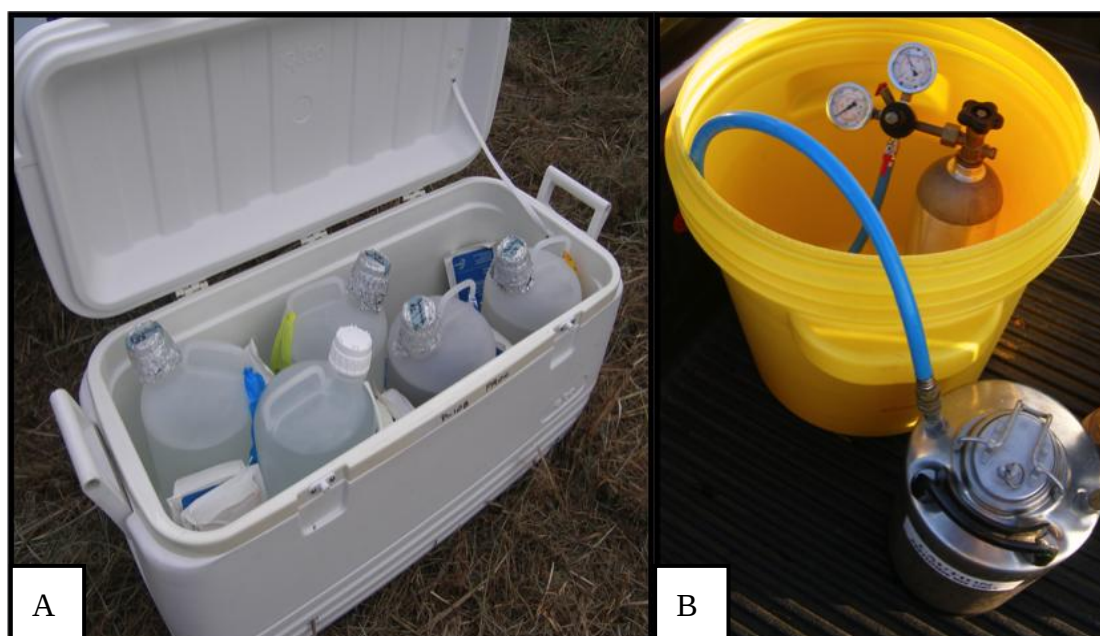


Figura 3. (A) Inóculo de cada uno de los tratamientos a evaluar y (B) tanque de CO₂ y cilindro utilizado para la aplicación del inóculo en el ensayo de campo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.1 Estudiar e identificar hongos patógenos de *H. rufa* en la Estación Experimental Agrícola en Lajas, P.R.

1.1.1 Evaluación del área

Al evaluar las plantas *H. rufa* en condiciones naturales se observaron síntomas indicativos de alguna enfermedad. Estas plantas presentaban el 50% del tejido deteriorado con síntomas tales como: necrosis, clorosis y marchitez de la punta de las hojas. Las lesiones localizadas en el tallo y el área foliar tenían una coloración marrón-rojizo con una apariencia seca. Otras lesiones observadas eran longitudinales, de color anaranjado-rojizo en el margen de la hoja y lesiones alargadas con forma irregular oscuras en el centro. Además se observó marchitez en las inflorescencias de la planta.

Chandramohan y Charudattan en el 2001, reportaron que aunque no son bioherbicidas comercialmente disponibles se ha reportado los siguientes hongos patógenos como potenciales controladores biológicos en sus respectivas malezas hospederas: *Sporisorium holci*, *Exserohilum turcicum*, *Colletotrichum graminicola*, *Gleocercospora sorghi* y *Bipolaris halepense* en *Sorghum halepense* (“Johnson grass”) comúnmente conocida como hierba Johnson; *Bipolaris setariae* y *Pyricularia grisea* para *Eleusine indica* conocida comúnmente como pata de gallina (“Goosegrass”). Chutia en el 2007 menciona que los patógenos *Cylindrobasidium leave* y *Chondrostereum purpureum* han sido registrado como bioherbicidas que están

disponibles comercialmente. *Alternaria destruens* ha sido registrado recientemente según este autor.

1.1.2 Aislamiento e identificación de hongos asociados a *Hyparrhenia rufa*

Luego de procesar las muestras se obtuvieron cuatro aislados de hongos provenientes del área foliar: *Curvularia* sp., *Sphaeropsis* sp., *Fusarium* sp. y *Phoma sorghina*. En medio de PDA ac. las colonias de *Curvularia* sp. presentaban abundante micelio septado de color marrón oscuro a negro. Se identificó por sus conidióforos simples con sus conidias oscuras, curvadas y septadas (Figura 4A y B). *Sphaeropsis* sp. produjo una colonia blanca con poco micelio de crecimiento lento y de forma superficial en la placa. Este aislado bajo el microscopio presentaba micelio septado de color marrón oscuro. Además, presentaba picnidios errumpentes, separados, de color negro y conidias ovaladas de color marrón oscuro (Figura 4C y D). El tercer aislado, *Fusarium* sp. produjo una colonia algodonosa y abundante de color crema con un matiz rosado claro. El aislado presentaba un color marrón claro por el reverso de la placa. Sus conidias son multicelulares hialinas en forma típica de canoa (Figura 4E y 4F). La colonia de *P. sorghina* en PDA ac. es muy variable ya que presenta colores de blanco a gris hasta producir un color rosado en el centro de la colonia, al reverso el crecimiento se apreciaba en forma de anillos concéntricos que tenían diferentes tonalidades hasta llegar al rosa intenso en el centro. Éste produjo picnidios errumpentes, globosos, de color marrón oscuro y conidias ovoides, hialinas, pequeñas (Figura 4G y H).

Curvularia es causante de manchas en las hojas y afecta a muchas especies de gramíneas en el mundo (Huang *et al.*, 2004). El género *Fusarium* spp. comprende una serie de especies patogénicas que atacan a un amplio rango de plantas de importancia económica incluyendo el maíz, caña de azúcar, sorgo, trigo y arroz causando un daño económico significativo (Tesso *et al.*, 2010). Perelló *et al.* (2005) menciona que *P. sorghina* es un patógeno común en áreas tropicales y subtropicales causando enfermedades en cereales y otras gramíneas y cultivos para forraje. Esto concuerda con Pazoutová en el 2009 quien explica que *P. sorghina* es un hongo patógeno que tiene preferencias por las gramíneas. Además dice que junto con *Alternaria tenuissima*, *Curvularia lunata* y *Fusarium* spp. pueden causar moho del grano de sorgo. Venkatasubbaiah *et al.* (1992) reportó que en su búsqueda de especies para el control biológico de malezas, aislaron *P. sorghina* de manchas en las hojas de la maleza *Phytolacca americana* L. conocida como comúnmente en español como hierba carmín (“pokeweed”). Los reportes mencionados anteriormente muestran que los hongos encontrados en *H. rufa* son capaces de causar daños significativos en otras gramíneas o malezas de importancia siendo agentes potenciales de control.

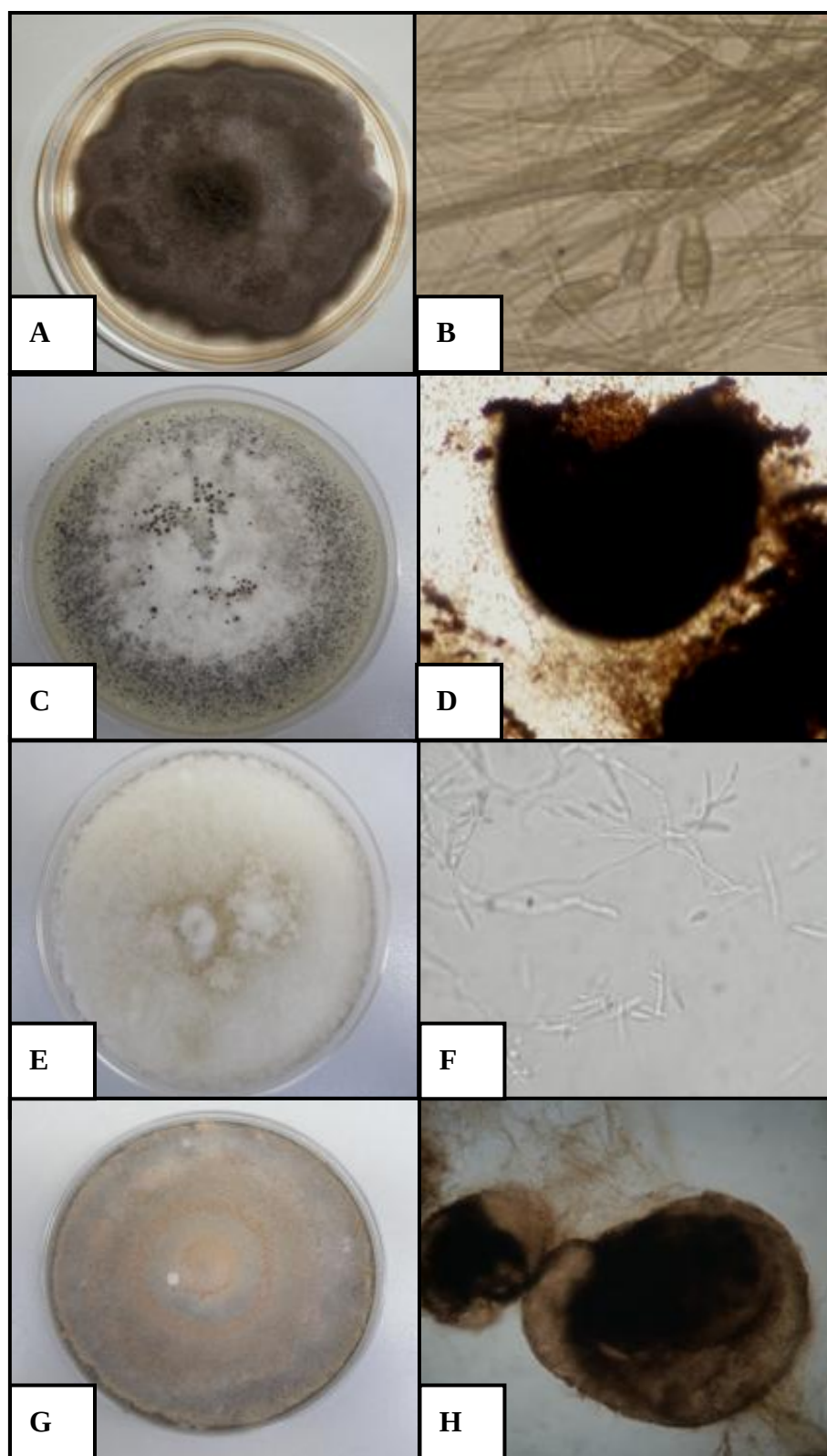


Figura 4. Hongos aislados de *Hyparrhenia rufa*: Colonia (A) y conidias (B) de *Curvularia* sp.; Colonia (C) y picnidio con conidias (D) de *Sphaeropsis* sp.; Colonia (E) y conidias (F) de *Fusarium* sp.; y Colonia (G) y picnidio con conidias de *Phoma sorghina*. Todos los hongos fueron crecidos en agar de papa y dextrosa acidulado (Objetivo 40 X).

1.2 Evaluación de la virulencia de los hongos aislados a través de pruebas de patogenicidad en condiciones de laboratorio, invernadero y campo.

1.2.1 Prueba de patogenicidad en condiciones de laboratorio e invernadero

Al realizar las pruebas de patogenicidad en condiciones de laboratorio se observó que los tratamientos con *Curvularia* sp., *Sphaeropsis* sp., *Fusarium* sp. y *P. sorghina* causaron lesiones foliares en las pruebas realizadas con herida en comparación al grupo control. En la prueba sin herida sólo el tratamiento de *Sphaeropsis* sp. produjo lesiones en las hojas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Severidad de los hongos evaluados en plantas de *Hyparrhenia rufa* durante las pruebas de patogenicidad en condiciones de laboratorio.

Pruebas <i>in-vitro</i> ¹		
Tratamiento	Con incisión	Sin incisión
Control	-	-
<i>Curvularia</i> sp.	+	-
<i>Sphaeropsis</i> sp.	+	+
<i>Fusarium</i> sp.	+	-
<i>Phoma sorghina</i>	+	-

¹ Lesiones foliares (+); No se observaron lesiones foliares (-)

Durante la prueba de patogenicidad en condiciones de invernadero, todos los hongos evaluados fueron patogénicos produciendo lesiones foliares en las 6 plantas inoculadas en pruebas con y sin incisión en comparación con el grupo control. Éste no presentó síntomas (Cuadro 2). *Phoma sorghina* presentó lesiones en todas las plantas inoculadas para la prueba con incisión a los 7 días después de la inoculación, mientras

que en la prueba sin incisión a los 7 ddi no presentó lesiones. Las lesiones causadas por *Curvularia* sp. fluctúan entre 1.1 a 2.2 cm de largo y 0.6 a 0.9 cm de ancho. Las mismas se caracterizaron por tener forma irregular con necrosis en el centro de la lesión y un halo clorótico en el borde (Figura 7A). *Sphaeropsis* sp. produjo lesiones color crema a marrón con clorosis en el margen de la lesión que medían entre 5.0 a 8.0 cm de largo y 0.5 a 0.7 cm de ancho (Figura 7B). *Fusarium* sp. produjo lesiones longitudinales de color anaranjado-rojizo, en el borde de la hoja que medían entre 0.9 a 1.5 cm de largo y 0.3 a 0.4 cm de ancho (Figura 7C).

Cuadro 2. Severidad de los hongos evaluados en plantas de *Hyparrhenia rufa* durante las pruebas de patogenicidad en condiciones de invernadero a los 7 y 14 días después de la inoculación

Tratamiento	Prueba en invernadero			
	7 ddi ¹		14 ddi	
	Con ²	Sin ³	Con	Sin
Control	-	-	-	-
<i>Curvularia</i> sp.	++	+	+	+
<i>Sphaeropsis</i> sp.	+	+	+++	++
<i>Fusarium</i> sp.	++	+	+	+
<i>Phoma sorghina</i>	+++	-	+++	++

Severidad baja (+); mediana (++); alta (+++); no se observaron síntomas (-); ¹Días después de la inoculación; ²Con incisión; ³Sin incisión.

Por otra parte en el tratamiento con *P. sorghina* no se observaron síntomas a los 7 ddi (días después de la inoculación) en la prueba sin incisión (Figura 5). A los 14 ddi se observaron lesiones redondas con necrosis en el centro de la lesión y un halo clorótico en el borde (Figura 6). Sus lesiones fluctuaron entre 6.0 a 9.0 cm de largo y 0.4 a 0.9 cm de ancho (Figura 7D). Las lesiones aumentaron de tamaño luego de dos semanas después de la inoculación. Comparando el tamaño de las lesiones de acuerdo

al tratamiento, las lesiones más grandes fueron observadas en el tratamiento con *P. sorghina* (2.3 cm) en la prueba con incisión a los 7 ddi. A los 14 ddi fueron producidas por *Phoma* en ambas pruebas (Con y sin incisión) lo que resultó ser el tratamiento más virulento para este estudio. Mientras que las lesiones más pequeñas a los 7 ddi fueron ocasionadas por *Sphaeropsis* sp. y a los 14 ddi en el tratamiento con *Fusarium* sp.

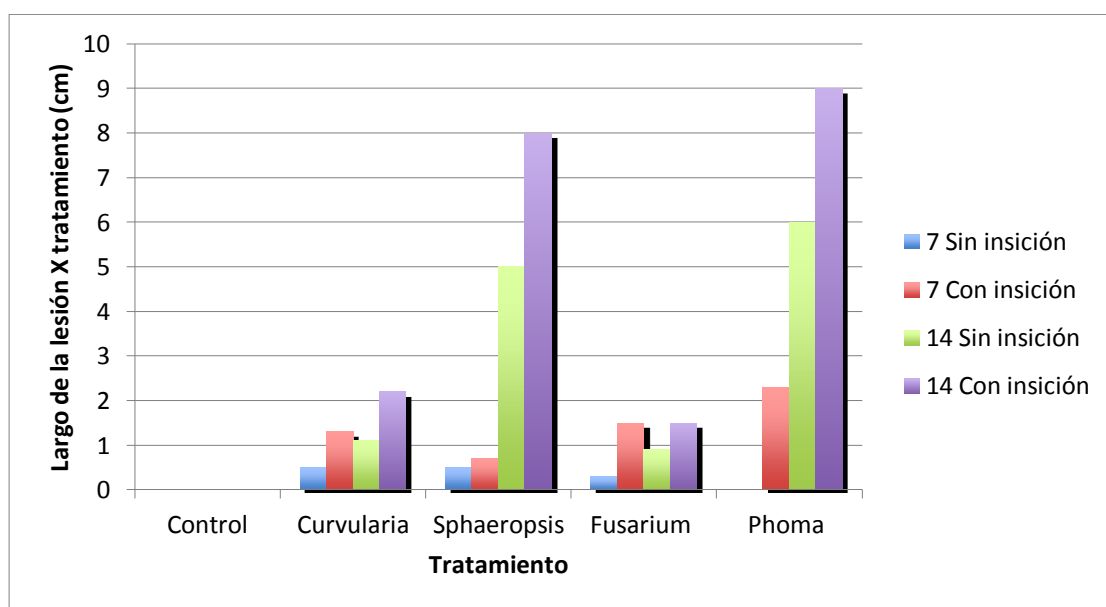


Figura 5. Largo de la lesión (cm) causada por los hongos en condiciones de invernadero a los 7 y 14 días después de la inoculación



Figura 6. Lesiones causadas por *Curvularia* (A), *Sphaeropsis* (B), *Fusarium* (C) y *P. sorghina* (D) en prueba de patogenicidad realizadas en condiciones de invernadero.

1.2.2 Pruebas de patogenicidad en condiciones de campo

1.2.2.1 Primer ensayo experimental

Durante el primer ensayo experimental de la prueba de patogenicidad en condiciones de campo se observaron diferentes síntomas en el área foliar de la planta a los 7 ddi. Los síntomas observados fueron similares a los descritos anteriormente. El tratamiento de *Sphaeropsis* sp. resultó el más virulento en el primer ensayo de campo al presentar lesiones que fluctuaron entre 0.60 a 2.26 de largo y 0.3 a 0.8 cm de ancho (Figura 7). Las lesiones producidas eran ovaladas, de color crema a marrón con margen clorótico.

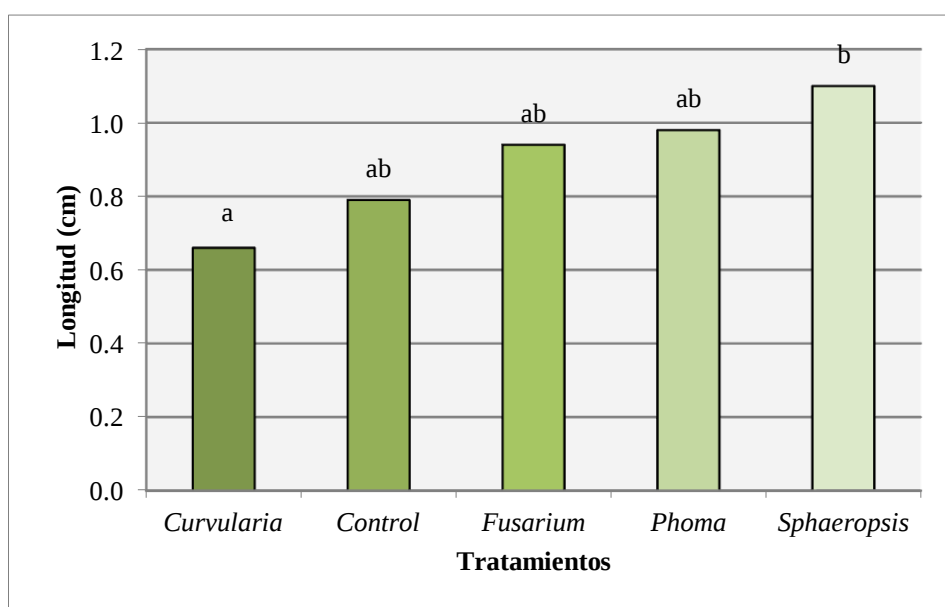


Figura 7. Medidas del largo de las lesiones (cm) en tejido foliar de *Hyparrhenia rufa* causadas por los hongos evaluados durante el mes de agosto de 2011.

El análisis de varianza (ANOVA) demostró que hay diferencias significativas en el largo de las lesiones causadas por los hongos evaluados ($P < 0.05$) en el primer ensayo de campo. Sin embargo, la prueba de LSD detectó diferencias numéricas entre los tratamientos de *Curvularia* sp. y *Sphaeropsis* sp. siendo este último el que mostró

la medidas de las lesiones mayor (1.10 cm) para esta prueba. En el tratamiento control no se encontraron diferencia alguna en comparación con el resto de los tratamientos evaluados.

1.2.2.2 Segundo ensayo experimental

En el segundo ensayo se desarrollaron los mismos síntomas observados durante el primer ensayo. Sin embargo, los tratamientos con *Fusarium* sp. resultaron ser más virulento en tejidos jóvenes de *H. rufa* durante la segunda prueba de campo observándose lesiones que fluctuaron entre 0.30 a 14.80 cm de largo y 0.6 a 0.8 de ancho. En este tratamiento se desarrollaron lesiones alargadas en el margen de la hoja de color anaranjado-rojizo. En algunas plantas las lesiones se extendieron por todo el margen de la hoja hasta la punta.

Phoma sorghina produjo lesiones que fluctuaron entre 0.30 a 3.70 cm de largo y 0.2 a 0.8 cm de ancho. Estas eran redondeadas a irregulares con el centro de color blanco a crema y con un margen rojizo con clorosis alrededor. Este fue el segundo tratamiento más virulento tanto en el primer como en el segundo ensayo de campo. *Curvularia* sp. produjo lesiones finas y alargadas con un halo clorótico. Éstas eran de color negro y fluctuaron entre 0.30 a 1.40 cm de largo y 0.1 a 0.3 de ancho (Figura 9). Además estas lesiones resultaron ser de menor tamaño en comparación a las desarrolladas por los otros hongos evaluados. Este fue el aislado menos virulento en ambas pruebas de patogenicidad realizadas en condiciones de campo. A partir de los 14 y 21 ddi se observó un aumento en el largo de las lesiones en todos los tratamientos evaluados (Figura 7 y 9). Al hacer un estimado visual de daño en la

prueba de campo este fue de un 0 a 25%. Por último, se completaron los postulados de Koch al re-aislar los hongos inoculados.



Figura 8. Lesiones causadas por los diferentes hongos evaluados en tejido foliar de *Hyparrhenia rufa*: *Fusarium* sp. (A), *Sphaeropsis* sp. (B), *Curvularia* sp. (C) y *Phoma sorghina* (D).

Para el segundo ensayo el análisis de ANOVA detectó diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos, siendo *Fusarium* sp. el más virulento (19.63 cm) según la prueba de LSD.

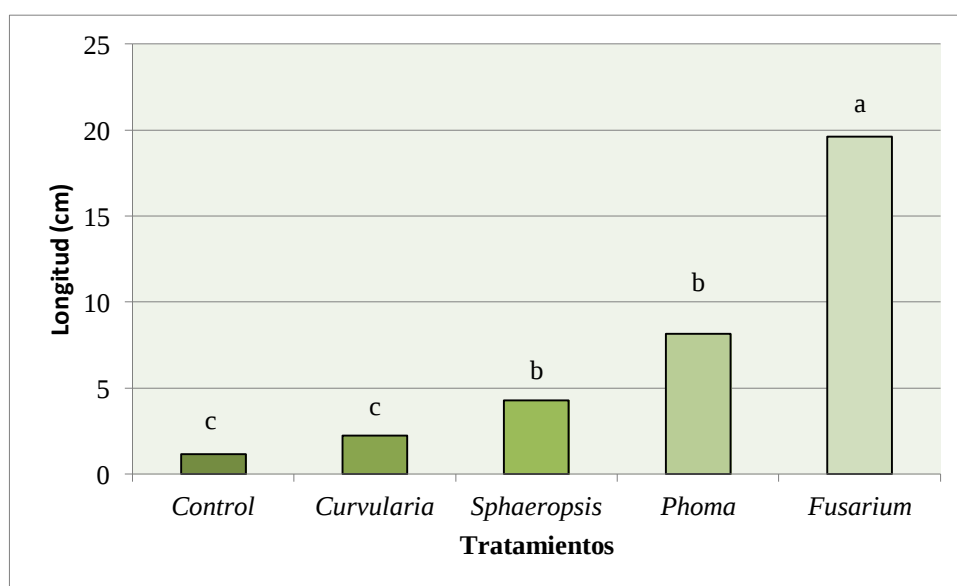


Figura 9. Medidas del largo de la lesión (cm) en tejido foliar de *Hyparrhenia rufa* causada por los hongos evaluados durante el mes de diciembre 2011.

Al comparar los datos obtenidos, observamos la eficacia de los tratamientos efectuados en tejidos jóvenes de *H. rufa* en relación a las etapas maduras de la planta. Siendo la edad o etapa de la planta un factor importante a considerar al realizar aplicaciones de los hongos con potencial de control biológico ya que se observó un aumento significativo en el tamaño de las lesiones. Coleman en el 1986, menciona que los patógenos de plantas y su reproducción están relacionado a la anatomía, bioquímica y cualidades fisiológicas de su planta hospedera. Dichas propiedades son las responsables de la susceptibilidad de la planta a estrés biótico y abiótico. Es ampliamente reconocido que la edad de la planta hospedera es un factor clave en las epidemias o propagación es decir la dispersión de los patógenos (Agrios, 2005).

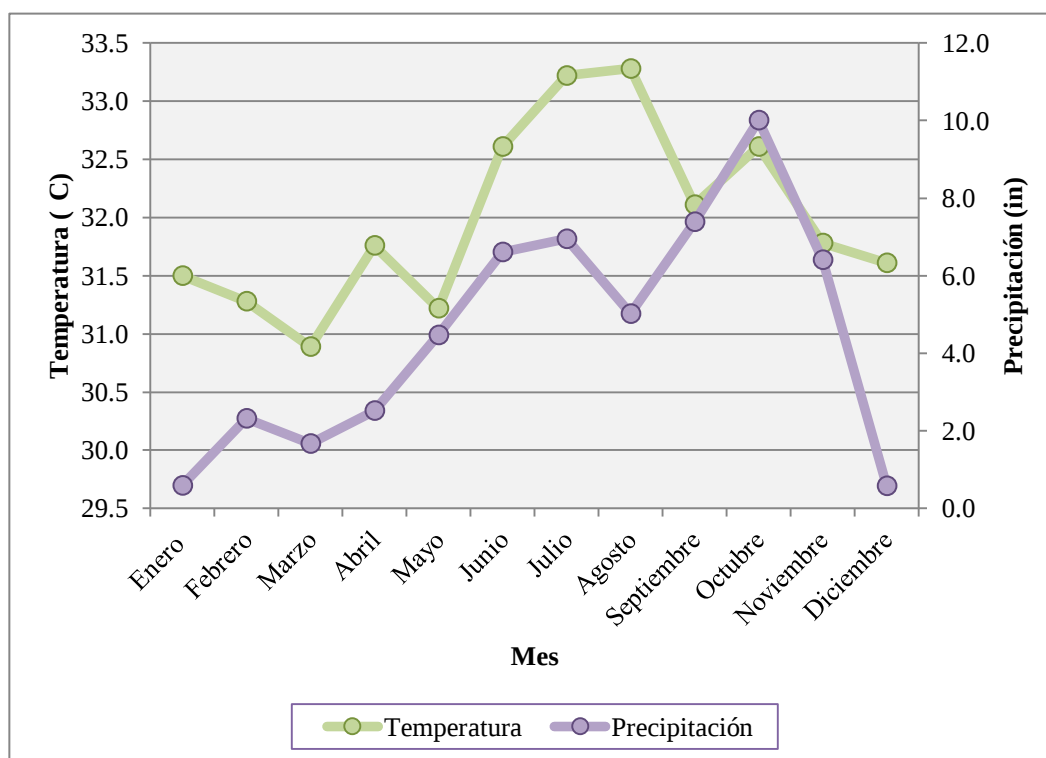


Figura 10. Datos de temperatura y precipitación promedio a través del año 2011 en la EEA-Lajas.

Un factor importante en el desarrollo de enfermedades en plantas es la temperatura, ya que existen patógenos que difieren en su preferencia por altas o bajas temperaturas (Agrios, 2005). Algunos patógenos son capaces de crecer mucho más rápido a bajas temperaturas que otros o vice versa. La temperatura también puede afectar el número de esporas que pueden llegar a formarse por área en la planta y el número de esporas que se liberan en un periodo de tiempo. Muchas enfermedades en climas templados se desarrollan mejor en áreas, temporadas o años con temperaturas más bajas. La diferencia en la temperatura promedio (Figura 10) reportada en el primer ensayo en el mes de agosto (33.28 °C) y entre el segundo (31.61 °C) en el año 2011 en la EEA-Lajas fue un factor determinante en la longitud de las lesiones de cada uno de los tratamientos.

En la Universidad de Florida, se realizó un estudio para aislar e identificar hongos patógenos de gramíneas enfermas cuales y evaluar la eficacia de estos patógenos como bioherbicidas individualmente y preparando un mezcla de éstos (Chandramohan y Charudattan, 2001). Los autores comentan que es preferible combinar más de un patógeno con diferentes modos de acción para lograr un amplio espectro de control de las malezas y reducir de resistencia por parte de la planta.

CONCLUSIONES

1. Se identificó a *Curvularia* sp., *Sphaeropsis* sp., *Fusarium* sp. y *Phoma sorghina* como patógenos de *H. rufa*.
2. En las pruebas de patogenicidad en condiciones de laboratorio, *Sphaeropsis* sp. resultó ser el más virulento al producir síntomas en la pruebas con y sin incisión.
3. En condiciones de invernadero, las lesiones causadas por los diferentes hongos evaluados fueron mayores en los tratamientos con herida (0.7 a 2.3 cm).
4. *Phoma sorghina* resultó ser el más virulento ocasionando las lesiones más alargadas (6 y 9 cm respectivamente) a los 7 y 14 días en condiciones de invernadero.
5. Mientras que *Sphaeropsis* sp. (1.10 cm) resultó ser el más virulento según las diferencias numéricas detectadas por la prueba de LSD en el primer ensayo de campo. Para el segundo ensayo de campo *Fusarium* sp. (19.63 cm) resultó el más virulento según los análisis estadísticos presentó las lesiones más grandes.
6. El estimado visual de daño en la prueba de campo fue de 25% para *Fusarium* sp. y *Phoma sorghina*.

CAPITULO 2. CONTENIDO DE NUTRIENTES Y UTILIZACIÓN DE
Hyparrhenia rufa EN DIETAS PARA GANADO CAPRINO

INTRODUCCIÓN

En Puerto Rico al igual que otros países de América Central y el Caribe la industria pecuaria enfrenta dificultades con la disponibilidad de los forrajes mayormente durante la época seca. Los productores pecuarios dependen del uso de heno de gramíneas naturalizadas (Mezcla de hierba Guinea, Pangola, Buffel, Pajón) generalmente de baja calidad. La búsqueda de otras fuentes forrajeras representa una necesidad importante entre los productores pecuarios. Actualmente, la gramínea *Hyparrhenia rufa* es considerada una maleza invasora ya que la misma compite por espacio, nutrientes o luz con otras gramíneas de importancia para los productores de forraje (Curran y Lingenfelter, 2001). Se ha reportado el uso de caprinos para el control de vegetación indeseable esto debido a la preocupación por el medio ambiente y los altos costos de los herbicidas (Luginbuhl y Pietrosemoli Castagni, 2007). En países de Centro y Sur América se cultiva y se utiliza como pasto ya sea de forma fresca (Pastoreo) o conservada (heno). La producción de heno de *H. rufa* y su utilización en dietas para ganado productor de leche, vacunos para carne o pequeños rumiantes podría representar una alternativa ante la escasez de forraje durante la época seca. Sin embargo, para su posible uso como heno es necesario determinar su presencia y variación en el contenido de nutrientes a través del año de esta especie invasora. Además, su inclusión en dietas para ganado caprino basadas en heno de gramíneas tropicales debe ser evaluada.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Monitorear la presencia de la maleza *Hyparrhenia rufa* en la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico en Lajas.

2.1.1 Inspección y monitoreo



Figura 11. Localización del área de estudio en la Estación Experimental Agrícola en Lajas (Google Maps, 2012).

En este ensayo se evaluaron tres áreas de la Subestación Experimental Agrícola en Lajas para monitorear si en efecto se encontraba presente la planta invasora *H. rufa* y durante que época del año. El área esta localizada en la latitud N $18^{\circ} 0.1092$ y longitud W $67^{\circ} 04.126$ (Figura 11). El ensayo se realizó durante doce meses que comprende desde diciembre de 2009 hasta noviembre de 2010. Para monitorear la presencia de la planta se colectaron mensualmente cuatro plantas en tres predios diferentes del área demarcada en la Estación Experimental Agrícola, para un total de doce muestreos. El material vegetativo recolectado mensualmente fue

utilizado para determinar el contenido de materia seca (65°C/48hr). Las muestras secas fueron posteriormente analizadas en un laboratorio comercial (Dairy One Forage Lab, Ithaca, New York) para determinar el contenido de materia orgánica (MO), materia inorgánica (MI), proteína bruta (PB), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácida (FDA), hemicelulosa (HC) y lignina (LIG).

2.2 Consumo voluntario y digestibilidad de nutrientes de *H. rufa* utilizando caprinos adultos.

2.2.1 Prueba de selectividad

Se evaluó la selectividad de *H. rufa* en dos estados: fresco y henificada (secada al sol por 4 días) por ganado caprino. El material vegetativo fue cosechado manualmente en diciembre 2009 en la EEA-Lajas. La misma se encontraba en etapa de florecida a una altura aproximadamente de 1.83 metros. Este ensayo se realizó mediante dos pruebas de cafetería el cual es una prueba que evalúa la selectividad de los animales por un alimento en un periodo de tiempo corto. En estas pruebas se utilizaron 12 caprinos con un peso entre 20.41 a 79.38 Kg (45-175 libras). Las dos pruebas fueron de una duración de 30 minutos en la cual mediante una escala cuantitativa se observó en intervalos de cinco minutos la selectividad de los dos estados de la *H. rufa* por parte de los caprinos. En cada una de las pruebas se utilizaron 9.07 kg (20 lbs) de cada forraje en comederos de metal colocados a una distancia de 2 m en el área de estudio. Luego los animales fueron movidos al área y se observó el comportamiento selectivo en base al número de caprinos que consumieron el alimento. Para cuantificar los niveles de selección según el número de animales, el intervalo de tiempo y el estado del forraje se utilizó una escala con cuatro niveles: no consumo (0 animales), bajo consumo (1-4 animales), mediano consumo (5-8

animales) y alto consumo (9-12 animales). Al final de la prueba se tomó el peso del alimento no consumido para determinar el consumo total de cada uno de los alimentos ofrecidos.

2.2.2 Inclusión de *H. rufa* en dietas para ganado caprino; consumo voluntario y digestibilidad de la materia seca, proteína bruta y fibra detergente neutro

El ensayo fue realizado en las facilidades del proyecto de pequeños rumiantes localizado en la Finca Alzamora de la Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez. La *H. rufa* henificada se obtuvo de plantas silvestres encontradas en la Estación Experimental en Lajas. La misma fue cosechada para el mes de diciembre de 2010 y luego se dejó al sol durante 4 días para ser secada. Se utilizaron ocho ejemplares caprinos que se confinaron con bolsas recolectoras de heces en corrales individuales provistos de comederos y bebederos. El ensayo consistió de dos periodos experimentales con una duración de doce días (siete días de adaptación a la dieta y cinco días de recolección de datos) por periodo. Antes del primer periodo los animales fueron dejados nueve días adicionales para la adaptación a la jaula y a la bolsa recolectora de heces. Las dietas se ofrecieron al 3% del peso vivo del animal en base seca. En el primer periodo se ofreció el tratamiento de 100% heno de gramíneas tropicales (T_1) a la mitad de los animales (Grupo 1) y a la otra mitad de los animales (Grupo 2) se le ofreció 80% de heno de gramíneas tropicales y 20% heno de *H. rufa* (T_2). Durante el periodo de recolección de datos se cuantificó la cantidad de alimento ofrecido y rechazado y las heces para determinar el consumo voluntario y digestibilidad de la materia seca, proteína bruta y fibra detergente neutro de las dietas. La determinación de materia seca de las muestras se realizó en las

facilidades del Laboratorio de Nutrición Animal del Departamento de Industria Pecuaria. El contenido de proteína bruta y fibra detergente neutro se determinó en un laboratorio comercial (Dairy One Forage Lab, Ithaca, New York). Los datos experimentales se analizaron según un diseño reversible con dos periodos y cuatro repeticiones por tratamientos. Las medias fueron separadas mediante la prueba de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1 Monitorear la presencia y determinar el contenido de nutrientes de la maleza *Hyparrhenia rufa* en la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico en Lajas.

2.1.1 Inspección y monitoreo

Hyparrhenia rufa se encontró invadiendo terrenos en los que se cultivaba otra gramínea (Hierba Pangola; *Digitaria decumbens*) utilizada para la producción de heno. Se observó que esta maleza predominaba en gran parte del campo en la EEA-Lajas y que es capaz de sobrevivir todo el año. Al analizar la composición química de la planta completa, esta mostró que el contenido de MS fue mayor para los meses de febrero y marzo con una media de 51.56 y 48.15 % respectivamente. Sin embargo, aunque durante los meses de agosto a octubre *H. rufa* posee menor contenido de MS, el tejido es más nutritivo y mejor para pastoreo ya que contienen mayor porcentaje de proteína bruta (PB) y menor contenido de lignina. Para el mes de octubre *H. rufa* mostró una diferencia significativa ($P < 0.05$) en el contenido de PB (7.90%) en comparación con los meses de enero y febrero (3.12 y 3.37%) donde se obtuvieron los valores más bajos. Esto coincide con los meses con el promedio más alto en precipitación durante el año 2010 (Figura 13). *Hyparrhenia rufa* no mostró diferencia significativa ($P > 0.05$) en el contenido de materia orgánica (MO) a través del año, pero para el mes de diciembre se observó numéricamente la media mayor (92.40 %). En el mes de diciembre se observó el menor (7.60%) contenido de materia inorgánica (MI) y durante el mes de julio el mayor contenido de minerales con un 13.31%.

En cuanto a los componentes de la pared celular, el contenido de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácida (FDA) fue mayor para el mes de febrero con un 78.26% y 55.22% respectivamente. El contenido de estos componentes fue menor con un 68.67% de FDN durante el mes de octubre y un 41.97% de FDA durante el mes agosto. El contenido de hemicelulosa no fue significativo ($P>0.05$) para ninguno de los meses ya que los valores se mantuvieron bastante constantes durante el año, mientras que el contenido de lignina fue variable pero presentó valores significativos entre meses ($P<0.05$). El contenido más alto de lignina se observó para el mes de enero con 7.73% mientras que el más bajo fue para el mes de octubre con un 3.00% (Cuadro 3).

Cuadro 3. Composición química de *Hyparrhenia rufa* a través del año 2011

Mes	Componentes							
	MS ¹	MO ²	MI ³	PB ⁴	FDN ⁵	FDA ⁶	HC ⁷	LIG ⁸
Diciembre	40.36 ^{ab}	92.40	7.60 ^d	4.93 ^{ab}	72.83 ^{abc}	48.90 ^{ab}	23.93	5.40 ^{abc}
Enero	46.45 ^a	91.64	8.36 ^{cd}	3.12 ^b	77.32 ^{ab}	50.23 ^{ab}	27.10	7.73 ^a
Febrero	51.56 ^a	91.80	8.20 ^{cd}	3.37 ^b	78.26 ^a	55.22 ^a	23.04	7.41 ^{ab}
Marzo	48.15 ^a	89.27	10.73 ^{abcd}	5.87 ^{ab}	71.90 ^{abc}	44.17 ^{ab}	27.73	6.23 ^{abc}
Abril	46.91 ^a	89.72	10.28 ^{abcd}	5.50 ^{ab}	74.60 ^{abc}	43.95 ^{ab}	30.65	6.55 ^{abc}
Mayo	47.07 ^{ab}	90.45	9.55 ^{bcd}	4.90 ^{ab}	72.07 ^{abc}	46.67 ^{ab}	25.40	7.13 ^{ab}
Junio	39.82 ^{ab}	88.83	11.17 ^{abc}	5.43 ^{ab}	69.77 ^c	46.00 ^{ab}	23.77	6.00 ^{abc}
Julio	36.49 ^{ab}	86.69	13.31 ^a	5.53 ^{ab}	72.14 ^{abc}	49.41 ^{ab}	22.73	6.43 ^{abc}
Agosto	23.03 ^b	87.69	12.31 ^{ab}	6.47 ^{ab}	70.23 ^{bc}	41.97 ^b	28.27	4.20 ^{bc}
Septiembre	22.23 ^b	87.61	12.39 ^{ab}	6.43 ^{ab}	70.33 ^{bc}	43.27 ^b	27.07	4.76 ^{abc}
Octubre	23.83 ^b	87.17	12.83 ^{ab}	7.90 ^a	68.67 ^c	42.10 ^b	26.57	3.00 ^c
Noviembre	39.22 ^{ab}	90.78	9.22 ^{bcd}	6.83 ^{ab}	70.20 ^{bc}	43.37 ^b	26.83	4.53 ^{abc}

Medias con letras distintas en la misma columna indican diferencia significativa ($P<0.05$).

¹MS=Materia Seca; ²Materia Orgánica; ³Materia Inorgánica; ⁴Proteína Bruta; ⁵Fibra Detergente Neutro;

⁶Fibra Detergente Ácida; ⁷Hemicelulosa; ⁸Lignina.

El pobre contenido de nitrógeno que contiene las gramíneas tropicales durante la época seca y el aumento en FDN es la principal restricción para la función del rumen y la productividad del ganado en pastoreo (Ibrahim *et al.*, 2001) Esto concuerda con los datos obtenidos en este ensayo ya que muestra una baja en el contenido de PB y un aumento en los componentes de la pared celular (FDN) especialmente durante los meses de diciembre a febrero, es decir durante la época seca en Puerto Rico. Esto coincide con la etapa de la florecida, encontrándose la planta en etapa madura que es cuando su proporción de lignina ha aumentado considerablemente. De acuerdo a las fluctuaciones observadas en el contenido de nutrientes de *H. rufa* a través del año podríamos sugerir que es posible la producción de heno y/o su utilización bajo sistemas de pastoreo durante los meses de agosto a noviembre.

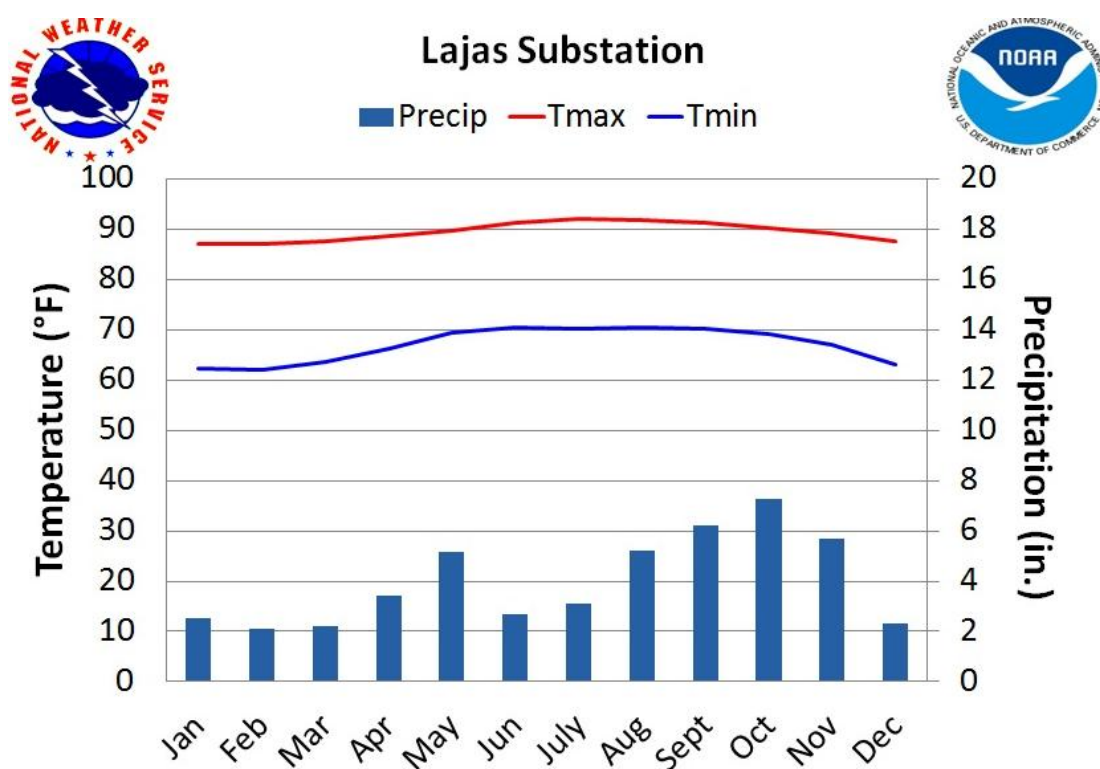


Figura 12. Datos de temperatura y precipitación promedio a través del año 2010 en la EEA-Lajas.

2.2 Consumo voluntario y digestibilidad de nutrientes de *H. rufa* utilizando ganado caprino adulto.

2.2.1 Prueba de selectividad

En la prueba para comparar la selectividad entre *H. rufa* fresca versus henificada utilizando caprinos se observó que el consumo del forraje fresco se mantuvo constante la mayor parte del tiempo, con un promedio final de 48.5% lo que representa una selectividad mediana (5-8 animales; figura 13). Sin embargo el consumo selectivo de la maleza henificada disminuyó de mediana (0-5 minutos) a baja al transcurrir el tiempo con un promedio final de 29.17% (1-4 animales; Cuadro 4).

Cuadro 4. Consumo selectivo de *Hyparrhenia rufa* fresca versus henificada por ganado caprino.

Tiempo (minutos)	Alimento	
	HRF ¹	HRH ²
0-5	Mediano (50%)	Mediano (50%)
5-10	Bajo (33%)	Bajo (25%)
10-15	Mediano (50%)	Bajo (17%)
15-20	Mediano (50%)	Bajo (33%)
20-25	Mediano (50%)	Bajo (25%)
25-30	Mediano (58%)	Bajo (33%)
Consumo Total	48.5%	29.17%

¹HRF=*Hyparrhenia rufa* fresca; ²HRH=*Hyparrhenia rufa* henificada; No consumo (0 animales); Bajo consumo (1-4 animales); Mediano consumo (5-8 animales); Alto consumo (9-12 animales).

El consumo voluntario de los animales está determinado por factores asociados a la planta, al animal y al medio ambiente. Sin embargo, a menudo el

consumo de forrajes en forma de heno es más bajo que el forraje fresco y se debe principalmente al efecto de llenar el rumen (Baumont *et al.* 1999) y otras características organolépticas como sabor y olor del material vegetativo ofrecido.

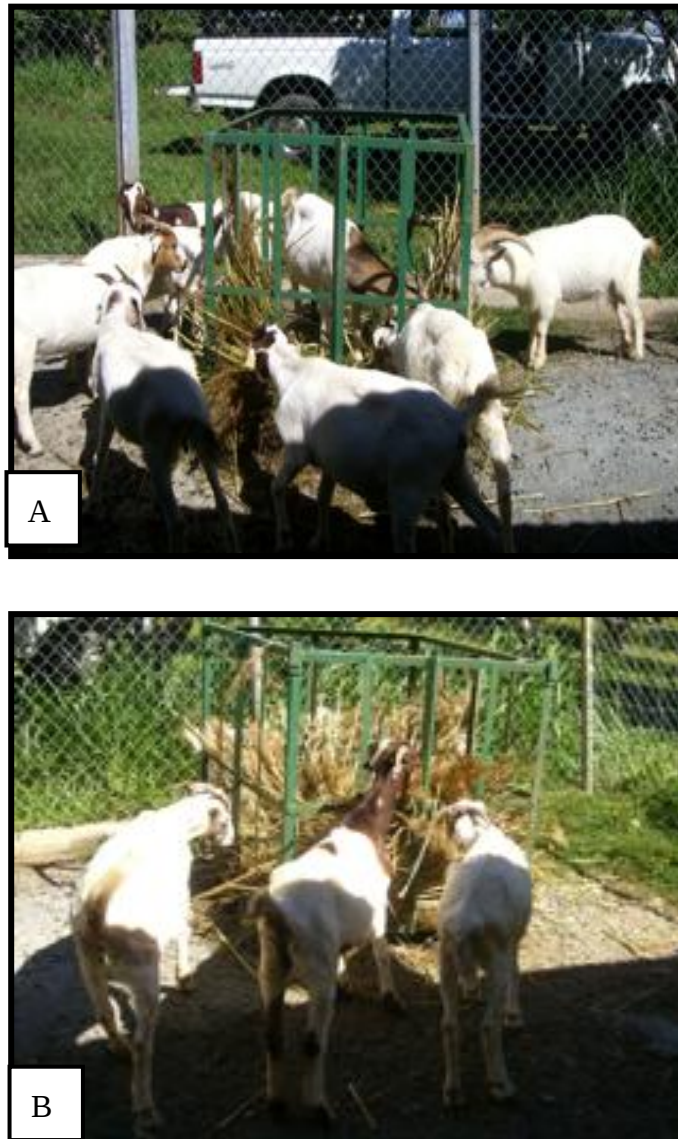


Figura 13. Consumo selectivo mediano de *Hyparrhenia rufa* fresca por caprinos (A) y consumo selectivo bajo de *Hyparrhenia rufa* henificada por caprinos (B).

2.2.2 Inclusión de *H. rufa* en dietas para ganado caprino; consumo voluntario y digestibilidad de la materia seca, proteína bruta y fibra detergente neutro

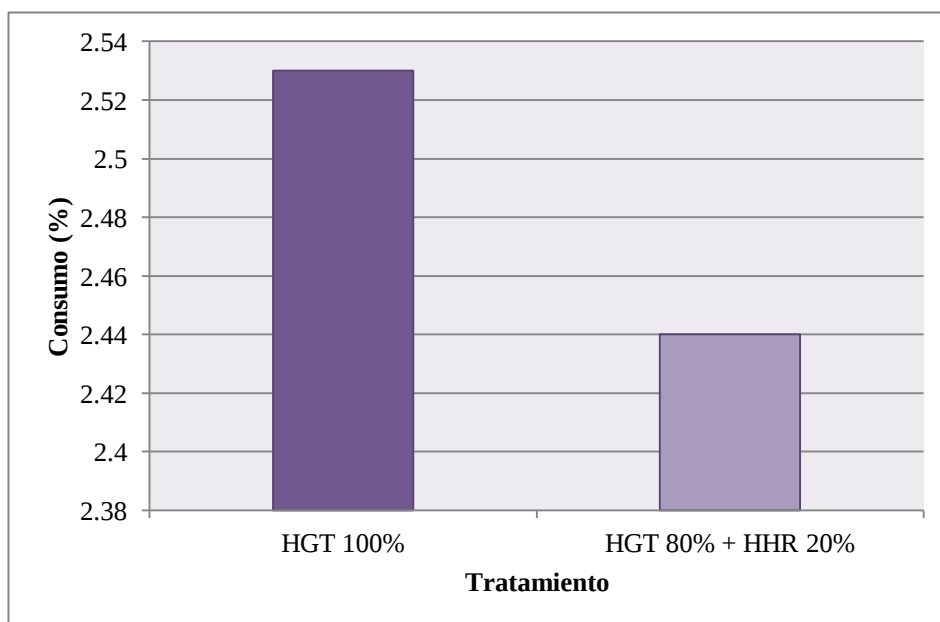
Los resultados de la prueba de consumo y digestibilidad demuestran solamente diferencias significativas en la cantidad de heno de gramíneas tropicales (HGT) ofrecido y su contenido de FDN con relación a la dieta conteniendo los dos tipos de forraje (Cuadro 5).

En este experimento, el consumo total de forraje y el consumo en relación al peso vivo animal en base seca fue similar en caprinos alimentados con dietas conteniendo 100% HGT o aquellas con 80% HGT y HHR (1243 vs 1263 g/d, y 2.53 vs 2.44%, respectivamente; Figura 14; Cuadro 5).

El consumo de HGT con relación a su ofrecimiento fue mayor ($P<0.05$) en caprinos alimentados con 100% HGT que con la proporción 80:20 HGT: HHR (88.26 vs 81.93%). El consumo de HHR con relación su ofrecimiento y con relación al consumo total de forraje fue de 42.16% y 10.63%, respectivamente.

La digestibilidad aparente de la MS (56.70 vs 56.21%), PB (63.52 vs 58.57%) y FDN (55.48 vs 57.20%) fue similar entre tratamientos experimentales.

En resumen la inclusión a 20% de HHR en dietas para caprinos basadas en HGT no afectó el consumo total de forraje ni la digestibilidad de MS, PB y FDN. Los caprinos consumieron 10% de HHR ofrecido, valor que podría representar el nivel de sustitución ideal en dietas para caprinos basadas en heno de gramíneas tropicales.



Tratamiento HGT (Heno de gramíneas tropicales); 2=HGT (Heno de gramíneas tropicales) + HHR (Heno de *Hyparrhenia rufa*)

Figura 14. Porcentaje del consumo diario de *Hyparrhenia rufa* por ganado caprino en relación a la materia seca.

**Cuadro 5. Consumo voluntario y digestibilidad de la MS, PB, y FDN en dietas
conteniendo mezclas de heno de gramíneas tropicales con o sin heno de
Hyparrhenia rufa.**

Componente (g/d) ¹	Inclusión de <i>Hyparrhenia rufa</i>			
	T1	T2		
	100% HGT	80% HGT	20% HHR	Total
Ofrecido				
MS	1585.23 ^a	1298.30 ^b	328.98	1627.28
PB	73.93	60.44	14.85	75.29
FDN	1132.00 ^a	942.62 ^b	267.17	1209.79
Rechazado				
MS	341.48	167.05	197.73	364.78
PB	14.29	6.59	10.63	17.22
FDN	247.28	120.61	156.25	276.86
Consumido				
MS	1243.75	1131.25	131.25	1262.50
PB	59.63	53.85	4.21	58.06
FDN	884.72	822.05	110.92	932.97
Digestibilidad (%)				
MS	56.70	56.21	56.21	-
PB	63.52	58.57	58.57	-
FDN	55.48	57.20	57.20	-

¹Inclusión de *Hyparrhenia rufa* al 0% = HGT (Heno de gramíneas tropicales) al 100%; Inclusión al 20% = HGT al 80% + HHR (Heno de *Hyparrhenia rufa*); Medias con letras distintas diferencia significativa (P<0.05).

CONCLUSIONES

1. Los meses de agosto a octubre son los más adecuados para la utilización como forraje de la maleza debido a su alto contenido de PB y disminución en el contenido de FDN.
2. La prueba de selectividad demostró que los caprinos prefieren la gramínea en estado fresco que en estado henificado.
3. La inclusión de *H. rufa* al 20% del total de dietas basadas en heno de gramíneas tropicales no afectó el consumo voluntario ni la digestibilidad de la materia seca, proteína bruta y fibra detergente neutro de las mezclas evaluadas.

RECOMENDACIONES

1. Determinar la especificidad de los patógenos evaluados en cultivos de importancia económica.
2. Evaluar la virulencia de los patógenos en diferentes combinaciones y a diferentes concentraciones en plantas de *H. rufa* jóvenes.
3. Evaluar el consumo voluntario de *H. rufa* cosechada a una altura no mayor de 31 cm de altura.

LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. 5ta ed. Academic Press Inc. Publication, San Diego, California. 922 p.
- Barnet H. L. y B. B. Hunter. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th ed. APS Press, St. Paul Minn.
- Balogun, R. O. y E. O. Otchere. 1995. Effect of level *Leucaena leucocephala* in the diet on feed intake, growth and feed efficiency of Yankasa rams. Tropical Grasslands. 29: 150-154.
- Baumont, R., A. Grasland y A. Détour. 1999. Short-term preferences in sheep fed Rye-grass as fresh forage, silage or hay. CAB International. 123-128.
- Betsha, S., y S. Melaku, 2009. Supplementations of *Hyparrhenia rufa* –dominated hay with groundnut cake- wheat bran mix: effects on feed intake, digestibility and nitrogen balance of Somali goats. Tropical Animal Health and Production. 41: 927-933.
- Casali, A., R. Corti, E. D’Agostino, L. Dip, D. Faccini, E. Leguizamon y J.J. Pluss. 1998. Sistema interactivo para el tratamiento integral de malezas; 1: Identificación de malezas. Pesquisa Agropecuaria Brasileira. 33: 809-821.
- Chandramohan, S. and R. Charudattan. 2001. Control of seven grasses with a mixture of three fungal pathogens with restricted host ranges. Biological Control. 22: 246-255.
- Charudattan, R. 2005. Use of plant pathogens as bioherbicides to manage weeds in horticultural crops. Florida State Horticultural Society. 118: 208-214.
- Chutia, M., J.J. Mahanta, N. Bhattacharyya, M. Bhuyan, P. Boruah y T.C. Sarma. 2007. Microbial herbicides for weed management: Prospects, progress and constraints. Plant Pathology Journal. 6: 210-218.
- Coleman, J. S. 1986. Leaf development and leaf stress: increased susceptibility associated with sink-source transition. Tree Physiology. 2: 289-299.
- Curran, W.S. y D.D. Lingenfelter. 2001. Weed management in pasture systems. Agronomy facts 62. The Pennsylvania State University. College of Agricultural Sciences. Agricultural Research and Cooperative Extension. 15 pp.
- Daubenmire, R., 1971. Ecology of *Hyparrhenia rufa* (Nees) in derived savanna in North-Western Costa Rica. Journal of Applied Ecology. 9-10: 11-23.

- García-Molinari, O. 1946. Annual report of the Agrostologist. Annual report of the director of the Institute of Tropical Agriculture for the fiscal year 1944-45. Service Office of the Government of Puerto Rico. pp. 50-51.
- Google Maps. 2012. Puerto Rico Satellite Maps. <http://maps.google.es/>
- Harbuck, K. S. B., F. D. Menalled and F. W. Pollnac. 2009. Impact of cropping systems on the weed seed banks in the northern Great Plains, USA. *Weed Biology and Management*. 9: 160-168.
- Huang, J., L. Zheng and T. Hsiang. 2005. First report of leaf spot caused by *Curvularia verruculosa* on *Cynodon* sp. in Hubei, China. *Plant Pathology*. 54: 253.
- Ibrahim, M., M. Franco, D.A. Pezo, A. Camero y J.L. Araya. 2001. Promoting intake of *Cratylia argentea* as a dry Season supplement for cattle grazing *Hyparrhenia rufa* in the subhumid tropics. *Agroforestry Systems*. 51: 167-175.
- Infostat, 2009. Grupo Infostat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Luginbuhl, J.M. y S. Pietrosevoli Castagni. 2007. Utilización de caprinos para el control de vegetación indeseable. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. 15: 1-16.
- Más, E. y O. García-Molinari. 2006. Guía Ilustrada de Yervas Comunes en Puerto Rico. SEA-UPR Mayagüez y USDA, NRCS Área del Caribe.
- Menaria, B.L. 2007. Bioherbicidas: An eco-friendly approach to weed Management. *Current Science*. 92: 10-11.
- National Weather Service Weather Forecast Office. 2012. Lajas Normals. http://www.srh.noaa.gov/sju/?n=climo_lajas#LajasAES (Marzo, 2012).
- Pazoutová, S. 2009. Genetic Variation of *Phoma sorghina* isolates from southern Africa and Texas. *Folia Microbiology*. 54 (3): 217-229.
- Perelló, A. E. and M. V. Moreno. 2005. First report of *Phoma sorghina* (Sacc.) Boerema Dorenbosch & van Kest on wheat leave (*Triticum aestivum* L.) in Argentina. *Mycophatologia*. 159: 75-78.
- Pimentel, D. 2001. Economic and environmental impacts of invasive species and their Management. *Pesticides and You*. 21: 10-11.
- Pimentel, D. 2005a. Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. *Environment, Development and Sustainability*. 7: 229-252.
- Pimentel, D., R. Zuniga, y D. Morrison. 2005b. Update on the environmental and

- economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics*. 52: 273-288.
- Prather, T.S., J.M. Ditomaso y J.S. Holt. 2000. Herbicide Resistance: Definition and management strategies. Publication Number 8012. Division of Agriculture and Natural Sciences, University of California.
- Randel, P. 2012. Comunicación personal.
- Reyes, J. C., J. L. Rivero, E. Góngora, A. González y O. Licea. 2007. Control biológico del marabú. Establecimiento de un sistema silvopastoril. *Asociación Cubana de Producción Animal*. 2:53-55.
- Román-Paoli, E. y D. Sotomayor-Ramírez. 2004. Soil conditioner efficacy on Lajas Valley sweet corn production. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*. 8 (3-4): 97-108.
- Shannon, W. 2003. Noxious weed grazing by goats demonstration project. IMPACT Universtiy of Idaho Extension. 1-2.
- Skerman, P.J. y F. Riveros. 1990. Tropical Grasses. FAO Publications. Available: <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Gbase/Data/Pf000259.htm>
- Starr, F., K. Starr y L. Loope. 2003. *Hyparrhenia rufa*. United States Geological Survey-Biological Resources Division, Hawaii. Disponible: http://www.hear.org/starr/hiplants/reports/pdf/hyparrhenia_rufa.pdf
- Teasdale, J. R. and M. A. Cavigelli. 2010. Subplots facilitate assessment of corn yield losses from weed competition on a long-term systems experiment. *Agronomy for Sustainable Development*. 30: 445-453.
- Tesso, T. T., N. Ochanda, C. R. Little, L. Claflin and M. R. Tuinstra. 2010. Analysis of host plant reistance to multiple *Fusarium* species associated with stalk rot disease in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Field Crops Research*. 118: 177-182.
- Tessema, T. 2007. The prospects of biological control of weeds in Ethiopia. *Ethiopia Journal of Weed Management*. 1: 63-78.
- USDA, NRCS. 2010. The PLANTS Database (<http://plants.usda.gov>, 22 November 2010). National Plant Data Center, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA.
- Venkatasubbaiah, P., C. G. Van Dyke and W. S. Chilton. 1992. Phytotoxic metabolites of *Phoma sorghina*, a new foliar pathogen of pokeweed. *Mycologia*. 84 (5): 715-723.
- Wei, D., C. Liping, M. Zhijun, W. Guangwei and Z. Ruirui. 2010. Review of non-chemical weed management for green agriculture. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*. 3 (4):52-60.

- Yandoc-Ables, C.B., E.N. Rosskopf y R. Charudattan, 2006. Plant pathogens at work: Progress and possibilities for weed biocontrol. Part 1: Classical vs. bioherbicidal approach. APSnet Feature Story Aug. 2006. <http://www.apsnet.org/online/feature/weed1/>.
- Yang, Y.-K., S.-O. Kim, H.-S. Chung, and Y.-H. Lee, 2000. Use of *Colletotrichum graminicola* KA001 to control barnyard grass. Plant Dis. 84:55-5.