

Identificación del agente causal y métodos de control de la pudrición del corno en apio (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) en Puerto Rico

Por

Mayra Belen Cathme Romero

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

2017

Aprobado por:

Martha C. Giraldo Zapata, Ph.D.
Presidente, Comité Graduado

Fecha

José A. Chavarría Carvajal, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Raúl Macchiavelli, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

José R. Ferrer López, Ed.D.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Elvin Román Paoli, Ph.D.
Director del Departamento

Fecha

ABSTRACT

Arracacia xanthorrhiza, known as Apio in Puerto Rico, has become a traditional and exclusive crop of the highlands. This tuber has a great nutritional and economic potential because of its high content of starch of easy digestibility among starchy crops. Its main limitation is the “corm rot disease”. Information on management practices for the control of this disease is limited and the farmer does not have alternatives to handle the high losses in the field, besides there is no registered product for its control. For this reason, the present study aims to identify the microorganisms associated with the disease, identify effective control practices to reduce losses by disease and perform pathogenicity tests to identify the main microorganisms associated with rot. We evaluated soil samples to identify microorganisms associated with the crop. In the evaluation of possible methods for disease management, we evaluated eight treatments. The experimental strategy was a Completely Randomized Block design with four replicates. Treatments were performed in a farm with a high incidence of the disease, and pathogens were isolated from diseased corms for its morphological and molecular identification. We found plant-parasitic nematodes, being *Rotylenchulus reniformis* the most frequent. The best control treatments were: i) The use of compost with poultry litter & solarization; (ii) Cover plants (*Crotalaria juncea* and *Tagetes patula*) and (iii) Integrated management practices. These three treatments showed the greatest reduction of plant-parasitic nematodes population, increased free-living (beneficial) nematode populations, increased organic matter content, as well as beneficial fungal populations, reduced levels of disease and increased crop yield. Among the microorganisms identified and positive in the pathogenicity tests were: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia* spp. and *Rhizopus* spp. And the bacteria *Erwinia carotovora*, *Clavibacter michiganensis* and *Pseudomonas* spp.

RESUMEN

El cultivo de *Arracacia xanthorrhiza* conocido como Apio en Puerto Rico, se ha convertido en un cultivo tradicional y exclusivo de la zona montañosa. Este tubérculo presenta un alto potencial nutricional y económico debido a su alto contenido de almidón de fácil digestibilidad entre los farináceos. El cultivo es afectado por la enfermedad conocida como “la pudrición del cormo”. Información sobre el manejo de la enfermedad es escasa y el agricultor no cuenta con alternativas para reducir las pérdidas en campo, además no existe ningún producto registrado para su control. Por tal razón, el presente estudio busca identificar los microorganismos asociados a la enfermedad, identificar prácticas culturales para reducir las pérdidas por la enfermedad y realizar pruebas de patogenicidad. Se realizaron muestreos de suelo para identificar microorganismos asociados al cultivo. En la evaluación de los posibles métodos para el control de la enfermedad se evaluaron 8 tratamientos. El experimento se desarrolló basado en un diseño experimental de Bloques Completos Aleatorizados con cuatro repeticiones. Los tratamientos se aplicaron en una finca con alta incidencia de la enfermedad y se aislaron patógenos de cormos enfermos para su identificación morfológica y molecular. Los resultados de este proyecto identificaron nematodos fitoparásitos, siendo *Rotylenchulus reniformis* el de mayor frecuencia. Los mejores tratamientos de control fueron: i) Uso de composta con gallinaza & solarización; ii) Plantas cobertoras (*Crotalaria juncea* y *Tagetes patula*) y iii) La práctica de manejo integrado. Estos tres tratamientos mostraron la mayor reducción de nematodos fitoparásitos, aumento de las poblaciones de nematodos de vida libre (benéficos), aumento en el contenido de materia orgánica, al igual que de las poblaciones de hongos benéficos, reducción en los niveles de la enfermedad y aumento en el rendimiento del cultivo. Dentro de los microorganismos identificados y que fueron positivos en las pruebas de patogenicidad se encontraron los hongos *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia* spp. y *Rhizopus* spp. y las bacterias *Erwinia carotovora*, *Clavibacter michiganensis* y *Pseudomonas* spp.

DEDICATORIA

A mi madre, Lydia Romero por enseñarme el valor de las cosas y sobretodo de la vida, quien decía que la educación y el amor a lo que haga me haría llegar muy lejos.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo a Dios por poner en mi camino a personas tan especiales y darme la oportunidad de disfrutar cada día y cada momento de vida. A mi querida Directora de tesis, la Dra. Martha Giraldo que con amor, dedicación y paciencia fue la pieza fundamental en este proceso y se ha convertido en una persona muy importante en mi vida, a los miembros de mi comité graduado, Dr. José Chavarría, Dr. Raúl Macchiavelli, por sus acertadas recomendaciones en este trabajo. A este Maravilloso País por su acogida, a la Universidad de Puerto Rico por darme la oportunidad que no pude tener en mi País y formarme profesional y personalmente. A todos mis profesores por sus conocimientos y amistad brindada, principalmente a la Dra. Lydia Rivera, Dra. Merari Feliciano, Agr. Agenol Gonzales, Dr. Linda Beaver. A los técnicos de laboratorio Víctor González y Luis Collazo.

Al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) que bajo el proyecto Hatch H-457 financio la realización de esta investigación. A todas las personas que trabajan en la Estación Experimental de Corozal, Luis Almodóvar, Carmencita, Noemí, Raúl y todos los trabajadores que me ayudaron con la mejor disposición. A los agentes agrícolas de Barranquitas Agro. Carmen M. Alicea "Mili" y de Orocovis Agro. David Matos por su ayuda, a los incansables luchadores, los agricultores, en especial José Luis Rivera, quien me permitieron trabajar con ellos en las evaluaciones de campo en sus fincas.

A mi familia, por el apoyo que desde tan lejos se sintió en cada instante y sobre todo en los malos momentos, gracias por los detalles tan maravillosos en mis visitas a Ecuador, gracias por apoyar a mi madre. A mis amigos de penas en los laboratorios, Marianela, María, Casiani y Yara. A mis amigos entrañables que aunque estemos regados por el mundo nunca perdimos contacto y nos apoyamos como siembre, Jenny, Diana, Mónica, David, Laura, Mayra, Maribel y Pato. A Santi y los bebés por soportarme en su casa.

A mi amigo y profesor Elide Valencia por ser un "internacional" más y brindar su incondicional apoyo en todo momento, a mis compatriotas por la amistad y el apoyo Laura, Lore, Edgar, Darío, Diego, Mauricio y Andrea. Compañeros de departamento, mis queridos estudiantes y amigos.

**"This work was supported by the USDA National Institute of Food and
Agriculture, Hatch Project PR 00457, Accession No. 1009013"**

CONTENIDO

Páginas

ABSTRACT	ii
RESUMEN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
LISTA DE CUADROS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE APÉNDICES.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS	4
REVISIÓN DE LITERATURA	5
Origen y distribución del cultivo	5
Características del cultivo	6
Ecología del cultivo	7
Importancia del cultivo	8
Usos y Composición del cultivo	8
Diversidad genética	10
Enfermedades	11
Control para la pudrición del corno del apio.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Muestreo, extracción e identificación de nematodos.....	16
Aislamiento de hongos y bacterias	18
Identificación de hongos	18

Caracterización de bacterias	19
Descripción del área experimental.....	21
Tratamientos.....	22
Características de la unidad experimental	23
Análisis estadístico	23
Preparación del predio experimental	25
Variables evaluadas	25
RESULTADOS	34
DISCUSIÓN	72
CONCLUSIONES.....	80
RECOMENDACIONES	81
LITERATURA CITADA.....	82
APÉNDICES.....	94

LISTA DE CUADROS

Páginas

Cuadro 1. Composición química del apio (<i>A. xanthorrhiza</i>) por 100 g de tejido fresco.....	9
Cuadro 2. Tratamientos a evaluar para el control de la pudrición del corno en apio (<i>A. xanthorrhiza</i>), en Barranquitas, Puerto Rico.....	23
Cuadro 3. Genes y cebadores específicos utilizados en la identificación molecular de aislamientos de <i>Fusarium</i> asociados a la pudrición del corno de apio.	32
Cuadro 4. Promedios de poblaciones inicial de nematodos fitoparásitos y de vida libre en suelo de una finca comercial de apio (<i>A. xanthorrhiza</i>) previa a la aplicación de los tratamientos.....	38
Cuadro 5. Efecto de los tratamientos sobre las poblaciones de nematodos fitoparásitos y nematodos de vida libre en suelo durante el segundo muestreo.....	39
Cuadro 6. Efecto de los tratamientos sobre las poblaciones de nematodos fitoparásitos y nematodos de vida libre en suelo, cuatro meses después de la siembra.....	40
Cuadro 7. Efecto de los tratamientos sobre las poblaciones de nematodos fitoparásitos y nematodos de vida libre en suelo, al momento de la cosecha.	42
Cuadro 8. Efecto de los tratamientos sobre las poblaciones de nematodos fitoparásitos y nematodos de vida libre en raíz, al momento de la cosecha.	43
Cuadro 9. Efecto de los tratamientos en el porcentaje de brotación en apio (<i>A. xanthorrhiza</i>).	46
Cuadro 10. Respuesta de las variables de rendimiento en la evaluación de tratamientos para reducir las poblaciones de nematodos asociados al cultivo de apio (<i>A. xanthorrhiza</i>). Error! Bookmark not defined.	

Cuadro 11. Efecto de los tratamientos en la reducción de la severidad la pudrición del corno de apio.	49
Cuadro 12. Efecto de los tratamientos sobre los niveles poblacionales de bacterias durante el primero y cuarto muestreo para el control de la pudrición del corno de apio (<i>A. xanthorrhiza</i>).	51
Cuadro 13. Efecto de los tratamientos sobre los niveles poblacionales de hongos durante el primero y cuarto muestreo para el control de la pudrición del corno de apio (<i>A. xanthorrhiza</i>)	52
Cuadro 14. Resultados del diámetro de lesión en discos de apio para evaluar las pruebas de patogenicidad con hongos aislados de cormos con síntomas de pudrición.	56
Cuadro 15. Frecuencias de las principales especies identificadas dentro del género <i>Fusarium</i> en pruebas de patogenicidad en apio.	58
Cuadro 16. Características morfológicas de aislamientos de <i>Fusarium</i> asociados a la pudrición del corno del apio.	58
Cuadro 17. Características morfológicas de los conidios de aislamientos del género <i>Fusarium</i> asociados a la pudrición del corno del apio.	59
Cuadro 18. Análisis de las secuenciadas con el cebador EF para cada aislamiento y su respectiva identificación.	63
Cuadro 19. Resultados de manipulación de cadenas secuenciadas con el cebador ITS para cada aislamiento y su respectiva identificación.	64
Cuadro 20. Características morfológicas de aislamientos bacterianos obtenidos de cormos de apio con pudrición.	70
Cuadro 21. Resultados de pruebas bioquímicas de colonias bacterianas asociadas a la pudrición del corno del apio (<i>A. xanthorrhiza</i>).	70
Cuadro 22. Resultados de análisis de suelo antes de la aplicación de los tratamientos del experimento de métodos de control para la enfermedad.	95

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Planta de apio (<i>A. xanthorrhiza</i> Bancroft) en diferentes zonas de Puerto Rico.	7
Figura 2. Metodología de extracción de nematodos de suelo.	17
Figura 3. Metodología de extracción de nematodos de raíces y cormo..	17
Figura 4. Método de aislamiento de hongos y bacterias en muestras de suelo.....	20
Figura 5. Imagen satelital de la finca El Zorzal del municipio de Barranquitas (Google Maps® 2016). Cuadro rojo corresponde al predio donde se estableció el experimento de campo.	21
Figura 6. Algunos tratamientos evaluados para reducción de poblaciones de nematodos asociados al cultivo de apio.....	24
Figura 7. Aislamiento de organismos asociados a la pudrición del cormo.	30
Figura 8. Especies de nematodos fitoparásitos encontrados en suelo y asociados al cultivo de apio (<i>A. xanthorrhiza</i>).....	34
Figura 9. Características macroscópicas y microscópicas (40x) de hongos identificados en muestras de suelo del cultivo de apio..	36
Figura 10. Características macroscópicas y microscópicas (40x) de hongos identificados en muestras de suelo del cultivo de apio..	37
Figura 11. Efecto de los tratamientos en la dinámica poblacional de nematodos fitoparásitos en cuatro diferentes muestreos de suelo asociadas al cultivo se apio (<i>A. xanthorrhiza</i>).....	44

Figura 12. Efecto de los tratamientos en la dinámica poblacional de nematodos de vida libre en cuatro diferentes muestreos de suelo asociadas al cultivo de apio (<i>A. xanthorrhiza</i>).....	45
Figura 13. Efecto de los tratamientos en la incidencia y severidad de la enfermedad, variable binomial de plantas con y sin síntomas.....	48
Figura 14. Severidad de la enfermedad encontrada en el experimento de campo.	50
Figura 15. Efecto de los tratamientos sobre la dinámica poblacional de bacterias en dos muestreos para evaluar el control de la pudrición del corno de apio (<i>A. xanthorrhiza</i>).....	51
Figura 16. Efecto de los tratamientos sobre la dinámica poblacional de hongos en dos muestreos para evaluar el control de la pudrición del corno de apio (<i>A. xanthorrhiza</i>).....	53
Figura 17. Síntomas de la pudrición del corno del apio.....	55
Figura 18. Diversidad de colonias de <i>Fusarium</i> aisladas en muestras de tejido con síntomas de pudrición de corno.	57
Figura 19. Características morfológicas y pruebas de patogenicidad para <i>Fusarium solani</i>	60
Figura 20. Características morfológicas y pruebas de patogenicidad para <i>Fusarium oxysporum</i>	61
Figura 21. Gel de agarosa con amplificación de ITS y EF de ocho aislamientos de <i>Fusarium</i> patógenicos al cultivo de apio.....	62
Figura 22. Árbol filogenético de ocho aislamientos de <i>Fusarium</i> asociados a la pudrición del corno de apio mediante la secuencia del gen EF.....	65
Figura 23. Árbol filogenético de ocho aislamientos de <i>Fusarium</i> asociados a la pudrición del corno de apio mediante la secuencia del gen ITS.....	65
Figura 24. Características morfológicas y pruebas de patogenicidad de <i>Rhizoctonia</i>	66

Figura 25. Características morfológicas y pruebas de patogenicidad de <i>Rhizopus</i> spp	67
Figura 26. Colonias bacterianas en medio de cultivo ATS y pruebas de patogenicidad para aislamientos asociados a la pudrición del corno del apio.....	71

LISTA DE APÉNDICES

	Página
Apéndice 1. Análisis químico de la composta con gallinaza utilizada en el tratamiento de composta con gallinaza y solarización.	94
Apéndice 2. Análisis químico de tratamientos en el primer muestreo	95
Apéndice 3. Análisis de la varianza para las variables en la evaluación de métodos de reducción de poblaciones de nematodos y severidad de la enfermedad.....	95

INTRODUCCIÓN

El farináceo *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft o apio, como se le conoce en Puerto Rico, es la única especie dentro de la familia Apiaceae, que tiene como centro de origen América del Sur. El apio es originario de zonas templadas en Perú y Ecuador donde forma parte fundamental de la dieta de la población andina y contribuye a la seguridad alimentaria de estos países. El apio por su alto contenido de almidón, rico en aceites minerales, de alta digestibilidad y vitaminas, lo hace uno de los alimentos más utilizados en dietas para enfermos, ancianos y bebés. Además, sus hojas y tallos son utilizados como alimento para animales y en medicina tradicional. A diferencia de Suramérica, en donde se producen raíces tuberizadas, en Puerto Rico se consume el cormo ya que por adaptación las raíces no tuberizan (Ortiz *et al.*, 2003). El apio también se conoce con los nombres de racacha en Perú, arracacha en Colombia, arracache en Costa Rica, zanahoria blanca en Ecuador y mandioquiña salsa en Brasil (Hermann, 1997).

En el año 1903 el cultivo de apio fue reportado en Puerto Rico por Cook y Collins (Cook *et al.*, 1903). Fue sembrado primero en Ponce y posteriormente en las zonas montañosas del centro de la Isla en los municipios de Barranquitas y Orocovi, donde se ha convertido en parte importante de la cultura y fuente de ingresos para los agricultores. Anualmente en Barranquitas se celebra el festival del apio. Según descrito por Ortiz y sus colaboradores en 1998, el consumo de apio era de 0.70 kg '*per cápita*' para una población en ese año de 3.30 millones de habitantes. La producción de apio ha tenido una reducción de superficie sembrada, desde el 2002 al 2012 el área sembrada disminuyó de 196.50 ha a 82.50 ha (Censo de USDA NASS) que al no alcanzar a cubrir la demanda interna del producto, obliga a su importación desde otros países como Costa Rica y República Dominicana (Cortés, 2015).

La principal limitante en la producción de este cultivo en Puerto Rico es la enfermedad conocida como "pudrición del cormo" que causa pérdidas del 50 al 100%. Esta enfermedad se caracteriza por una pudrición blanda, afectando directamente la parte comercial y comestible de la planta, reduciendo la calidad del material de propagación, semilla vegetativa, la cual se ha convertido en una fuente de inóculo de fácil dispersión. *Phytophthora palmivora* fue identificado como agente causal de la enfermedad acompañados por un complejo de hongos, *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. (Ortiz-Vázquez *et al.*, 2008; Rosa-Márquez, *et al.*, 2000; Rosa-Márquez, 1998). Para el año 2000 Rosa-Márquez y colaboradores evaluaron la efectividad de varios fungicidas y recomendaron etridiazole thiophanate-methyl como un producto efectivo para el control de los hongos identificados. A pesar de estas investigaciones, actualmente el agricultor de la montaña no cuenta con un método apropiado de manejo de la enfermedad que reduzca las pérdidas en campo, y tampoco cuentan con un producto registrado para su control en Puerto Rico.

La Sub-Estación Experimental Agrícola de Corozal retomó los estudios sobre esta enfermedad mediante visitas a predios comerciales de Barranquitas y Orocovis, durante los meses de agosto de 2014 a mayo de 2015. Las observaciones realizadas a nivel de campo presentaron un patrón de distribución típico de daño causado por nematodos fitoparásitos, los cuales han sido reportados en Brasil como uno de los microorganismos más importantes en enfermedades radiculares del apio. Los nematodos fitoparásitos no solo causan un daño primario al alimentarse en la epidermis de las raíces, sino que estos daños producen heridas que permiten la entrada para otros patógenos secundarios tales como: hongos y bacterias, que ocasionan la pudrición completa del tejido, reconocidos previamente como agentes causales de la enfermedad.

Bajo la premisa de que los nematodos fitoparásitos causan el primer daño, se evaluó la presencia de estos y de otros organismos asociados a la enfermedad en

el suelo. También se evaluaron diferentes tratamientos para el control efectivo de la enfermedad. Los tratamientos aplicados se seleccionaron teniendo en cuenta que utilizaran materiales de fácil acceso para el agricultor y que fueran prácticas culturales de fácil aceptación, con el objetivo de incrementar el área sembrada del cultivo, evitar que este cultivo desaparezca y proveer un cultivo alternativo exclusivo para los agricultores de la montaña en Puerto Rico.

OBJETIVOS

Identificar microorganismos patógenos de suelo asociados al cultivo de apio.

Evaluar prácticas agronómicas que permitan reducir las pérdidas causadas por la enfermedad.

Realizar pruebas de patogenicidad para identificar organismos asociados a la enfermedad.

REVISIÓN DE LITERATURA

Origen y distribución del cultivo

El apio (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) es la única planta perteneciente a la familia Apiaceae que tiene su centro de origen en América. Evidencias arqueológicas, taxonómicas, históricas y lingüísticas muestran que el apio es originario de América del Sur, específicamente de Perú y Ecuador, considerados como el centro de origen del cultivo por la presencia de especies silvestres (Morillo *et al.*, 2016; Amaya *et al.*, 2006; Hermann, 1997). Se trata de una de las plantas más antiguas cultivadas en esta región, ocurriendo su domesticación en la etapa preincaica incluso antes que el de la papa y el maíz (Amaya *et al.*, 2006). Además de los Andes, este cultivo es producido en las Antillas, América Central y el Caribe (Costa Rica, República Dominicana y Puerto Rico), África, Sir Lanka y Brasil donde la producción es tan alta que les permite procesarlo e industrializado (Domínguez *et al.*, 2006; Salas-Domínguez *et al.*, 2002). El apio es conocido con diferentes nombres, en Brasil se lo conoce como mandioquiña-salsa, en Colombia, Perú, Ecuador, Bolivia y Cuba como arracacha, en Perú y Ecuador también se le conoce como zanahoria blanca, en Costa Rica como arracache, en Puerto Rico y Venezuela como apio criollo, y en el lenguaje *Quechua* como oqpe, huiasampilla, laqachu, raqacha, virraca y rikacha (Hermann, 1997).

Según Amaya (2006), el cultivo fue introducido a Puerto Rico y varios países de América Central y el Caribe por Bancroft en 1825, aunque formalmente fue reportado por primera vez en 1903 por Cook y Collins en Puerto Rico (Cook *et al.*, 1903). También fue llevado a Europa y Estados Unidos donde su aclimatación no fue posible y las plantas no produjeron raíces comestibles (Hermann, 1997).

Características del cultivo

El Apio es una planta bianual o perenne dicotiledónea, bisexual que taxonómicamente pertenece a la Clase: Angiosperma, Subclase: Dicotiledónea, Orden: Apiales, familia: Apiaceae (previamente Umbeliferae), Género: *Arracacia*, Especie: *xanthorrhiza* descrita por Bancroft (Tapia *et al.*, 2007). Esta planta se caracteriza por su propiedad de reservar almidones en raíces axonomorfas o tuberizadas grandes comestibles de color amarillo, aunque hay otras variedades de coloración blanca y morada. Es una planta herbácea que puede alcanzar hasta 1.50 m de altura, tiene una hoja vegetativa, que generalmente es más grande y dividida, y la hoja caulinar ubicada en la base del eje floral, que es más pequeña y menos dividida, su inflorescencia corresponde a una umbela. Su tipo de cruzamiento es facultativo y puede producir semilla sexual, aunque la planta no llega a completar su ciclo vegetativo ya que es cosechada antes. En producción comercial la propagación es vegetativa a partir de los brotes, llamados hijuelos que se encuentran sobre el suelo, permitiendo comercializar por completo el cormo y las raíces tuberizadas para consumo humano (Tapia *et al.*, 2007; Amaya, 2006; Hermann, 1997).

Los hijuelos, crecen en la parte aérea de la planta y en contraste a su semilla sexual, mantienen la uniformidad y las características de la planta madre. Los hijuelos se pueden cosechar en cualquier época o estado de desarrollo de la planta, estas se obtienen por lo general después de la cosecha, pero también se pueden obtener por capado, a los ocho meses o más (Tapia *et al.*, 2007) A diferencia del cultivo en Sudamérica, donde se cosechan sus raíces tuberizadas, en Puerto Rico se cosecha el cormo, conocido también como cabeza o corona, ya que por la altura y temperatura de los lugares donde se siembra no produce raíces tuberosas como en los climas más fríos, como se observa en la Figura 1, donde el apio produce más cabeza en Barranquitas (Figura 1. A) que “batatitas” (raíces tuberizadas) como

se producen en Jayuya (Figura 1. B). Las condiciones de temperatura y altitud son determinantes para la producción de raíces o cormo (Ortiz *et al.*, 2003).



Figura 1. Planta de apio (*A. xanthorrhiza* Bancroft) en diferentes zonas de Puerto Rico. **A.** Barranquitas a 943 m.s.n.m. **B.** Jayuya a 1338 m.s.n.m.

Ecología del cultivo

En la zona andina, el apio se encuentra distribuido en diferentes pisos agroecológicos, desde los 700 hasta los 3,600 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m) (Lim, 2015; Mazón-Ortíz *et al.*, 1996) con temperaturas entre 14 a 21°C y precipitaciones entre 100 y 1,200 mm, aunque puede cultivarse desde los 600 mm en suelos profundos y bien drenados, ricos en materia orgánica, con un pH de 5.0 a 6.0, características típicas de los suelos volcánicos de los Andes donde generalmente es intercalado con maíz, habichuela o café (Lim, 2015). Por otro lado, el cultivo se ha adaptado en las zonas altas de Puerto Rico a altitudes entre 800 a 1,300 m.s.n.m.; aunque la mayor parte de su producción se encuentra concentrada en Barranquitas y Orocovis entre los 800 a 1,000 m.s.n.m, con precipitaciones promedio anuales de 1,600 mm y temperaturas de 17 a 26 °C, en suelos ricos en

materia orgánica y con pH alrededor de 5 a 6 (Ortiz *et al.*, 2003; Hermann, 1997). En Puerto Rico el apio puede sembrarse durante todo el año, pero se obtienen mejores rendimientos en siembras establecidas entre agosto y septiembre, para cosecharlo en abril cuando se celebra el festival de este cultivo en Barranquitas. En estas áreas, el cultivo también es sembrado en marzo (Ortiz *et al.*, 2000).

Importancia del cultivo

En Puerto Rico, el apio se comenzó a sembrar extensivamente al norte del municipio de Ponce, posteriormente se asentó en las zonas altas de Barranquitas, Naranjito y Orocovis. El cultivo tuvo su mayor producción en el año 1983 con 5,800.00 toneladas, observándose desde este año una fluctuación en su producción, siendo el año 2000 el de menor producción con 585.20 toneladas. Desde el 2000 no se ha podido producir suficiente apio para cubrir la demanda interna del producto (Cortés, 2015). Al igual que otros farináceos, el apio es una de las principales fuentes de alimento para los agricultores de las zonas altas de Puerto Rico. Durante el 2014, la oficina de estadísticas Agrícolas del Departamento de Agricultura de Puerto Rico reportó el ingreso bruto del cultivo fue de \$2.02 millones equivalente al 1.8% del valor total de los farináceos (Dep. Agricultura de PR, 2015). Sin embargo, estas estadísticas no reflejan la importancia y aceptación del agricultor y consumidor local donde el apio es producido tradicionalmente y constituye una fuente importante de empleo e ingresos (Cortés, 2015).

Este cultivo proporciona una oportunidad económica importante para los agricultores de la montaña ya que por sus requerimientos de cultivo representa un cultivo alternativo exclusivo en el que no tendrían competencia con la producción agrícola del sur u otras zonas agrícolas de la Isla, donde este cultivo no se puede producir.

Usos y Composición del cultivo

El apio es considerado uno de los cultivos farináceos con mayor potencial alimentario y económico, por su único y alto contenido de aceites minerales que facilitan su digestión, además de su alto contenido de calcio, fósforo, hierro, ácido ascórbico, niacina, vitamina A, piridoxina-B6, riboflavina-B2, proteínas, fibras y aceites esenciales, Cuadro 1. (Leon, 2011; Amaya *et al.*, 2006).

Cuadro 1. Composición química del apio (*A. xanthorrhiza*) por 100 g de tejido fresco.

Componente	Cantidad (en 100g de muestra)
Humedad (g)	77.98
Proteína (g)	0.75
Extracto etéreo (g)	0.28
Fibra cruda (g)	0.66
Carbohidratos (g)	19.53
Cenizas (g)	0.80
Potasio (mg)	1.88
Fósforo (mg)	43.01
Hierro (mg)	7.52
Sodio (mg)	65.02
Magnesio (mg)	50.22
Calcio (mg)	51.11
Vitamina A (UI)	1.41
Vitamina B1 (mg)	0.07
Vitamina B2 (mg)	0.08
Vitamina B3 (mg)	3.53
Vitamina B6 (mg)	0.08
Vitamina C (mg)	18.01

1UI vitamina C = 50 µg (0,05 mg) de vitamina C.

1 mg B12 = 1000 µg de vitamina B12.

Fuente: León, 2011

La planta de apio puede ser usada completamente para la alimentación humana y animal, aunque la composición y valor nutricional del cormo y las raíces son similares, la raíz presenta una textura más fibrosa, pero el cormo es superior en calidad nutricional por su alto contenido de proteína y de minerales como el calcio que posee 1.3 y 2.1 veces más que en la raíz, respectivamente. En los Andes, constituye uno de los alimentos nativos de mayor digestibilidad, por su

almidón el cual se encuentra en un 23-25% de su peso en raíces (Jiménez, 2005; Velezmoro *et al.*, 2004,). La principal característica de su almidón es que tiene gránulos redondos y alargados que varían de 5 a 27 μm , haciéndolo altamente digerible (Amaya *et al.*, 2006; Jiménez, 2005) y recomendado como alimento para bebés, ancianos y personas enfermas que requieren una dieta especial (León, 2011).

El apio es un cultivo de consumo directo, del cual se consume la raíz tuberizada en Suramérica y el corno o cabeza en el Caribe. Generalmente es utilizado en sopas, puré, sancocho y cocido, y de varias otras formas dentro de platos 'gourmet' (Salas, *et al.*, 2002; Hermann, 1997). En Puerto Rico se utiliza en la elaboración de rellenitos de apio, viandas, sopas, pasteles y alcapurrias. En Brasil es utilizado en formulas deshidratadas para sopas instantáneas y comidas para bebe entre otros productos de la compañía Nestlé que contienen alrededor del 15% de almidón de apio por su alta digestibilidad y valor nutricional. En América del Sur la industrialización del producto ha tenido buena aceptación en los últimos años encontrándose en productos como comida instantánea, hojuelas (chips) de apio que reducen la temperatura de fritura, absorbe menos grasa y se empaca directo (Velezmoro *et al.*, 2004). En Colombia es usado como fécula para elaboración de pasta, galletas y bizcochos. (Hermann, 1997).

Diversidad genética

Actualmente, más de treinta especies relacionadas a este cultivo se han encontrado en América del Sur especialmente en Los Andes (Blas *et al.*, 2008; Hermann, 1997). Aunque en Perú se han encontrado más de 70 variedades o cultivares diferentes, fenotípicamente se agrupan en cuatro tipos de apio: de pulpa blanca, de pulpa amarilla, de pulpa blanca con pigmentación purpura y de pulpa amarilla con pigmentación purpura (Muñoz *et al.*, 2015; Rosso *et al.*, 2006; Hermann, 1997). En Puerto Rico las variedades que más se han adaptado y que

presentan mayor área de siembra son: la criolla, de pulpa amarilla y de pulpa blanca, siendo la de pulpa amarilla la más aceptada por su apariencia, olor, sabor y textura (Blas *et al.*, 2008; Hermann, 1997).

Enfermedades

En América del Sur, el apio es considerado un cultivo relativamente rústico de bajo mantenimiento y baja presencia de enfermedades, pero por su introducción fuera de su nicho ecológico, las enfermedades se han convertido en la mayor limitante para el cultivo, especialmente en zonas tropicales sumado al largo ciclo para una hortaliza (8 a 11 meses) que expone al cultivo a una variación de climas que contribuyen al desarrollo de plagas y enfermedades (Henz, *et al.*, 2005). Por otro lado, el tipo de propagación vegetativa por medio de hijuelos también contribuye a la ocurrencia de enfermedades en las primeras etapas del cultivo (Orlío *et al.*, 2013; Dos-Santos *et al.*, 2004). El Cultivo de apio es considerado como tolerante pero altamente perecedero y con un rápido deterioro en poscosecha, con vida útil de dos a tres días sin refrigeración y sin embalaje. El principal agente de deterioro son las enfermedades en poscosecha con un 94% de pérdidas del producto (Ribeiro *et al.*, 2007).

En Puerto Rico, la pudrición del cormo es la enfermedad más limitante y devastadora. Existen algunos estudios acerca de la enfermedad y su control. Rosa-Márquez *et al.*, 2000 y Rosa-Márquez, 1998 reportan a *Phytophthora palmivora*, *Rhizoctonia* spp. y *Fusarium* spp., como organismos asociados a la pudrición del cormo del apio, observó diferentes tipos de lesiones en pruebas de patogenicidad en invernadero, como raíces necrosadas y lesiones en la parte interna del cormo de apariencia seca y firme, además de lesiones húmedas con diferentes tonalidades. De estos patógenos, Rosa-Márquez *et al.*, 2000, señala a *Phytophthora palmivora* como el más patogénico en combinación con *Rhizoctonia* spp.

En el año 2007, Ortiz-Vázquez y colaboradores señalan que las pérdidas fueron severas e identifican a *Fusarium solani* y *Phytophthora* spp., como agentes causales de la enfermedad y para el 2008, los mismos autores, observaron incidencias de 31, 56 y 68% y severidad en hojas de 4.6, 4.4 y 5.8 (en escala del 1 al 9) en diez muestras tomadas de tres fincas productoras de apio; una en Barranquitas y dos fincas en Orocovis. Mediante aislamiento de las muestras colectadas y secuenciación de la región ITS identificaron a *Phytophthora palmivora* con un 96% de similitud, como el de mayor frecuencia, *Fusarium* spp. y *Rhizoctonia* spp. (Ortiz-Vázquez *et al.*, 2008).

Otros países han reportado *Sclerotinia sclerotiorum* (Reis *et al.*, 2011; Alvarado *et al.*, 2010; Hermann, 1997) y *Sclerotium rolfsii* (Henz, 2002) como hongos fitopatógenos del apio. Los últimos reportes realizados en Brasil por Melo y sus colaboradores en el 2016, identifican también a *Ceratosistis fimbriata* como agente causal de la pudrición negra de la arracacha, identificados por la presencia de peritecios en las raíces y en el material de propagación.

Otros estudios han identificado diversos organismos asociados a la pudrición del corno del apio. En Venezuela y Brasil, reportan a *Pectobacterium*, anteriormente, descrito como *Erwinia amilovora*, en varias publicaciones y a *Fusarium solani* en asociación con *Erwinia*. (Tapia *et al.*, 2007; Henz, 2006; Henz, 2005; García, 2000; Camino *et al.*, 1972).

En poscosecha, los patógenos que causan pérdidas significativas son: *Erwinia* spp. y *Rhizopus* spp., provocando la pudrición de las raíces; la primera produce una desintegración, a veces asociada a un mal olor causado por organismos secundarios. La pudrición de *Rhizopus* es más seca, haciendo que la parte afectada de la raíz se quiebre, presentando un aspecto de “guineo cocido”, estas son transmitidas en las semillas vegetativas disminuyendo la cantidad de

plantas en el campo (Wang *et al.*, 2012). Estas dos enfermedades ocurren cuando la cosecha se realiza en períodos calientes y lluviosos, agravándose cuando suceden procesos de fermentación en la cosecha y/o durante el transporte (Hermann, 1997; Brune *et al.*, 1996). En el caso de *Rhizopus stolonifer*, también es considerado como la enfermedad más devastadora del cultivo de apio en postcosecha en Brasil y en el cultivo de papa dulce en Carolina del Norte (Scruggs *et al.*, 2016).

Por otra parte, en Brasil algunos nematodos fitoparásitos están reportados relacionados a enfermedades causantes de los principales problemas en la raíz y cormo de apio. Los nematodos fitoparásitos reportados en Brasil pertenecen a las especies *Meloidogyne incognita* y *M. javanica* (Carval *et al.*, 2012) así como *Pratylenchus penetrans*, *P. coffeae* y *P. brachyurus*. Estos nematodos fitoparásitos han reducido la producción hasta un 100%. El mayor daño ha sido atribuido a *Pratylenchus* spp., el cual causa lesiones longitudinales en la epidermis de la raíz, provocando lesiones que sirven de entrada a bacterias, que reducen el valor comercial de las raíces. (Pinheiro *et al.*, 2013; Méndez *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 1998).

Entre los virus que afectan al cultivo del apio se encuentran los potyvirus como: Arracacha Mottle Virus (AMoV) (Sousa *et al.*, 2014) Nepovirus, o Arracacha virus A (AVA); Potato black ringspot virus-arracacha (PBRSV-A), Cheravirus, Arracacha virus B (AVB); Especies derivadas de los Potyvirus y Carlavirus Acacha virus Y (AVY), Y Arracacha latent virus (ALV), Potyvirus 1 (AP-1) (Potyvirus) en Arracacha, carlavirus 3 (AV-3) (Carlavirus) relacionados con AVY e ALV (Orílio *et al.*, 2013). El apio también presenta algunas enfermedades foliares, causadas por hongos como *Cercospora* spp., *Alternaria* spp., *Septoria* spp. y la bacteria *Xanthomonas* spp. que no causan pérdidas económicas significativas en el cultivo (Henz, 2002; Hermann, 1997) .

Control para la pudrición del corno del apio

Para el año 1998, Rosa-Márquez encontró que el fungicida más efectivo en fase '*in vitro*' fue etridiazole thiophanate-methyl, el cual controló todos los hongos asociados a la pudrición del apio. En países como Ecuador, Brasil y Perú, se recomienda el curado de la semilla vegetativa con ceniza. La desinfección con hipoclorito de sodio al 10 % por 15 minutos y secado a la sombra, por dos días antes de la siembra (Torres *et al.*, 2009). Además, la desinfección del suelo con ceniza en una dosis de 150 g por metro lineal y tratamiento a la semilla con compuestos biológicos como *Trichoderma* spp. 2.50 g con *Bacillus thuringiensis* 2.50 g y aceite de Neem 5 cm³ por litro, para reducir enfermedades transmitidas en la semilla vegetativa (Santos, 2000) y métodos que incluyen un tratamiento a la semilla seguido de un pre-enraizamiento (Santos, 1997).

En Brasil, para el control de nematodos en apio, Pinheiro (2013), recomiendan realizar una serie de medidas preventivas, como evitar semillas contaminadas con nematodos, eliminación de restos del cultivo, utilización de plantas cobertoras y antagónicas como Crotalarias (*Crotalaria spectabilis*, *C. juncea*, *C. breviflora*), clavel de muerto (*Tagetes patula*, *T. minuta*, *T. erecta*). Para el cultivo de plátano se ha recomendado también el uso de cobertoras como el haba de terciopelo (*Mucuna deeringiana*) (Chavarría-Carvajal *et al.*, 2001), rotación e intercalado de cultivos (Chavarría-Carvajal *et al.*, 2016), dejar descansar el suelo por un período de tiempo, incorporación al suelo de materia orgánica (Chavarría-Carvajal *et al.*, 1998) y la incorporación al suelo de gallinaza (Chavarría-Carvajal *et al.*, 2016). En trabajos realizados por Castillo-Almanzar (2016) y Conce-Conce (2016) la incorporación de gallinaza sola y en combinación con plantas cobertoras, como haba de terciopelo (*Mucuna deeringiana*), fueron efectivas para controlar las poblaciones de nematodos fitoparásitos en el cultivo de plátano, además incrementa las poblaciones de nematodos de vida libre, poblaciones totales de bacterias, hongos, actinomicetos y *Pseudomonas* spp. De la misma forma, trabajos

realizados en Puerto Rico por Rosado-Arroyo en el 2005, en el cultivo de calabaza, las prácticas agrícolas sustentables como la aplicación de gallinaza y la solarización del suelo fueron efectivas reduciendo las poblaciones de nematodos fitoparásitos en la raíz y el suelo.

Para el cultivo de plátano y guineo, entre los tratamientos reportados más efectivos utilizados para el control de nematodos fitoparásitos han sido DiTera® DF y Vydate® L, como lo demuestran datos obtenidos en estudios realizados por Martínez-Méndez (2016), quien encontró que la aplicación de DiTera® DF, incrementó el peso del racimo y las poblaciones de nematodos de vida libre en el suelo, Martínez-Méndez (2016) y Liqueste-González (2016) señalan que la aplicación de Vydate® L, incrementó el peso del racimo, el diámetro del pseudotallo, la altura de la planta, número de retoños y que redujo la población final de nematodos fitoparásitos al momento de la cosecha.

MATERIALES Y MÉTODOS

Identificar microorganismos patógenos en suelo asociados al cultivo de apio.

Muestreo, extracción e identificación de nematodos.

Se tomaron treinta y dos muestras de suelo en la finca de apio más afectada por la enfermedad para evaluar las poblaciones de nematodos presentes. Las muestras fueron colocadas en bolsas plásticas debidamente identificadas y puestas en neveras con hielo. Las muestras fueron transportadas al laboratorio de nematología de la Finca Alzamora de la Universidad de Puerto Rico. Los nematodos fueron extraídos mediante el método del embudo de Baermann combinado con tamices según descrito por Chavarría-Carvajal (1988). El conteo de las poblaciones y la identificación de las especies de nematodos asociadas a cada tratamiento se realizaron mediante su observación bajo un microscopio compuesto estereoscopio (Olympus SZ61, Tokio Japón) y microscopio compuesto (Olympus U-TV1X-2, Tokio Japón). Con la ayuda de claves taxonómicas (Mai and Mullin, 1996) se identificaron los principales géneros de nematodos fitoparásitos. Las poblaciones de nematodos fueron expresadas como número de nematodos por 100 cm³ de suelo. Con los datos obtenidos se procedió a calcular las frecuencias y poblaciones de cada especie de nematodos fitoparásitos y de vida libre, Figura 3 y Figura 3.

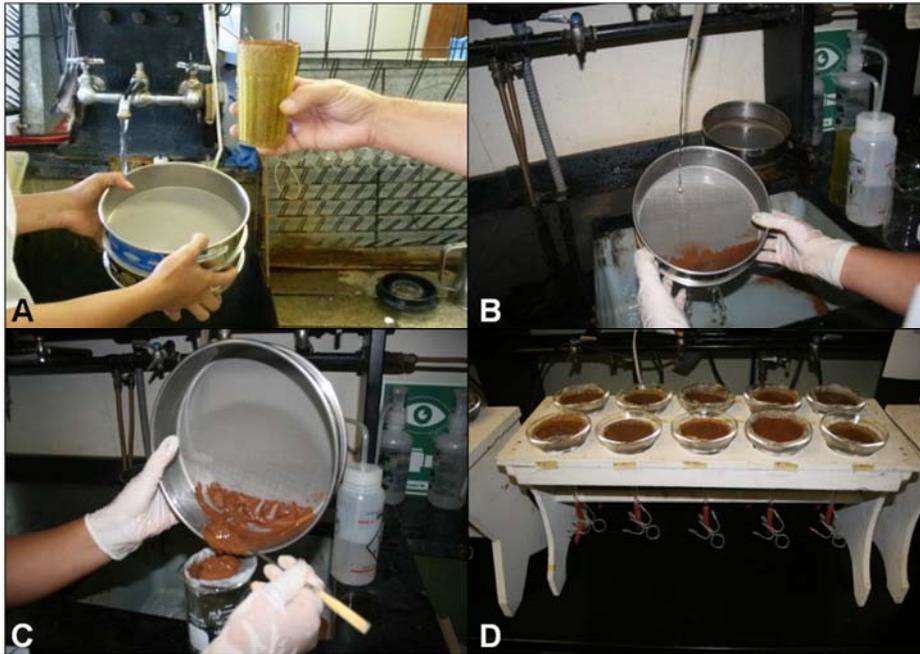


Figura 2. Metodología de extracción de nematodos de suelo. **A.** Muestra de suelo **B.** Lavado en tamices de (0.149 mm y 0.043 mm) **C.** Muestra lavada **D.** Embudo de Baermann con muestras.

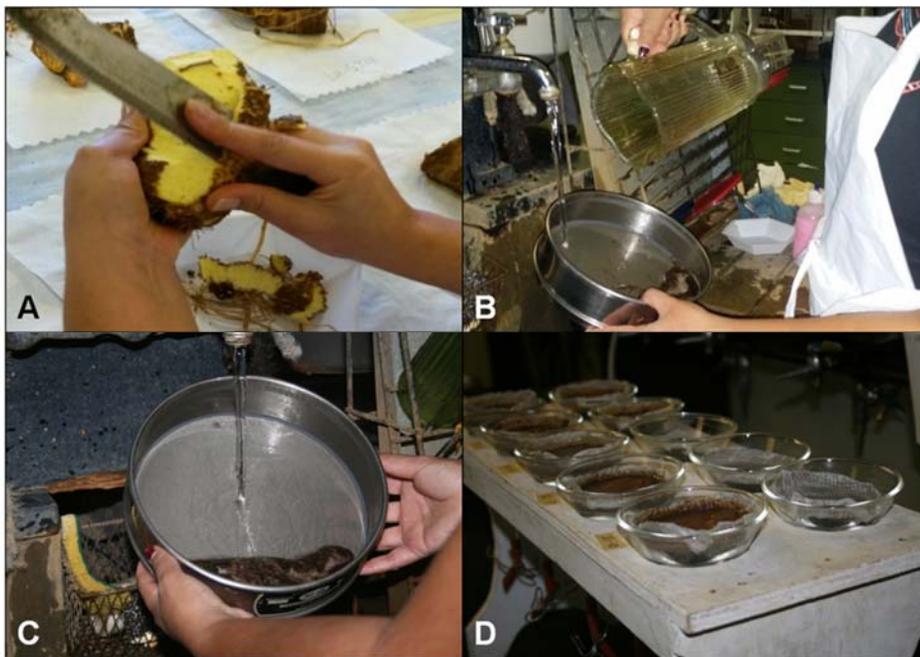


Figura 3. Metodología de extracción de nematodos de raíces y cormo. **A.** Muestra de tejido 20 g **B.** Licuado del tejido **C.** Lavado de la muestra en tamiz 0.043 mm **D.** Embudo de Baermann con muestras.

Aislamiento de hongos y bacterias

El aislamiento de hongos y bacterias se realizó mediante diluciones seriadas hasta 10^{-3} para hongos y 10^{-4} para bacterias, utilizando medios de cultivo selectivos para cada grupo. Una muestra homogénea de 10.0 g de suelo fue disuelta en 90.0 ml de agua destilada estéril, contenidos en un erlenmeyer graduado de 200 ml. La muestra se agitó con un agitador orbital (Fisher Scientific, Pittsburgh, E.E.U.U.), por 30 minutos a 150 rpm. Para el aislamiento de los hongos 100 μ l de la dilución de 10^{-3} se sembraron en placas Petri conteniendo agar de rosa de bengala y cloranfenicol (ARBC, Laboratorios EMD, Alemania). Las placas fueron incubadas por 72 horas a 28.0 °C. Para el caso de bacterias se sembró 50 μ l de la dilución 10^{-3} en agar de soya tríptico (AST 5%). Las placas conteniendo los medios de cultivo se incubaron a una temperatura de 28.0 °C por un período de 24 y 48 horas, luego se cuantificaron las colonias, mediante la ayuda de un contador de colonias, Reichert Quebec Darkfield, E.E.U.U, Figura 4.

Los valores obtenidos fueron expresados como logaritmo base 10 de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco (\log_{10} ufc/g suelo seco).

Identificación de hongos

De las cajas Petri conteniendo las colonias de hongos, se tomarán las tres colonias de mayor frecuencia, para un total de 12 colonias por tratamiento. Los hongos fueron purificados en agar de papa y dextrosa (APD), (Laboratorios Difco, E.E.U.U). Las placas se incubaron a una temperatura de 28.0 °C, para ser identificadas bajo un microscopio compuesto (Olympus U-TV1X-2, Tokio Japón) con la ayuda de claves taxonómicas (Barnett *et al.*, 2010). El almacenamiento de los hongos se realizó mediante la técnica de papel filtro con micelio disecado y se conservaron a una temperatura de -20.0 °C.

Caracterización de bacterias

Para caracterizar la población de bacterias totales, se eligieron las tres cepas con mayor frecuencia, basados en el color, textura y apariencia de la bacteria; para un total de 12 cepas por tratamiento. Las cepas se purificaron mediante estriado en placas Petri, conteniendo agar de soya tríptico (AST 5%) e incubadas a 28.0 °C por 24 horas. Se realizó la prueba de tinción de Gram, para su caracterización. La prueba consiste en fijar la bacteria en una laminilla de cristal mediante calor, seguido de la adición de soluciones (tinte cristal de violeta y safranina, solución de yodo y un decolorante compuesta de 75% alcohol etílico + 25% de acetona entre cada tinte) (Tinción de Gram, BD Company, E.E.U.U). Cada tinte y la solución de yodo se incubaron en la laminilla por espacio de un minuto, mientras que la solución decolorante por espacio de 3 segundos. Después de la aplicación de cada solución, las laminillas fueron lavadas por espacio de 5 segundos, antes de aplicar la siguiente solución. Las laminillas se secaron usando papel absorbente (Bibulous, Fisher, Toronto, Canadá) y se observaron bajo un microscopio compuesto (Olympus U-TV1X-2, Tokio, Japón), para determinar si la bacteria es Gram positivo o Gram negativo.

El almacenamiento de las muestras de bacterias se realizó en micro-placas de Elisa conteniendo TSB y glicerol. Las micro-placas fueron almacenadas a una temperatura de -20 °C, hasta su análisis.

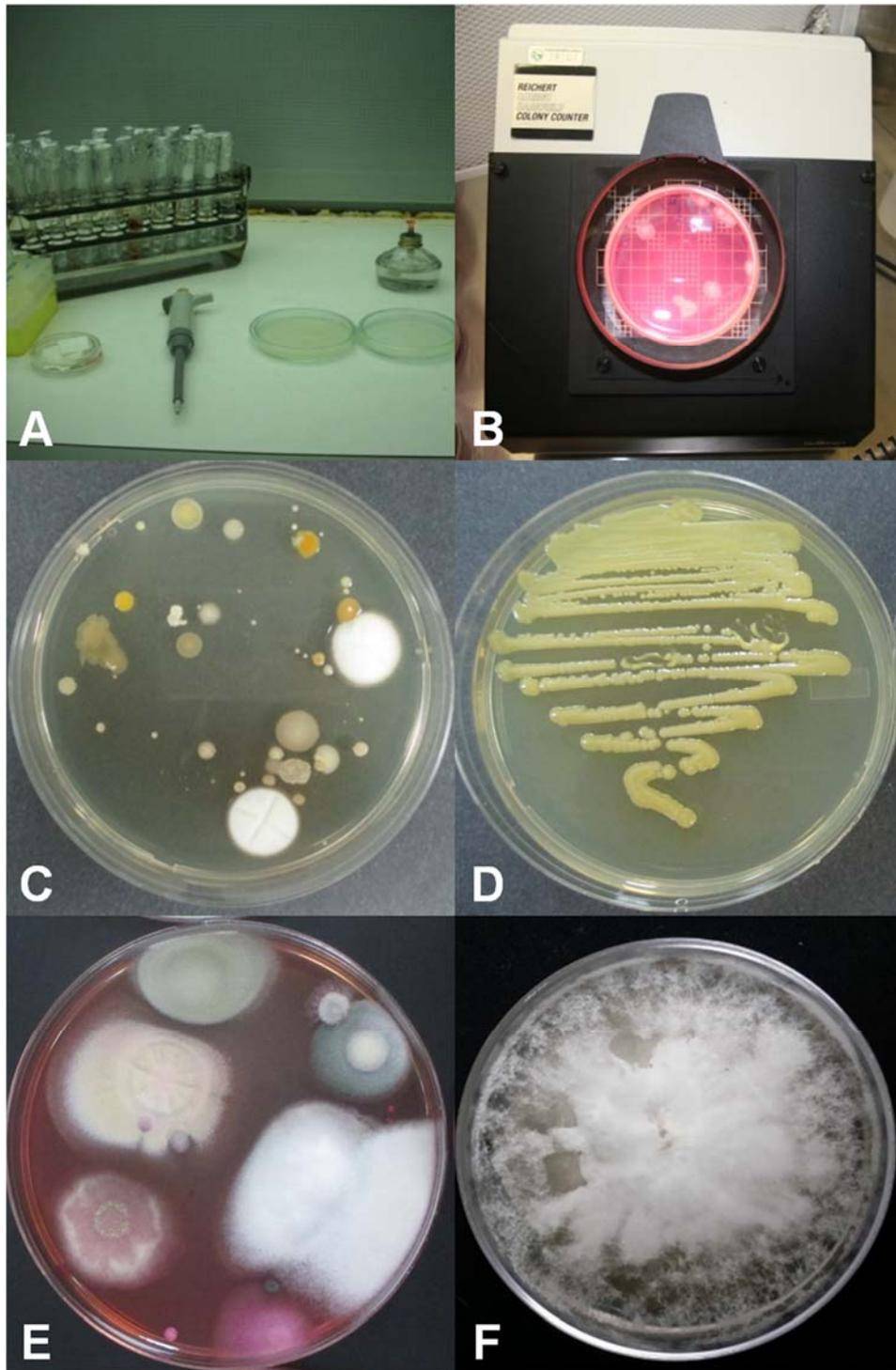


Figura 4. Método de aislamiento de hongos y bacterias en muestras de suelo. **A.** Diluciones seriadas de suelo y siembra en medios específicos para hongos y bacterias **B.** Conteo de unidades formadoras de colonias **C.D.** Purificación de bacterianas **E.F.** Purificación de hongos para su posterior caracterización.

Evaluar prácticas agronómicas que permitan reducir las pérdidas causadas por la enfermedad.

Descripción del área experimental

El predio experimental se localizó en una finca productora de apio, anteriormente sembrada con el cultivo y que mostró alta incidencia de la enfermedad y en la cual las poblaciones de nematodos fitoparásitos fueron de moderada a alta. El experimento de campo fue establecido para evaluar la efectividad de diferentes tratamientos sobre las poblaciones de nematodos fitoparásitos y la pudrición del cormo. El área experimental se localiza en la finca El Zorzal, sector La Torre, en el municipio de Barranquitas, ubicado en la región montañosa central de Puerto Rico, Figura 5, a una elevación de 943.00 m.s.n.m., la temperatura máxima promedio es de 24.0 °C y precipitación promedio anual de 1,854.20 mm. El suelo predominante en el área corresponde a la serie Humatas (Orden Ultisoles).



Figura 5. Imagen satelital de la finca El Zorzal del municipio de Barranquitas (Google Maps® 2016). Cuadro rojo corresponde al predio donde se estableció el experimento de campo.

Tratamientos

Ocho tratamientos fueron dispuestos en un diseño de bloques completos aleatorizados (DBCA) con cuatro repeticiones. El tratamiento uno constó de solarización al suelo mediante una cubierta con plástico negro de 2.54 mm de espesor (Klerk® E.E.U.U.) en la parcela durante tres meses antes de la siembra. Se realizó mediciones de temperatura tres veces por semana en el interior y fuera de la cubierta plástica. En el tratamiento dos se evaluó una rotación entre un control biológico DiTera® DF (metabolitos secundarios de *Myrothecium verrucaria*) en dosis de 140 g/m² aplicado al fondo del hoyo, al momento de la siembra y un tratamiento químico Vydate® L al suelo, a una dosis de 2.20 ml por litro de agua a los 3-4 meses después de la siembra. En el tratamiento tres se incorporó al suelo composta con gallinaza utilizada por el agricultor en una dosis de 38.0 ton/ha, combinado con solarización como fue descrito en el tratamiento uno. En el tratamiento cuatro se trataron las semillas vegetativas mediante la inmersión en una solución de Vytate® L a una dosis de 7.0 ml por litro de agua por 15 minutos y secado por un espacio de 24 horas antes de la siembra. En el tratamiento cinco se sembraron plantas cobertoras en los bancos preparados tres meses antes de la siembra a una densidad de 60 plantas por parcela, sembradas a una distancia de 0.77 m entre surcos y 0.15 m entre plantas para una densidad de 87,000 plantas por ha de cada especie, *Crotalaria juncea* y *Tagetes patula*, dos semanas antes de la siembra se cortaron e incorporaron al suelo. El tratamiento seis constó de un intercalado con maíz, como cultivo de ciclo corto y con tolerancia a *R. reniformis*, sembrado en los surcos intercalado con el apio a una distancia entre surco de 0.77 m y entre plantas 0.30 m para una densidad de 43,290 plantas por ha. El tratamiento siete integró los tratamientos 2, 3, 4 y 5 y el tratamiento ocho fue el control sin la aplicación de ninguna enmienda, solo abono sintético y desyerbe, Cuadro 2 y Figura 6.

Características de la unidad experimental

Cada unidad experimental constó de 40 plantas, sembradas en cuatro bancos a una distancia entre plantas de 0.46 m y una distancia entre bancos de 0.77 m, para una densidad poblacional de 28,232 plantas/ ha. La superficie total de la parcela experimental fue de 54.86 m² y la superficie total del experimento fue de 3,186.52 m².

Cuadro 2. Tratamientos a evaluar para el control de la pudrición del cormo en apio (*A. xanthorrhiza*), en Barranquitas, Puerto Rico.

TRATAMIENTO	
1	Solarización
2	Control biológico & químico
3	Gallinaza & Solarización
4	Desinfección semilla (Vydate® L)
5	Plantas cobertoras
6	Intercalado con maíz
7	Manejo Integrado de Plagas (Tratamientos 2+3+4+5)
8	Control

Análisis estadístico

El análisis estadístico de la información recolectada durante el transcurso de la investigación se realizó mediante la prueba de análisis de varianza (ADEVA) con un nivel de significancia de ($P \leq 0.05$). Las medias fueron comparadas utilizando la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), utilizando el programa InfoStat versión 2012 de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina (Di Rienzo *et al.*, 2012) y el programa SAS versión 9.4 (SAS, 2004). Las variables que no presentaron homogeneidad de varianzas ni normalidad de errores, se transformaron mediante \log_{10} para su posterior análisis. Las variables evaluadas por planta fueron analizadas como un modelo general mixto.



Figura 6. Tratamientos evaluados para reducción de poblaciones de nematodos asociados al cultivo de apio. **A.** Solarización **B.** Control químico y biológico **C.** Incorporación de composta con gallinaza al suelo **D.** Desinfección de la semilla **E.** Siembra de plantas cobertoras **F.** Intercalado con maíz.

Preparación del predio experimental

La preparación del suelo consistió en dos pasos de arado, uno de rastra y el surcado realizado con bueyes. La distribución de los tratamientos se realizó dos días después de la preparación y tres meses antes de la siembra para poder aplicar los tratamientos previos a la siembra como la solarización del suelo, la aplicación de gallinaza más solarización, el manejo integrado y la siembra de plantas cobertoras.

El control de malezas se realizó aplicando glifosato a una dosis de 10 ml por litro de agua, ocho días antes de la siembra, y durante el ciclo de cultivo las malezas se controlaron manualmente conjuntamente con aterramiento de las plantas.

El material de propagación, semilla vegetativa, utilizado para el experimento de campo fue obtenida de fincas dedicadas al cultivo del apio en la zona de Barranquitas. La semilla se almacenó un día bajo sombra y se seleccionó en base a su tamaño y apariencia.

Variables evaluadas

Temperatura del suelo: en los tratamientos con solarización se midió la temperatura máxima y mínima en (°C) durante la aplicación de estos tratamientos para determinar la efectividad del tratamiento

Porcentaje de brotación: Se evaluó el porcentaje de plantas brotadas por parcela al primer, segundo y tercer mes. Esta variable se usa para evaluar la calidad del material vegetativo y el vigor de la semilla utilizada. Además, esta variable se usó como co-variable para el análisis estadístico del experimento y se expresó como porcentaje de brotación.

Rendimiento por parcela: los cormos cosechados en cada parcela se pesaron usando una balanza digital y fueron expresados en toneladas métricas por hectárea.

Severidad de la enfermedad para comercialización: al momento de la cosecha se evaluó el porcentaje de tejido enfermo o con síntomas de pudrición, este porcentaje se utilizó para determinar el valor binomial con un primer nivel que correspondía a los cormos con porcentaje de hasta 10% con presencia de enfermedad y el segundo nivel a aquellos cormos con porcentajes mayores a 11 %, ya que un cormo con más de 10% de enfermedad no es comerciable. Específicamente para esta variable se realizó un análisis de *Chi* cuadrado para verificar la independencia de la variable a los tratamientos aplicados con un nivel de significancia del 5%. (Niveles, 1 = 0-9% del tejido con sintomatología y 2 = niveles mayores o iguales a 10%).

Poblaciones de nematodos: se realizó el conteo de cada especie de nematodos fitoparásitos y de vida libre en cada muestreo para evaluar la acción de los diferentes tratamientos en raíces y cormos después de la cosecha. Las poblaciones fueron expresadas como número de nematodos por 100 cm³ de suelo y número de nematodos 100 g de tejido radical.

Población de hongos y bacterias: se evaluó el cambio de poblaciones de hongos y bacterias fitopatógenos y benéficas para cada tratamiento al inicio y final del ciclo del cultivo y se expresó en logaritmo base diez de unidades formadoras de colonias por cada gramo de suelo seco (\log_{10} ufc/ g suelo seco).

Muestras: Posterior al trazado de cada parcela experimental, se tomó una muestra de suelo por parcela experimental. Cada muestra de suelo evaluado corresponde a una muestra compuesta de tres sub-muestras, con el propósito de

obtener una muestra representativa por parcela experimental. Las muestras se tomaron a una profundidad de 15.0 cm, siguiendo un patrón en zig-zag.

En total se realizaron cuatro muestreos de suelo y un muestreo de raíces al final de la cosecha. El primer muestreo, se realizó después del trazado de las unidades experimentales con el objetivo de evaluar la población inicial de nematodos fitoparásitos, nematodos de vida libre, población total de hongos y bacterias. Adicionalmente, se realizó el análisis químico del suelo. El segundo muestreo se realizó antes de la siembra del experimento, con el propósito de medir el efecto de los tratamientos aplicados (T1, T3, T7 y T5) sobre las poblaciones de nematodos fitoparásitos y nematodos de vida libre estos tratamientos necesitaron de un lapso de tiempo de hasta 3 meses para actuar en el suelo. El tercer muestreo se realizó a los cuatro meses después de la siembra, para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la población de nematodos fitoparásitos y de vida libre. El cuarto muestreo fue de suelo y cormo al momento de la cosecha del experimento, con el propósito de determinar el efecto de los tratamientos sobre las poblaciones de nematodos asociados al suelo y cormo; así como las poblaciones de hongos y bacterias asociadas al suelo.

Realizar pruebas de patogenicidad para identificar microorganismos asociados a la enfermedad.

Muestras de tejido vegetal de cormos enfermos provenientes de fincas comerciales fueron colectadas y llevadas al laboratorio de BNF de la Finca Alzamora, Colegio de Ciencias Agrícolas, Universidad de Puerto Rico. De cada muestra se aislaron hongos y bacterias asociados al tejido vegetal enfermo. Mediante la preparación de cámaras húmedas se obtuvieron las estructuras reproductivas de hongos y cepas bacterianas asociadas al tejido. Los microorganismos fueron aislados en medios de cultivo específicos (APD para hongos y AST 5% para bacterias). Cada uno de los microorganismos obtenidos fue

purificado en medios de cultivo selectivos. En el caso de hongos se realizó un cultivo monospórico para obtener colonias puras y las bacterias se purificaron mediante cuatro estriados en AST 5%. Cada aislamiento obtenido se inoculó en discos de apio sanos para aplicar los postulados de Koch, Figura 7.

Previo a la inoculación se realizó la desinfección del material vegetal sano mediante la inmersión en hipoclorito de sodio al 20% por 15 minutos, seguido de tres lavados con agua destilada estéril por espacio de 20 minutos cada uno. El tejido se secó durante dos horas en una cámara de flujo laminar, para posteriormente ser cortados en rodajas de aproximadamente 2.5 cm de espesor.

Para el caso de hongos se utilizaron discos de agar con micelio, que fueron colocados entre dos rodajas de tejido (tipo emparedado) mediante un sacabocados y colocados en el centro, posteriormente el tejido se colocó en una cámara húmeda individual utilizando cajas Petri de cristal con papel humedecido. Las cámaras se incubaron a temperatura ambiente por 24 horas, hasta su evaluación.

Para el caso de bacterias, cada colonia fue sembrada en tubos de ensayo con caldo nutriente (TSB) para ponerlos a crecer durante 12 horas en un agitador orbital a 150 rpm. Se midió la transmitancia de cada muestra para realizar la inoculación con colonias homogenizadas a 0.4 unidades de transmitancia que representa una concentración de 1.00×10^7 unidades formadoras de colonias por ml (cfu ml⁻¹). Un volumen de 5 µl de cada suspensión se colocó en el centro de los discos de apio, previamente desinfectados y colocados en una cámara de incubación por 24 horas en temperatura ambiente.

Las pruebas de patogenicidad estuvieron dispuestas en un diseño completamente aleatorizado, con cuatro repeticiones. Se midió el diámetro de crecimiento (cm) de la colonia o tejido infectado por cada microorganismo, a las 24, 48 y 72 horas después de la inoculación. En el caso de aquellos hongos y bacterias

que resultaron positivos y con mayor virulencia, se realizó su caracterización e identificación morfológica y genética para determinar el género y especie de cada una.

Para la caracterización morfológica de hongos se realizó mediante claves taxonómicas y especialmente para aquellos hongos pertenecientes al género *Fusarium* se utilizó la metodología y claves descritas por (Leslie, *et al.*, 2006; Summerell *et al.*, 2003). Las características tomadas fueron específicas para cada medio de cultivo (PDA y Agar-Agua). La descripción de conidios se realizó mediante el programa PAX-it™ Imaging Software a un lente de magnificación de 40x y 100x mediante el uso del microscopio Olympus Ix 71 con óptica de contraste interdifereencial, Nomarski (DIC).

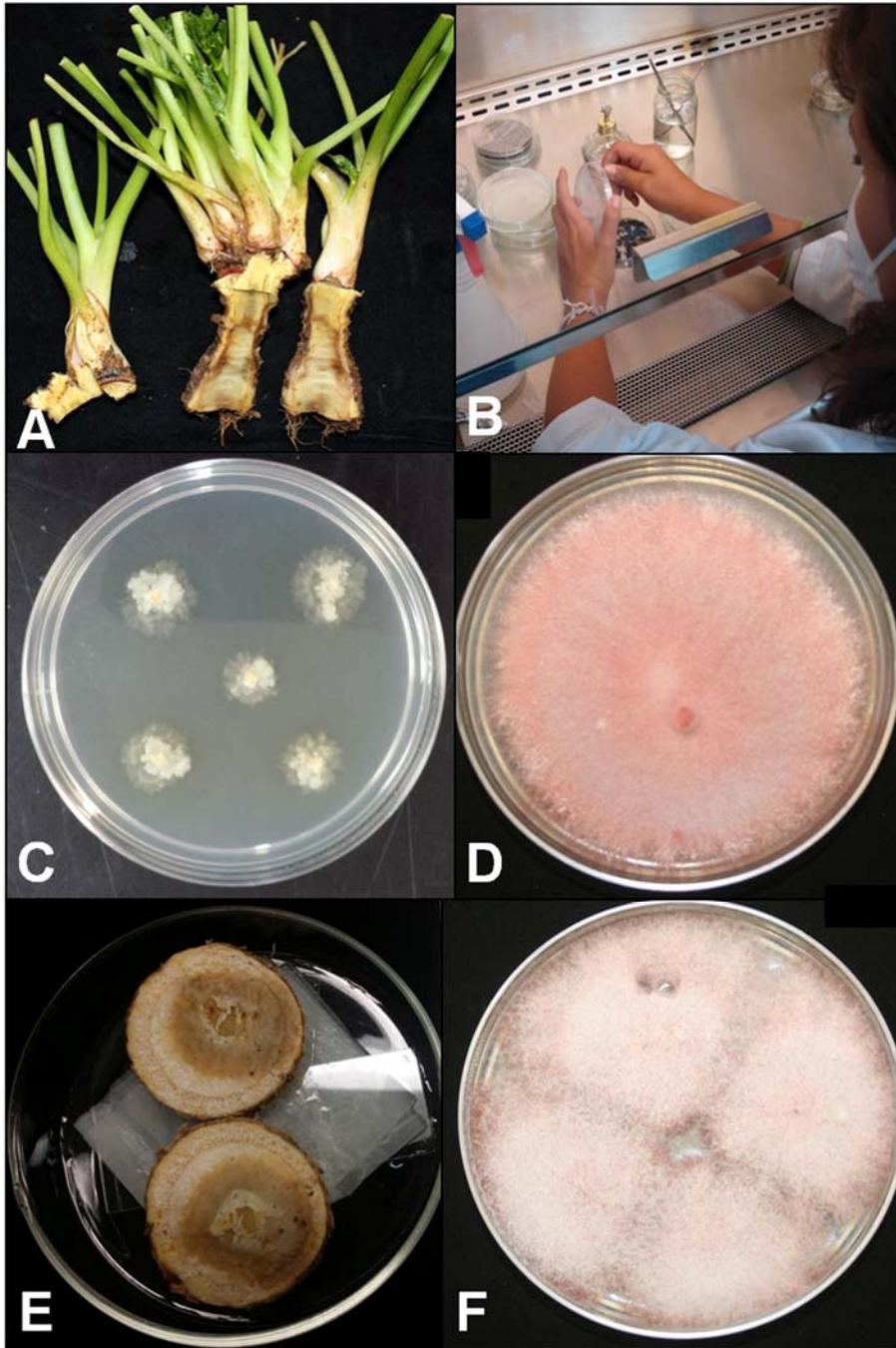


Figura 7. Aislamiento de organismos asociados a la pudrición del corno. **A.** Síntomas **B.** Siembra de tejido infectado en medios específicos **C.** Crecimiento de organismos en medios específicos **D.** Organismo Purificado **E.** Inoculación y reproducción de síntomas **F.** Re-aislamiento del organismo.

Para la identificación molecular, los aislamientos fueron transferidos a erlenmeyers con 120 ml de caldo de agar de papa y dextrosa (PDA) e incubados por tres días en un agitador orbital a 100 rpm. A 28.0 °C Posteriormente se extrajo el micelio mediante embudos Buchner con papel filtro y bomba de extracción al vacío. El micelio se colocó en tubos eppendorf con cristales que ayudaron a romper el tejido de los hongos al colocarlos en un Fast pred TM (Bio 101 Tehermo Electron Corporation EP-200) por dos minutos. La extracción del ADN se realizó mediante el kit de extracción Qiagen DNeasy Plant Mini Kit (Cat. No. 69106). Se añadieron 400 µl de buffer AP1 y 4 µl de RNAsa en cada muestra para crear la lisis celular. Seguido, las muestras se incubaron en baño María a 65.0 °C por una hora y se centrifugaron a 12500 rpm por dos minutos. El sobrenadante fue recolectado y transferido a otro tubo de 1.5 ml, se añadió 130 µl de la solución P3 y se colocó en hielo por cinco minutos. Los nuevos tubos se centrifugaron a 13500 rpm por cinco minutos. El contenido se pasó por una columna violeta y se centrifugó de nuevo a 13500 por dos minutos. 200 µl del sobrenadante se transfirieron a una columna traslucida en la cual se añadió 3000 µl de la solución AW1. La columna traslucida se centrifugó por dos minutos a 13500 y se descartó el líquido que pasó por la columna traslucida. 500 µl de la solución AW2 fueron colocados en la columna y se centrifugó a 13500 rpm por 2 minutos. La columna transparente se colocó en un nuevo tubo y se agregó 50 µl de la solución AE para pasar en incubación a temperatura ambiente por 5 minutos. Finalmente se centrifugó a 13500 rpm por un minuto y se guardaron a -20 °C hasta su posterior uso.

La concentración del ADN se midió con un nanofotómetro, Nano Photometer P-330 Class. La amplificación del ADN se realizó con los genes del Espacio transcripto interno (ITS) y Factor de elongación (EF), según Summerell, *et al.*, 2003; Wang, *et al.*, 2013, Cuadro 3. La reacción estuvo constituida por 10 µl de de Amplitaq Gold® (ADN Polimerasa; Applied Biosystems Cat. No. 4390939), 1.5 µl de cada primer, 4 µl de agua deionizada y 3 µl de la muestra de ADN con una concentración de 20 a 25 ng/µl. Todas las muestras se corrieron en un termociclador Eppendorf vapo.

protect AG, 22331, NJ. Los parámetros fueron ajustados de acuerdo a las recomendaciones de manufactura de la enzima Amplitaq Gold®; para desnaturalización se realizó por 10 minutos a 95.0 °C, 35 ciclos de 96.0 °C por 3 segundos, la temperatura de alineamiento según el cebador por 3 segundos, la hibridación a 68.0 °C por 15 segundos y una extensión final de 72.0 °C por 10 segundos. Las temperaturas de alineamiento para los cebadores específicos fueron: para la ITS a 50.0 °C y para EF a 53.0 °C.

Cuadro 3. Genes y cebadores específicos utilizados en la identificación molecular de aislamientos de *Fusarium* asociados a la pudrición del corno de apio.

GEN	CEBADOR	DIRECCIÓN	SECUENCIA 5'-3'	REFERENCIA
ITS	ITS1 17893255			Wang, <i>et al.</i> , 2014
	3	Adelante	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTA	
	ITS4 17142923	Reverso	TCCTCCGCTTATTGA TATGC	O'Donell, 1992
9				
EF1 19150491	Adelante	ATGGGTAAGGARGACAAGAC		
EF	2	Reverso	GGARGTACCAGTSATCATGTT	
	EF2 19150491			
	3			

El producto de PCR se pudo observar en un gel de agarosa (Agarose, OmniPur™; Merk Millipore) al 1.2% con 2.5 µl Gel Red (Gel Red™ Nucleic Acid, BIOTIUM) obtenido mediante la técnica de electroforesis con un buffer de 1X Tris-acetate-EDTA. El marcador molecular de 100 bp (DNA Ladder, Promega) se diluyó en 4.0 µl de agua deionizada y 1.0 µl de tinte (GelPilot Loading Dye 5x, Cat. No. 239901). Para la electroforesis se utilizó 110 voltios y 400 mAmps por 60 min. y la visualización del gel se realizó en un transiluminador de rayos ultravioletas (SIGMA™, T 1202). La secuenciación de las muestras se realizó en la compañía comercial MacroGen, USA para lo cual las muestras fueron preparadas según las recomendaciones de la compañía. Las secuencias enviadas fueron editadas

manualmente en el programa Biological Sequence Alignment Editor, Version 7.2.5 (BioEdit) Hall, 1999. El análisis de secuencias se realizó en BLAST (Basic Local Allingment Search Tool) ([Http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi)). Para la selección de secuencias similares se escogieron aquellas con el porcentaje de mayor homología al alinearlas con el consenso obtenido.

Los arboles filogenéticos se obtuvieron con todas las secuencias de los aislamientos y sus homólogos mediante el programa MEGA 6.06. Taruma *et al.*, 1993. El método estadístico utilizado fue de "Maximum Likelihood" con los parámetros establecidos en el programa.

Para la caracterización de las bacterias, se seleccionaron aquellas que resultaron positivas para las pruebas de patogenicidad. Morfológicamente se evaluaron parámetros como: tamaño, color de las colonias, márgenes y elevación. Además, se realizaron las pruebas bioquímicas de tinción Gram (Fisher Science Education, Cat. No. 525345) (Schaad *et al.*, 2001), catalasa, oxidasa, K(OH) y degradación de almidones en papa (Lelliot *et al.*, 1966), crecimiento en condiciones aerobias y anaerobias. Posteriormente, la identificación molecular mediante la amplificación del ADN con cebadores pertenecientes a la región 16S rARN. Para la identificación molecular, las muestras se enviaron a las facilidades del departamento de Protección Vegetal de la Universidad Florida en Gainesville.

RESULTADOS

Primer objetivo: Identificar microorganismos patógenos en suelo asociados al cultivo de apio.

De las 32 muestras de suelo que se tomaron previo al experimento se analizaron poblaciones de nematodos, hongos y bacterias.

Nematodos:

En las muestras analizadas se observó la presencia de *Rotylenchulus reniformis*, *Helicotylenchus multincinctus* y *Pratylenchus coffeae*. *R. reniformis* que fue la especie de mayor frecuencia con un 85.6% y una población de 382 larvas por 100 cm³ de suelo; *H. multincinctus* se encontró en una frecuencia de 8.2% y un nivel poblacional de 37 larvas por 100 cm³ de suelo; *P. coffeae*, presentó la población más baja, con una frecuencia de 0.7 % y población de 3 larvas por 100 cm³ de suelo, Figura 8. Adicionalmente, se observó la presencia de nematodos de vida libre, con una frecuencia de 5.8% y niveles poblacionales de 26 larvas por 100 cm³ de suelo.

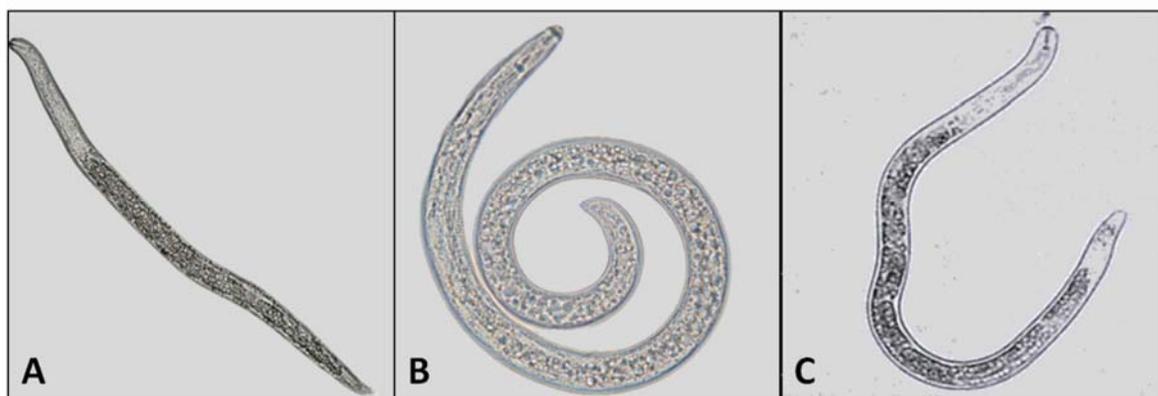


Figura 8. Especies de nematodos fitoparásitos encontrados en suelo y asociados al cultivo de apio (*A. xanthorrhiza*) **A.** *Rotylenchulus reniformis* (foto de Chavarria-Carvajal *et al.*, 2017) **B.** *Helicotylenchus multincinctus* **C.** *Pratylenchus coffeae*.

Hongos:

Los hongos encontrados en mayor abundancia fueron: *Paecilomyces* spp. con una frecuencia de 27.0 %; *Penicillium* spp. y una frecuencia de 18.8 %; *Fusarium* spp. con frecuencia de 15.4 %; *Aspergillus* spp. con una frecuencia de 12.0 %; *Trichoderma* spp. con frecuencia de 9.5 % ; *Mucor* spp. a una frecuencia de 4.8 % y *Stemphylium* spp. con una frecuencia de 4.0 % entre otros géneros presentes en menor población. En la Figura 9 y Figura 10, se pueden observar las características macroscópicas y microscópicas de cada hongo, utilizadas en su identificación. En promedio se observaron 3.81 log₁₀ ufc por gramo de suelo seco, valor que se usó en los siguientes muestreos, para comparar el efecto de los tratamientos aplicados en el experimento.

Bacterias:

Para el caso de bacterias el 89.0 % de las colonias fueron caracterizadas como gram negativas y se presentaron en un valor promedio de 4.53 log₁₀ ufc por gramo de suelo seco, al igual que para hongos este valor se contrastó con los resultados obtenidos después de aplicar los tratamientos en el experimento.

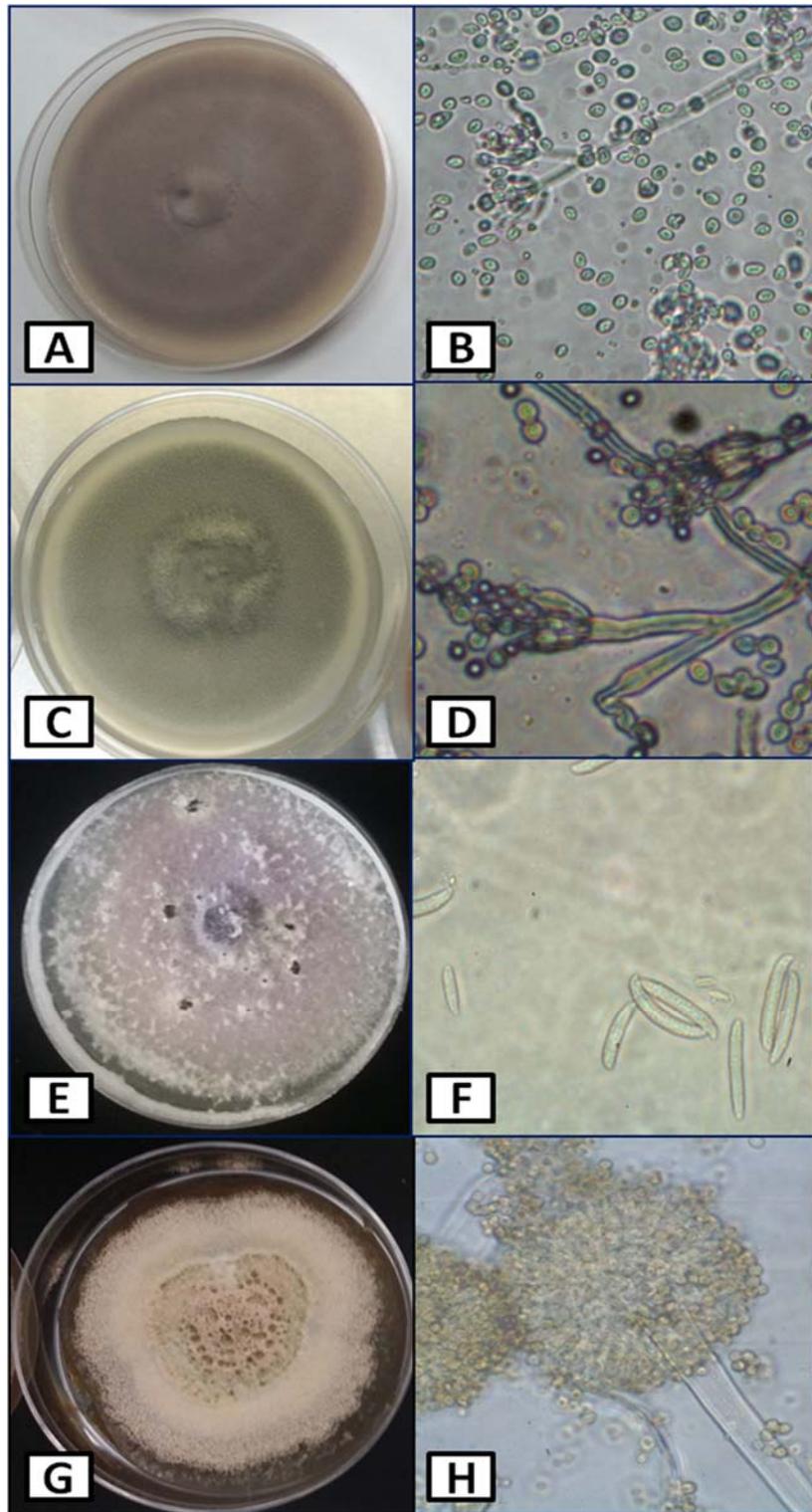


Figura 9. Características macroscópicas y microscópicas (40x) de hongos identificados en muestras de suelo del cultivo de apio. **A. B.** Colonia y Conidióforo de *Paecilomyces* **C. D.** Colonia y Esporangio de *Penicillium* spp. **E. F.** Colonia y Conidios de *Fusarium* spp. **G. H.** Colonia y Conidios de *Aspergillus* spp.

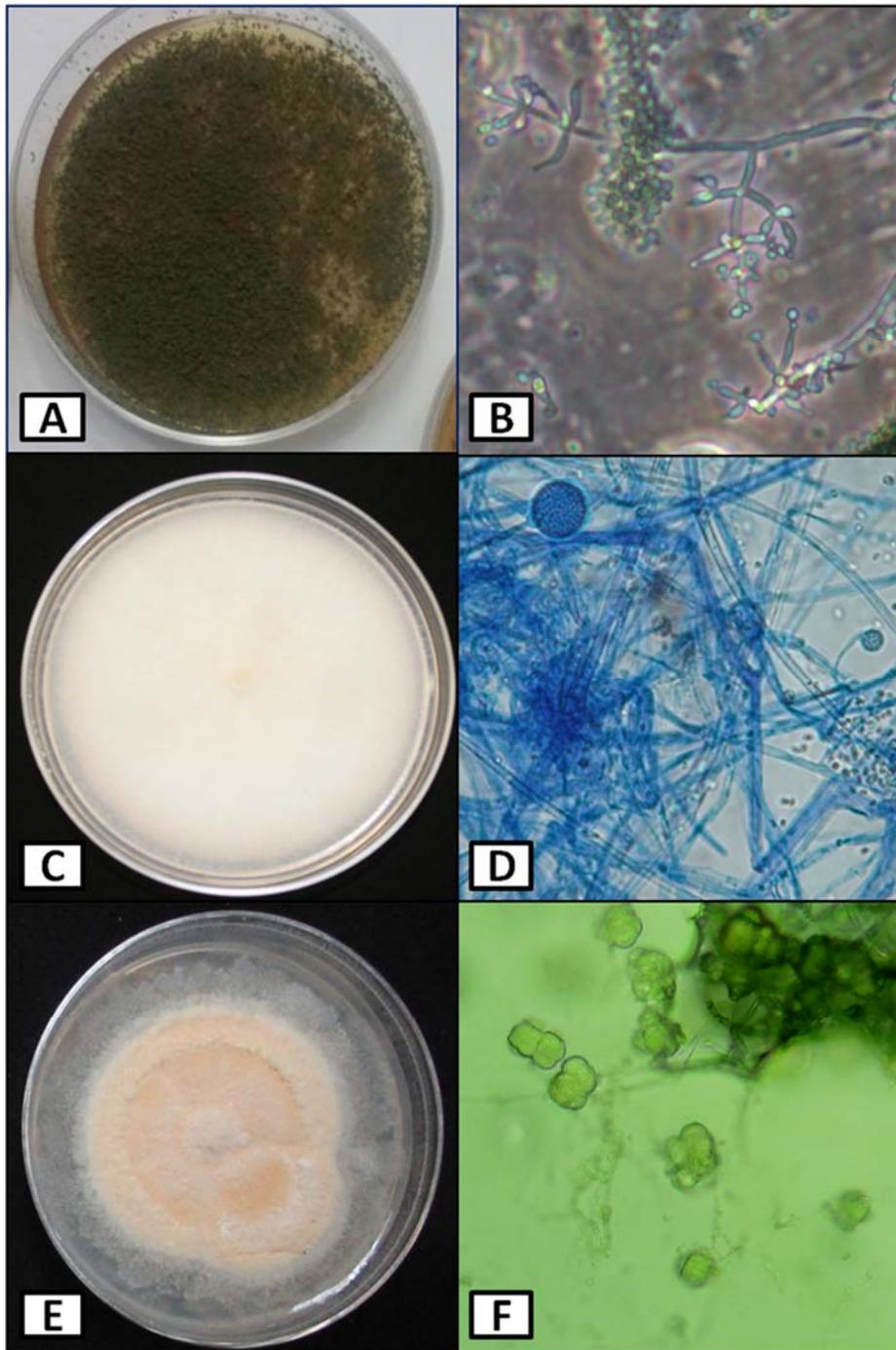


Figura 10. Características macroscópicas y microscópicas (40x) de hongos identificados en muestras de suelo del cultivo de apio. **A. B.** Colonia y Conidióforo de *Trichoderma* spp. **C. D.** Colonia y Esporangio de *Mucor* spp. **E. F.** Colonia y Conidios de *Stemphylium* spp.

Segundo objetivo: Evaluar prácticas agronómicas que permitan reducir las pérdidas causadas por la enfermedad.

Población de nematodos para el primer muestreo.

Para evaluar la efectividad de los tratamientos, se contabilizó la población inicial de nematodos en las parcelas experimentales antes de la aplicación de los tratamientos. El Cuadro 4, muestra el promedio de las poblaciones de nematodos fitoparásitos y nematodos de vida libre durante el primer muestreo. Los valores para cada especie de nematodos fueron, expresados como número de nematodos por 100 cm³ de suelo. Durante el análisis de varianza no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$), para las diferentes especies de nematodos. En general, se encontró un valor promedio de 418.79 larvas de nematodos fitoparásitos por 100 cm³ de suelo, de los cuales 382.18 larvas correspondieron a *R. reniformis* y 48.30 larvas a *H. Multicinctus*. La población promedio de nematodos de vida libre fue de 25.91 larvas/ 100 cm³ de suelo.

Cuadro 4. Promedios de poblaciones inicial de nematodos fitoparásitos y de vida libre en suelo de una finca comercial de apio (*A. xanthorrhiza*) previa a la aplicación de los tratamientos ^{1,2}.

TRATAMIENTO	<i>R. reniformis</i>	<i>H. multicinctus</i>	Total Fitoparásitos ³	Nematodos vida libre ⁴
Solarización	503.40 a	43.38 a	546.78 a	29.1 a
Biológico & Químico	340.75 a	26.00 a	366.75 a	31.83 a
Gallinaza & Solarización	355.25 a	26.33 a	381.58 a	20.78 a
Desinfección semilla	452.78 a	62.78 a	515.56 a	32.75 a
Plantas cobertoras	340.48 a	36.03 a	376.51 a	27.7 a
Intercalado	342.60 a	19.53 a	362.13 a	24.15 a
Manejo Integrado	377.55 a	53.70 a	431.25 a	14.18 a
Testigo	344.63 a	25.10 a	369.73 a	26.78 a
Promedio	382.18	48.30	418.79	25.91

1 Promedio de 4 repeticiones. Letras distintas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$), según Tukey para datos transformados log₁₀.

2 Valores expresados como: número nematodos/100 cm³ de suelo (sin transformar).

3 Total Fitoparásitos incluyen: *Rotylenchulus reniformis* y *Helicotylenchus multicinctus*.

4 Nematodos vida libre incluyen: Rabditidos, Dorylaimidos y Aphelenchidos.

Población de nematodos para el segundo muestreo

El segundo muestreo se realizó después de aplicar aquellos tratamientos que necesitaban de al menos tres meses antes de la siembra, para tener un efecto en el suelo. Del análisis de varianza no se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$), entre tratamientos. El Cuadro 5 muestra el efecto de los tratamientos sobre las poblaciones de nematodos fitoparásitos y nematodos de vida libre en suelo durante el segundo muestreo. En general se observó una leve reducción en las poblaciones de nematodos fitoparásitos y un incremento en la población de nematodos de vida libre. El total de nematodos fitoparásitos fue de 301.54 nematodos por 100 cm³ de suelo, de los cuales *R. reniformis* alcanzó 291.61 larvas y *H. multincinctus* 9.93 larvas. El promedio de la población de nematodos de vida libre fue de 50.13 larvas por 100 cm³ de suelo.

Cuadro 5. Efecto de los tratamientos sobre las poblaciones de nematodos fitoparásitos y nematodos de vida libre en suelo durante el segundo muestreo ^{1,2}.

TRATAMIENTO	<i>R. reniformis</i>	<i>H. multincinctus</i>	Total Fitoparásitos ³	Nematodos vida libre ⁴
Solarización	346.18 a	12.45 a	358.63 a	59.25 a
Biológico & Químico	407.38 a	11.83 a	419.21 a	36.63 a
Gallinaza & Solarización	123.53 a	9.20 a	132.73 a	59.20 a
Desinfección semilla	256.60 a	12.45 a	269.05 a	29.70 a
Plantas cobertoras	227.50 a	3.85 a	231.35 a	62.65 a
Intercalado	370.45 a	6.45 a	376.9 a	68.03 a
Manejo Integrado	518.30 a	10.45 a	528.75 a	32.18 a
Testigo	82.90 a	12.78 a	95.68 a	53.38 a
Promedio	291.60	9.93	301.54	50.13

¹ Promedio de 4 repeticiones. Letras distintas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$), según Tukey para datos transformados log₁₀.

² Valores expresados como: número de nematodos/100 cm³ de suelo (sin transformar).

³ Total Fitoparásitos incluyen: *Rotylenchulus reniformis* y *Helicotylenchus multincinctus*.

⁴ Nematodos vida libre incluyen: Rabditidos, Dorylaimidos y Aphelenchidos.

Población de nematodos para el tercer muestreo.

El Cuadro 6, muestra el efecto de los tratamientos sobre las poblaciones de nematodos fitoparásitos y nematodos de vida libre en suelo, cuatro meses después de la siembra. Del análisis de varianza por tratamiento, se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) para las poblaciones de *R. reniformis*. El promedio total de nematodos fitoparásitos encontrados fue de 234.27 nematodos por 100 cm³ de suelo. Este valor consiste de 227.71 larvas de *R. reniformis*, y 6.56 larvas de *H. Multicinctus*. La población total de nematodos de vida libre fue de 65.64 larvas por 100 cm³ de suelo.

Cuadro 6. Efecto de los tratamientos sobre las poblaciones de nematodos fitoparásitos y nematodos de vida libre en suelo, cuatro meses después de la siembra ^{1,2}.

TRATAMIENTO	<i>R.</i> <i>reniformis</i>	<i>H.</i> <i>multicinctus</i>	Total Fitoparásitos ³	Nematodos vida libre ⁴
Solarización	387.83 c	7.05 a	394.88 c	50.33 a
Biológico & Químico	177.55 bc	7.23 a	184.78 bc	48.75 a
Gallinaza & Solarización	72.48 ab	4.93 a	77.41 ab	49.73 a
Desinfección semilla	307.53 bc	10.78 a	318.31 bc	52.45 a
Plantas cobertoras	193.83 bc	8.78 a	202.61 bc	109.38 a
Intercalado	63.37 ab	3.25 a	66.62 a	46.33 a
Manejo Integrado	128.13 ab	3.53 a	131.66 a	114.45 a
Testigo	490.93 c	6.93 a	497.86 c	53.70 a
Promedio	227.71	6.56	234.27	65.64

¹ Promedio de 4 repeticiones. Letras distintas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$), según Tukey para datos transformados \log_{10} .

² Valores expresados como: número nematodos/100 cm³ de suelo (sin transformar).

³ Total Fitoparásitos incluyen: *Rotylenchulus reniformis* y *Helicotylenchus multicinctus*.

⁴ Nematodos vida libre incluyen: Rabditidos, Dorylaimidos y Aphelenchidos.

Población de nematodos para el cuarto muestreo.

Del análisis de varianza por tratamientos se observaron diferencias significativas para los nematodos *R. reniformis* y *H. multicinctus*. A diferencia de los

anteriores muestreos, se identificaron otras especies de nematodos fitoparásitos presentes en muy bajas poblaciones en suelo como son: *Pratylenchulus coffeae* con promedio de 10.88 nematodos por 100 cm³ de suelo y *Tylenchulus* spp., con promedio de 0.56 nematodos por 100 cm³ de suelo. El Cuadro 7 muestra los niveles poblacionales de nematodos encontrados; para total de nematodos fitoparásitos se observaron 1228.09 nematodos por 100 cm³ de suelo, de los cuales *R. reniformis* presentó un promedio de 1122.03 larvas y *H. multincinctus* 94.62 larvas. Para los nematodos de vida libre se observó una población de 59.31 nematodos por 100 cm³ de suelo.

Población de nematodos en tejido radicular al momento de la cosecha.

Del análisis de varianza por tratamientos, no se observaron diferencias significativas en las raíces del cultivo de apio. Para el caso de las raíces no se encontraron poblaciones altas de nematodos fitoparásitos. En el Cuadro 8 se pueden observar los promedios para cada tratamiento y cada especie. Para el total de nematodos fitoparásitos se encontraron 47.76 larvas, para la especie *R. reniformis*, 0.91 larvas para *H. multincinctus* y 0.71 larvas de *Tylenchus* spp., de un total de 46.14 nematodos fitoparásitos por 100 cm³ de suelo. Los nematodos de vida libre también estuvieron presentes en las raíces del cultivo de apio con un promedio de 21.01 nematodos por 100 cm³ de suelo.

Cuadro 7. Efecto de los tratamientos sobre las poblaciones de nematodos fitoparásitos y nematodos de vida libre en suelo, al momento de la cosecha ^{1,2}.

TRATAMIENTO	<i>R. reniformis</i>	<i>H. multicinctus</i>	<i>P. coffeae</i>	<i>Tylenchus</i> spp.	Total fitoparásitos ³	Vida Libre ⁴
Solarización	656.78 ab	64.33 bc	5.25 a	1.23 a	727.59 abc	35.38 a
Biológico & Químico	1814.93 c	109.23 c	30.48 a	0.00 a	1954.64 c	51.85 a
Gallinaza & Solarización	240.78 a	18.90 a	3.68 a	0.15 a	263.51 a	29.40 a
Desinfección semilla	874.95 abc	89.55 bc	11.08 a	0.00 a	975.58 abc	57.40 a
Plantas cobertoras	930.33 abc	148.95 bc	4.00 a	0.78 a	1084.06 abc	83.68 a
Intercalado	476.00 ab	45.98 ab	0.90 a	0.93 a	523.81 ab	36.48 a
Manejo Integrado	1457.55 bc	71.83 bc	3.38 a	0.45 a	1533.21 bc	77.70 a
Testigo	2524.93 c	208.15 c	28.30 a	0.93 a	2762.31 c	102.60 a
Promedio	1122.03	94.62	10.88	0.56	1228.09	59.3

¹ Promedio de 4 repeticiones. Letras distintas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$), según Tukey para datos transformados \log_{10} .

² Valores expresados como: número de nematodos/100 cm³ de suelo (sin transformar).

³ Total Fitoparásitos incluyen: *Rotylenchulus reniformis* y *Helicotylenchus multicinctus*, *Pratylenchus coffeae* y *Tylenchus* spp.

⁴ Nematodos vida libre incluyen: Rabditídeos, Dorylaimidos y Aphelenchidos.

Cuadro 8. Efecto de los tratamientos sobre las poblaciones de nematodos fitoparásitos y nematodos de vida libre en raíz, al momento de la cosecha ^{1,2}.

TRATAMIENTOS	<i>R. reniformis</i>	<i>H. multicinctus</i>	<i>P. Coffeae</i>	Total ³ Fitoparásitos	Vida libre ⁴
Solarización	2.50 a	5.00 a	17.50 a	25.00 a	117.50 a
Biológico & Químico	10.00 a	2.50 a	2.50 a	15.00 a	225.00 a
Gallinaza & Solarización	12.50 a	5.00 a	2.50 a	20.00 a	482.50 a
Desinfección semilla	17.50 a	2.50 a	12.50 a	32.50 a	130.00 a
Plantas cobertoras	45.00 a	0.00 a	0.00 a	45.00 a	122.50 a
Intercalado	10.00 a	0.00 a	12.50 a	22.50 a	72.50 a
Manejo Integrado	10.00 a	67.50 a	47.50 a	125.00 a	910.00 a
Testigo	12.50 a	10.00 a	32.50 a	55.00 a	672.50 a
Promedio	15.00	11.56	15.94	42.50	341.56

¹ Promedio de 4 repeticiones. Letras distintas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$), según Tukey para datos transformados con \log_{10} .

² Valores expresados como: número de nematodos/100 cm³ de suelo (sin transformar).

³ Total Fitoparásitos incluyen: *Rotylenchulus reniformis*, *Helicotylenchus multicinctus*, *Pratylenchus coffeae*, *Tylenchus* spp.

⁴ Nematodos vida libre incluyen: Rabditidos, Dorylaimidos y Aphelenchidos.

Efecto de los tratamientos en la dinámica poblacional de nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de apio (*A. xanthorrhiza*) durante el ciclo del cultivo.

La Figura 11 muestra el efecto de los tratamientos evaluados en la dinámica poblacional de nematodos fitoparásitos en cuatro diferentes muestreos de suelo asociadas al cultivo de apio (*A. xanthorrhiza*). Se observa que las poblaciones iniciales de nematodos fitoparásitos y fueron reduciéndose mediante la aplicación de los tratamientos hasta el tercer muestreo, que coincide con los cuatro meses después de la siembra del cultivo. Sin embargo, para el último muestreo realizado en la cosecha, todos los tratamientos mostraron un incremento en las poblaciones de nematodos fitoparásitos del suelo.

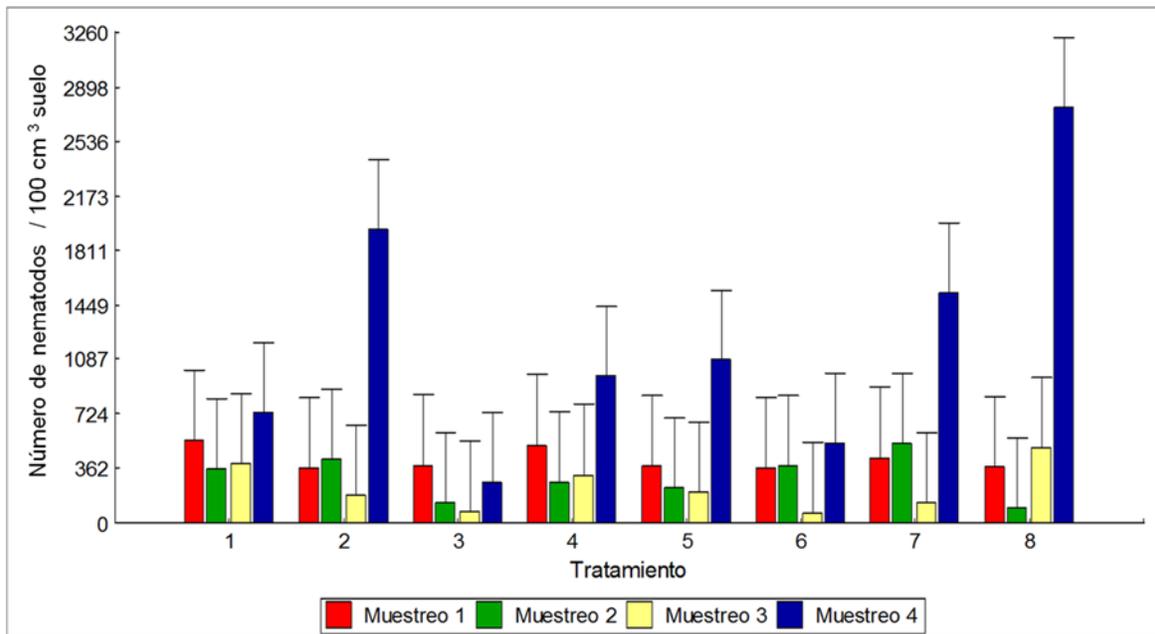


Figura 11. Efecto de los tratamientos en la dinámica poblacional de nematodos fitoparásitos en cuatro diferentes muestreos de suelo asociadas al cultivo se apio (*A. xanthorrhiza*).

En la evaluación de la dinámica poblacional de nematodos de vida libre, Figura 12, contrario a la dinámica poblacional de nematodos fitoparásitos, se evidenció un crecimiento en las poblaciones de nematodos de vida libre hasta el tercer muestreo (3 meses después de la siembra) y posteriormente una reducción en el cuarto muestreo (momento de la cosecha).

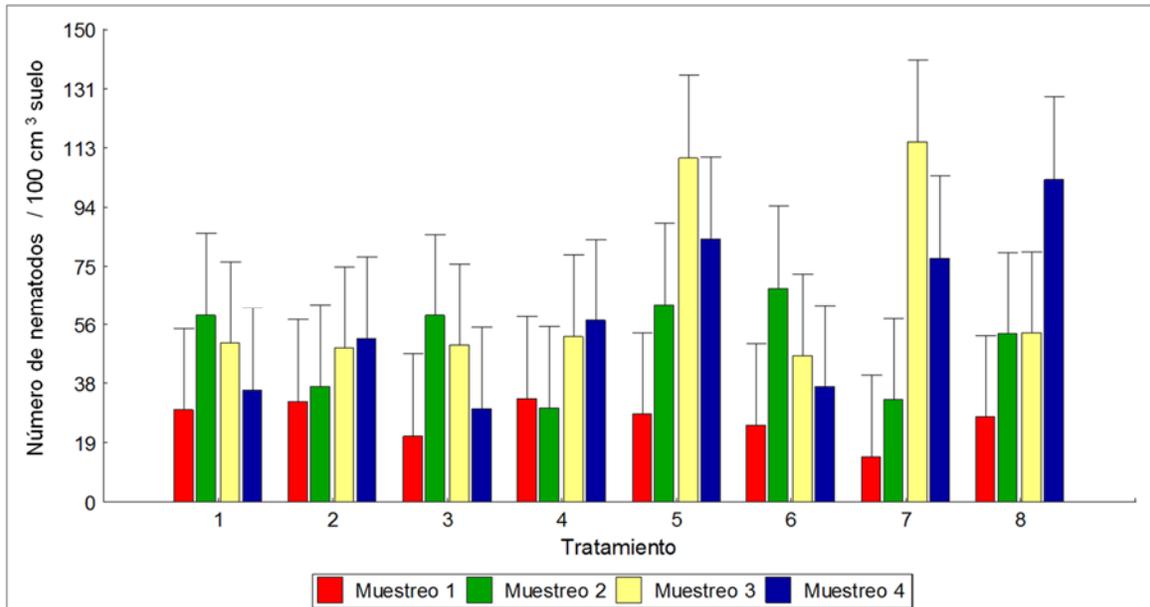


Figura 12. Efecto de los tratamientos en la dinámica poblacional de nematodos de vida libre en cuatro diferentes muestreos de suelo asociadas al cultivo se apio (*A. xanthorrhiza*).

Efecto de los tratamientos en las variables de rendimiento del cultivo de apio (*A. xanthorrhiza*).

Para la variable brotación, no se observaron diferencias significativas en el análisis de varianza. En el Cuadro 9 se muestra los promedios generales del porcentaje de brotación para cada tratamiento evaluado. El tratamiento que incluye la aplicación de un producto biológico (DiTera® DF) y un producto químico (Vydate® L), obtuvo el mayor promedio con un total de 42.50 % de plantas brotadas por parcela. Por esta razón se cambió el tipo de análisis para utilizar la brotación como una co-variable en el análisis de los datos que representan un promedio por parcela.

Cuadro 9. Efecto de los tratamientos en el porcentaje de brotación en apio (*A. xanthorrhiza*)^{1,2}.

TRATAMIENTO	BROTACIÓN (%)
Biológico & químico	42.50 a
Manejo Integrado	35.00 a
Intercalado	33.13 a
Gallinaza & solarización	31.88 a
Desinfección semilla	31.88 a
Plantas cobertoras	30.00 a
Solarización	20.63 a
Testigo	21.88 a
Promedio	30.86

¹Promedio de 4 repeticiones (DCA).

²Letras distintas en las columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$), según Tukey.

Para las variables de rendimiento por hectárea en la evaluación de tratamientos para reducir las poblaciones de nematodos en el cultivo de apio, Cuadro 10, se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) para las variables rendimiento por parcela, peso de cormo y diámetro del cormo. También se observó significancia estadística para el factor aleatorio o co-variable brotación.

Las variables de número de hijuelos y peso de semilla no presentaron diferencias significativas para tratamientos.

Cuadro 10. Respuesta de las variables de rendimiento en la evaluación de tratamientos para reducir las poblaciones de nematodos asociados al cultivo de apio (*A. xanthorrhiza*).

TRATAMIENTO	Rendimiento total (ton/ha)	Peso de corno (kg)	Diámetro de corno (cm)	Número de hijuelos	Peso de la semilla kg/ha
Solarización	21.88 ¹ a ²	0.72 ab	6.21 bcd	1733.64 a	836.70 a
Biológico & químico	42.50 a	0.59 b	5.78 d	1167.61 a	663.15 a
Gallinaza & solarización	31.88 a	0.85 ab	7.12 abc	922.05 a	530.68 a
Desinfección semilla	31.88 a	0.49 c	5.58 d	1471.31 a	619.54 a
Plantas cobertoras	30.00 a	0.97 a	7.35 ab	875.70 a	464.60 a
Intercalado	33.13 a	0.98 a	7.59 a	1151.07 a	751.06 a
Manejo Integrado	35.00 a	0.82 ab	6.99 abc	1155.70 a	648.88 a
Testigo	20.63 a	0.62 bc	6.06 cd	1816.85 a	953.40 a
Promedio	30.86	0.75	6.58	1286.74	683.50

¹Promedios de 4 repeticiones con datos no transformados.

²Letras distintas en las columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$), según Tukey para datos transformados con \log_{10} .

³Rangos con datos transformados mediante logaritmo base 10 para ajustar normalidad de los datos y homogeneidad de varianzas.

Estimación de la severidad de la enfermedad.

No se observaron, en ningún tratamiento al momento de la cosecha, síntomas foliares de la enfermedad. Solo plantas con severidad del 100 % presentaron marchitez foliar. Para la evaluación de la enfermedad en cormo, se tomó visualmente el porcentaje de tejido afectado con la pudrición del cormo y se asignó uno de los niveles en una escala binomial. Del análisis de *Chi* cuadrado se pudo observar significancia para la prueba por lo cual la variable severidad depende del tratamiento aplicado, Figura 13 y Cuadro 11. En términos generales la presencia de la enfermedad fue baja, tan solo tres cormos del experimento presentaron severidad del 100% mientras que la mayoría de las plantas presentó presencia de la enfermedad con porcentajes menores al 10% del tejido infectado con la pudrición, Figura 14.

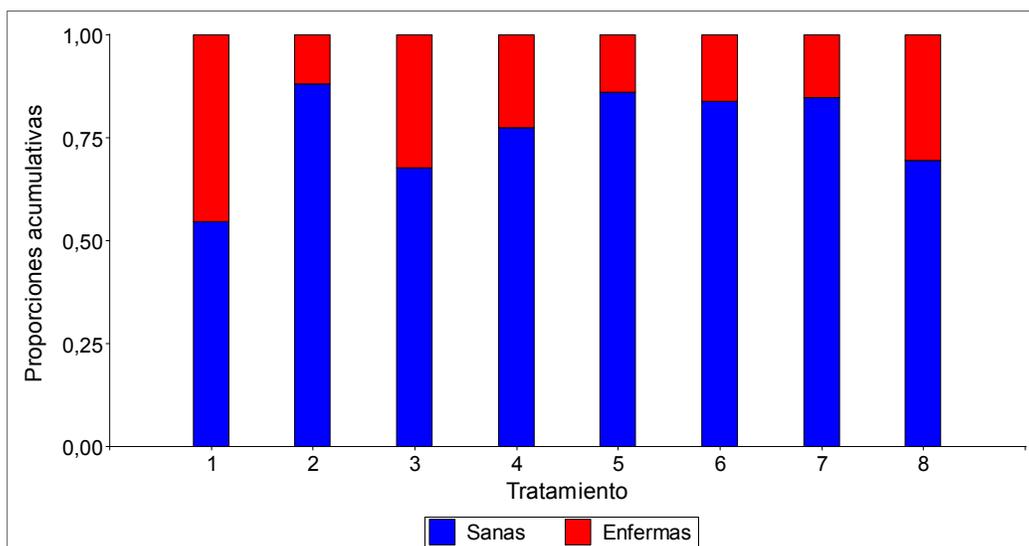


Figura 13. Efecto de los tratamientos en la incidencia y severidad de la enfermedad, variable binomial de plantas con y sin síntomas.

Cuadro 11. Efecto de los tratamientos en la reducción de la severidad la pudrición del corno de apio.

Tratamiento	Plantas Enfermas ¹	Plantas Sanas ²	Total
Solarización	10	12	22
Biológico & químico	6	44	50
Gallinaza & solarización	11	23	34
Desinfección semilla	9	31	40
Plantas cobertoras	5	31	36
Intercalado	5	26	31
Manejo Integrado	7	39	46
Testigo	7	16	23
Total	60	222	282

Variable binomial tomada de un total de 40 plantas por parcela.

¹ Plantas con severidad menor a 9 % del tejido infectado.

² Plantas con severidad mayor al 10% del tejido infectado.

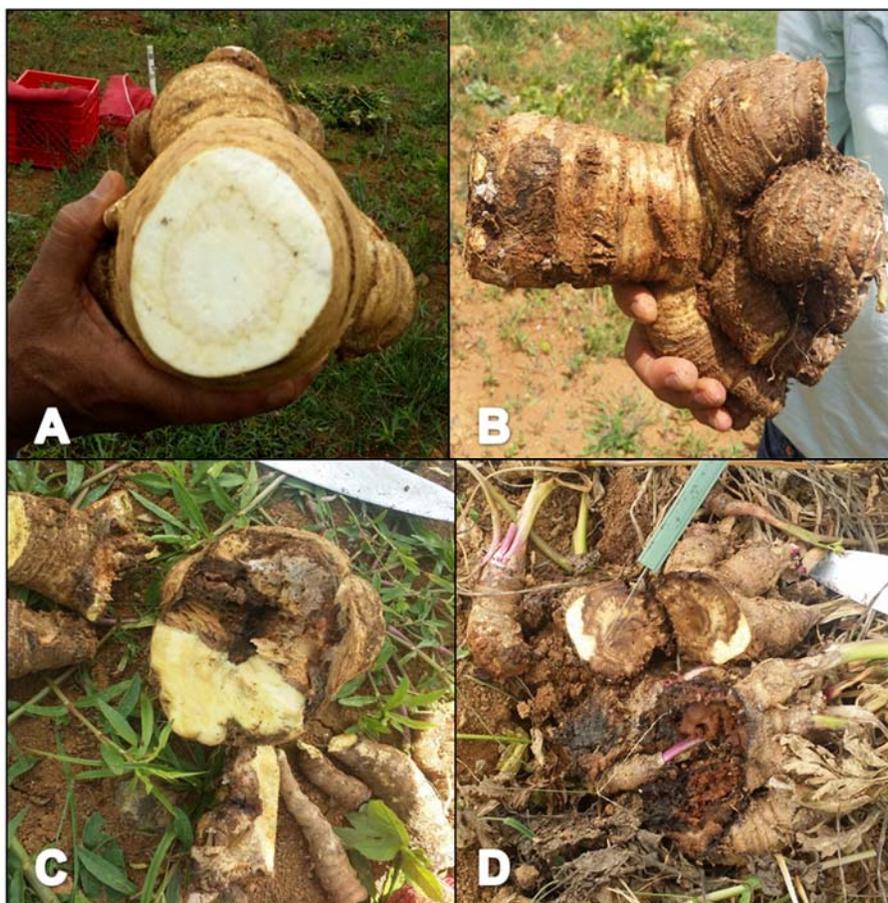


Figura 14. Severidad de la enfermedad encontrada en el experimento de campo. **A.** 0% de tejido infectado **B.** 10 % del tejido infectado **C.** 60% del tejido infectado **D.** 90 % del tejido infectado.

Evaluación de dinámica poblacional de bacterias en el suelo asociados al cultivo de apio.

Del análisis de varianza para unidades formadoras de colonias de bacterias no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, pero si para la co-variable tomada como el primer muestreo antes de la aplicación de los tratamientos. El Cuadro 12 y Figura 15 muestran los promedios de cada tratamiento. En términos generales se observó una reducción de las poblaciones de bacterias en el suelo asociadas a la rizosfera del cultivo de apio desde antes de aplicar los tratamientos hasta la cosecha.

Cuadro 12. Efecto de los tratamientos sobre los niveles poblacionales de bacterias durante el primero y cuarto muestreo para el control de la pudrición del corno de apio (*A. xanthorrhiza*)^{1,2}.

Tratamiento	Primer muestreo	Segundo muestreo
Solarización	4.62 a	3.87 a
Biológico & químico	4.63 a	3.89 a
Gallinaza & solarización	4.36 a	4.09 a
Desinfección semilla	4.41 a	3.98 a
Plantas cobertoras	4.56 a	4.04 a
Intercalado	4.52 a	3.89 a
Manejo Integrado	4.56 a	4.21 a
Testigo	4.57 a	3.77 a
Promedio	4.53	3.97

¹Promedio de 12 repeticiones. Letras distintas en las columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$), según Tukey.

²Valores expresados como: en \log_{10}/g de suelo seco.

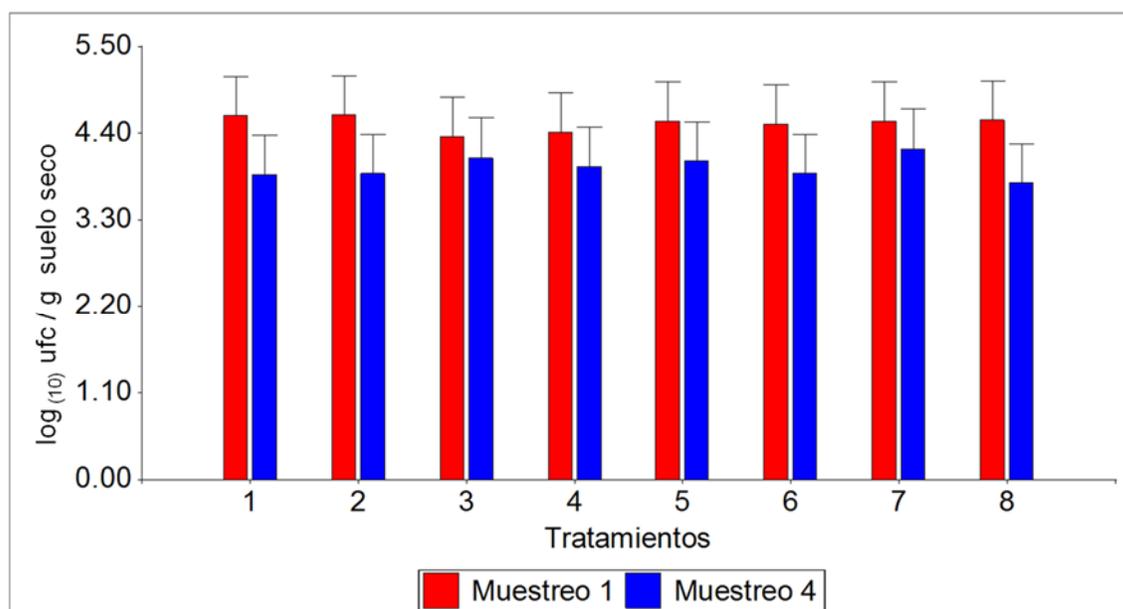


Figura 15. Efecto de los tratamientos sobre la dinámica poblacional de bacterias en dos muestreos para evaluar el control de la pudrición del corno de apio (*A. xanthorrhiza*).

Evaluación de la dinámica poblacional de hongos en el suelo asociados al cultivo de apio

Del análisis de la varianza para unidades formadoras de colonias de hongos asociados a la rizosfera del cultivo de apio, no se encontraron diferencias significativas para tratamientos ni para la co-variable tomada como el primer muestreo. En términos generales se observó un incremento de las poblaciones de hongos. En el Cuadro 13 y la Figura 16, se observan los promedios por tratamiento, las frecuencias de especies de hongos observadas al finalizar el experimento muestran que *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. y *Aspergillus* spp., estuvieron en mayor población.

Cuadro 13. Efecto de los tratamientos sobre los niveles poblacionales de hongos durante el primero y cuarto muestreo para el control de la pudrición del corno de apio (*A. xanthorrhiza*)^{1,2}.

Tratamiento	Primer muestreo	Segundo muestreo
Solarización	3.91 a	3.85 a
Biológico & químico	3.63 a	3.94 a
Gallinaza & solarización	3.87 a	4.14 a
Desinfección semilla	3.76 a	3.98 a
Plantas cobertoras	3.81 a	4.00 a
Intercalado	3.83 a	3.96 a
Manejo Integrado	3.80 a	4.38 a
Testigo	3.89 a	4.10 a
Promedio	3.81	4.04

¹Promedio de 12 repeticiones. Letras distintas en las columnas indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$), según Tukey.

²Valores expresados como: en \log_{10} / g de suelo seco.

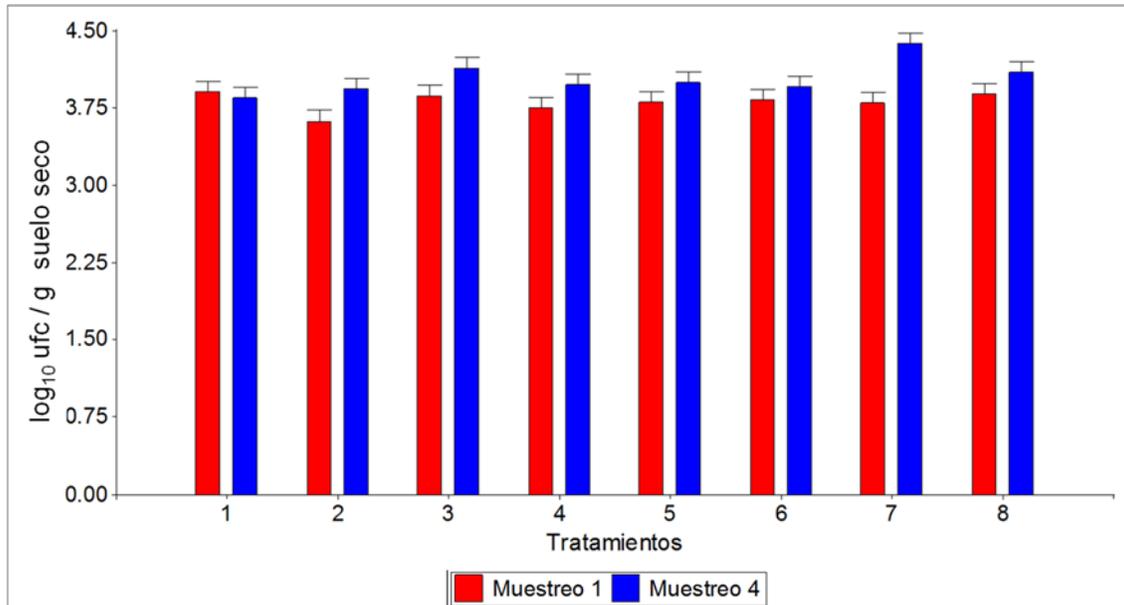


Figura 16. Efecto de los tratamientos sobre la dinámica poblacional de hongos en dos muestreos para evaluar el control de la pudrición del corno de apio (*A. xanthorrhiza*).

Tercer objetivo: Realizar pruebas de patogenicidad para identificar organismos asociados a la enfermedad.

En los predios comerciales de apio, localizados en la finca EL Zorzal del sector La Torrecita en Barranquitas, se procesaron 15 cormos con síntomas de pudrición de aproximadamente 5 meses después de la siembra. Los síntomas tempranos fueron amarillamiento y leve marchitamiento del follaje. En el corno se pudo evidenciar la proliferación de micelio de hongos, corteza suave y de aspecto húmedo; internamente al realizar un corte transversal y longitudinal de los cormos infectados se pudo observar pudrición húmeda y coloración café en forma de manchas irregulares que van desde la parte inferior del corno hacia la parte aérea de la planta y en un corte transversal desde la corteza hacia la parte interna del corno. Adicionalmente, se observaron síntomas de pudrición blanda en la semilla vegetativa obtenida de estas plantas, Figura 17.

Descripción y caracterización de aislados de hongos.

En total se aislaron 31 hongos morfológicamente diferentes, 25 correspondieron al género *Fusarium*, dos al género de *Rhizoctonia*, dos al género *Colletotrichum* y dos al género *Rhizopus*. En el Cuadro 14, se puede observar que 17 aislamientos de *Fusarium*, dos de *Rhizoctonia* y uno de *Rhizopus* fueron positivos para las pruebas de patogenicidad. Sin embargo, se obtuvieron aislamientos más agresivos que otros, como se evidencia en el tamaño de las lesiones evaluadas a las 72 horas después de la inoculación. El tamaño de lesión promedio fue de 2.3 cm de diámetro evaluados en discos de apio. Para el caso de los hongos pertenecientes al género *Fusarium* se seleccionaron 9 aislamientos de los más virulentos, según el diámetro de lesión en discos de apio, para realizar su caracterización morfológica y molecular.

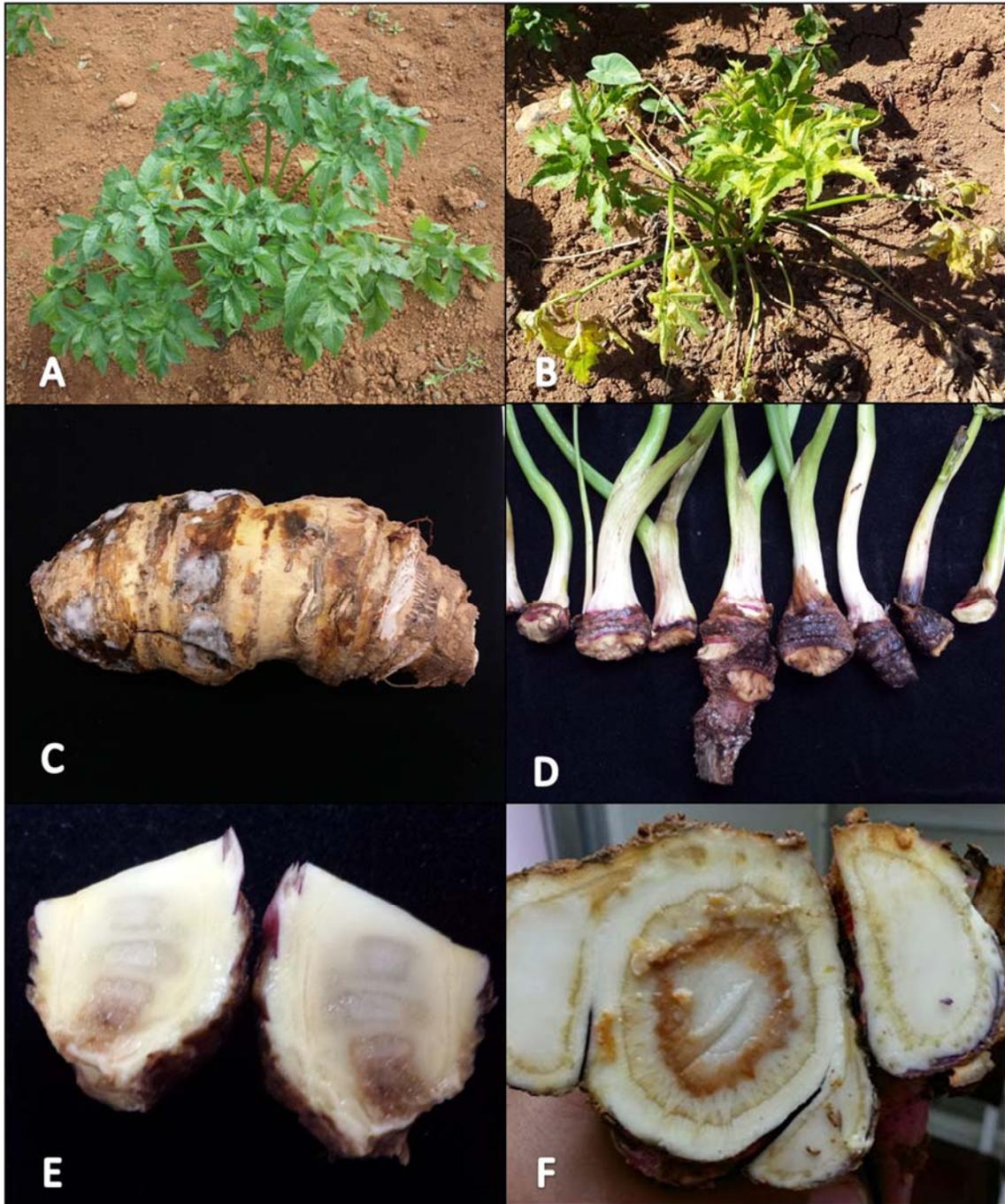


Figura 17. Síntomas de la pudrición del corno del apio. **A.** Planta sana **B.** Amarillamiento y marchites en hojas **C.** Síntomas externos en corno **D.** Síntomas externos en semilla **E.** Corte longitudinal de un corno con síntomas **F.** Corte trasversal de un corno con síntomas.

Cuadro 14. Resultados del diámetro de lesión en discos de apio para evaluar las pruebas de patogenicidad con hongos aislados de cormos con síntomas de pudrición.

Aislamiento	Género	Pruebas de patogenicidad ¹	Diámetro se lesión (cm) ²
H-1	<i>Fusarium</i>	+	3.7
H-2	<i>Fusarium</i>	+	3.9
H-3	<i>Fusarium</i>	+	2.5
H-4	<i>Fusarium</i>	-	1.0
H-5	<i>Fusarium</i>	-	0.5
H-6	<i>Fusarium</i>	-	1.0
H-7	<i>Fusarium</i>	+	4.0
H-8	<i>Fusarium</i>	+	2.6
H-9	<i>Fusarium</i>	-	1.0
H-10	<i>Fusarium</i>	+	1.5
H-11	<i>Fusarium</i>	-	1.5
H-12	<i>Collectotricum</i>	-	0.0
H-13	<i>Fusarium</i>	+	3.7
H-14	<i>Fusarium</i>	+	1.0
H-15	<i>Mucor</i>	-	0.0
H-16	<i>Fusarium</i>	+	4.0
H-17	<i>Fusarium</i>	-	0.7
H-18	<i>Fusarium</i>	+	3.8
H-19	<i>Rhizopus</i>	+	3.0
H-20	<i>Fusarium</i>	+	4.0
H-21	<i>Collectotricum</i>	-	0.6
H-22	<i>Fusarium</i>	-	2.5
H-23	<i>Fusarium</i>	-	2.0
H-24	<i>Rhizoctonia</i>	+	4.0
H-25	<i>Fusarium</i>	+	1.6
H-26	<i>Fusarium</i>	-	2.0
H-27	<i>Fusarium</i>	+	3.9
H-28	<i>Fusarium</i>	-	1.0
H-29	<i>Fusarium</i>	+	3.7
H-30	<i>Fusarium</i>	+	2.0
H-31	<i>Rhizoctoni</i>	+	3.2

¹Reproducción de síntomas iniciales de cormos enfermos.

²Medida tomada a las 48 horas después de la inoculación, promedio de tres repeticiones

Caracterización morfológica de género *Fusarium*.

El género *Fusarium* fue el más frecuente y virulento. La Figura 18, muestra la diversidad encontrada dentro de este género asociada a cormos con síntomas de pudrición de apio.



Figura 18. Diversidad de colonias de *Fusarium* aisladas en muestras de tejido con síntomas de pudrición de cormo.

De los 9 aislamientos agrupados dentro del género *Fusarium*, morfológicamente se identificaron dos especies, Cuadro 15, *Fusarium solani*, Figura 19, como el de mayor frecuencia con 66.7 % de los aislados y *Fusarium oxysporum*, Figura 20, obtuvo un 33.3 % de los aislamientos. Dentro de las características morfológicas, se evaluaron la coloración de los aislamientos en PDA, Cuadro 16. En los primeros 3 días todos los aislamientos presentaron similar coloración en el micelio y en el medio de cultivo. Pasados 8 días de incubación los colores variaron entre blancos, cremas y violetas.

Cuadro 15. Frecuencias de las principales especies identificadas dentro del género *Fusarium* en pruebas de patogenicidad en apio.

Género y especie	Frecuencia %	Características en PDA
<i>Fusarium oxysporum</i>	33.3	Colonias micelio aéreo y abundante que varió de coloración, entre blanco a rosa claro. En la parte posterior de la placa Petri toma una coloración más intensa, de rojizo claro a morado oscuro a los 15 días después de la incubación.
<i>Fusarium solani</i>	66.7	Colonias de tonalidades claras, de blancas a cremas con un crecimiento no muy difuso del micelio, en las partes posteriores de la placa de tonalidad cremas y algunas veces con rayas verdes o azules después de 15 días de incubación.

Cuadro 16. Características morfológicas de aislamientos de *Fusarium* asociados a la pudrición del corno del apio.

Aislamiento	Especie	Color en medio de cultivo	
		Frente	Atrás
H-1	<i>F. solani</i>	Blanco	Crema
H-2	<i>F. solani</i>	Blanco	Blanco
H-7	<i>F. solani</i>	Blanco	Crema
H-13	<i>F. oxysporum</i>	Blanco	Rosa
H-16	<i>F. solani</i>	Blanco	Rosa claro
H-18	<i>F. oxysporum</i>	Blanco	Violeta oscuro
H-20	<i>F. solani</i>	Blanco	Rosa claro
H-27	<i>F. oxysporum</i>	Blanco	Violeta Claro
H-29	<i>F. solani</i>	Blanco	Rosa claro

Macroconidios y microconidios.

La coloración de las macro y microconidios fueron hialinos para todos los aislamientos, el tamaño varió entre cada especie de *Fusarium* como se puede evidenciar en el Cuadro 17. Para el caso de los aislamientos correspondientes a *F. solani*, se observaron macroconidios semicurvas alargadas con la célula apical redonda la célula basal despuntada con 3 a 6 septos, los conidios se encuentran en esporodoquios de coloración crema y en cabezas falsas, después de 15 días de incubación. Las microconidios variaron en forma, tamaño y número de septos ubicados en cadenas cortas. Por otro lado, los aislamientos correspondientes a *F. oxysporum* presentaron macroconidios curvados con un máximo de 3 septos, sus células apicales curvas y células basales en forma de pie, en esporodoquios claros y monofialides y cadenas cortas. Las microconidios de diferente forma, tamaño y sin septos.

Cuadro 17. Características morfológicas de los conidios de aislamientos del género *Fusarium* asociados a la pudrición del corno del apio.

Aislam.	Especie	Medidas de conidios μm^1		Características de conidios	
		Macro conidios	Micro conidios	Macroconidios	Microconidios
H-1	<i>F. solani</i>	42 x 5	8 x 3	Semicurvo, 3-4 septos	Ovoide, elípticas, 1 septo
H-2	<i>F. solani</i>	39 x 3	3 x 1	Semicurvo, 3 septos	Reniforme, elípticas, 2 septos
H-13	<i>F. solani</i>	32 x 2	8 x 1	Semicurvada, 6 septos	Ovoide sin septos
H-16	<i>F. oxysporum</i>	23 x 3	7 x 1	Curvado, 3 septos	Ovoide sin septos
H-18	<i>F. solani</i>	17 x 3	7 x 1	Curvado, 5 septos	Reniforme sin septos
H-20	<i>F. oxysporum</i>	20 x 3	8 x 1	Curvado, 2 septos	Ovoide sin septos
H-27	<i>F. solani</i>	34 x 3	5 x 1	Semicurvada, 4 septos	Reniformes sin septos
H-29	<i>F. oxysporum</i>	40 x 4	3 x 1	Curvado, 3 septos	Reniforme sin septos

¹Promedio de 30 esporas medidas

²Características tomadas según el manual de laboratorio de Leslie *et al.*, 2006

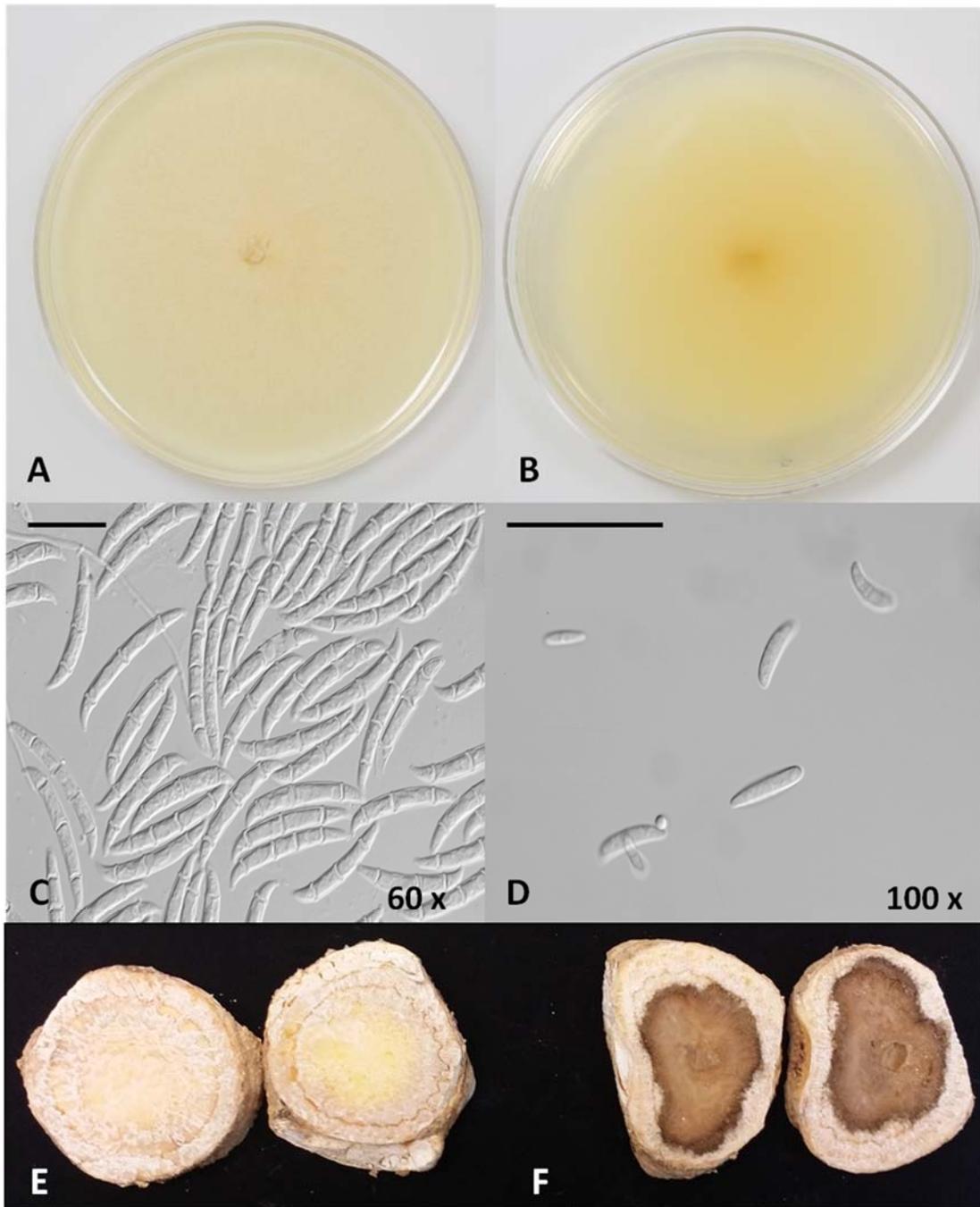


Figura 19. Características morfológicas y pruebas de patogenicidad para *Fusarium solani*. **A.** Crecimiento en PDA cara anterior **B.** Crecimiento en PDA cara posterior **C.** Macroconidios **D.** Microconidios **E.** Control **F.** Inoculación con el aislamiento. Escala 10 μm .

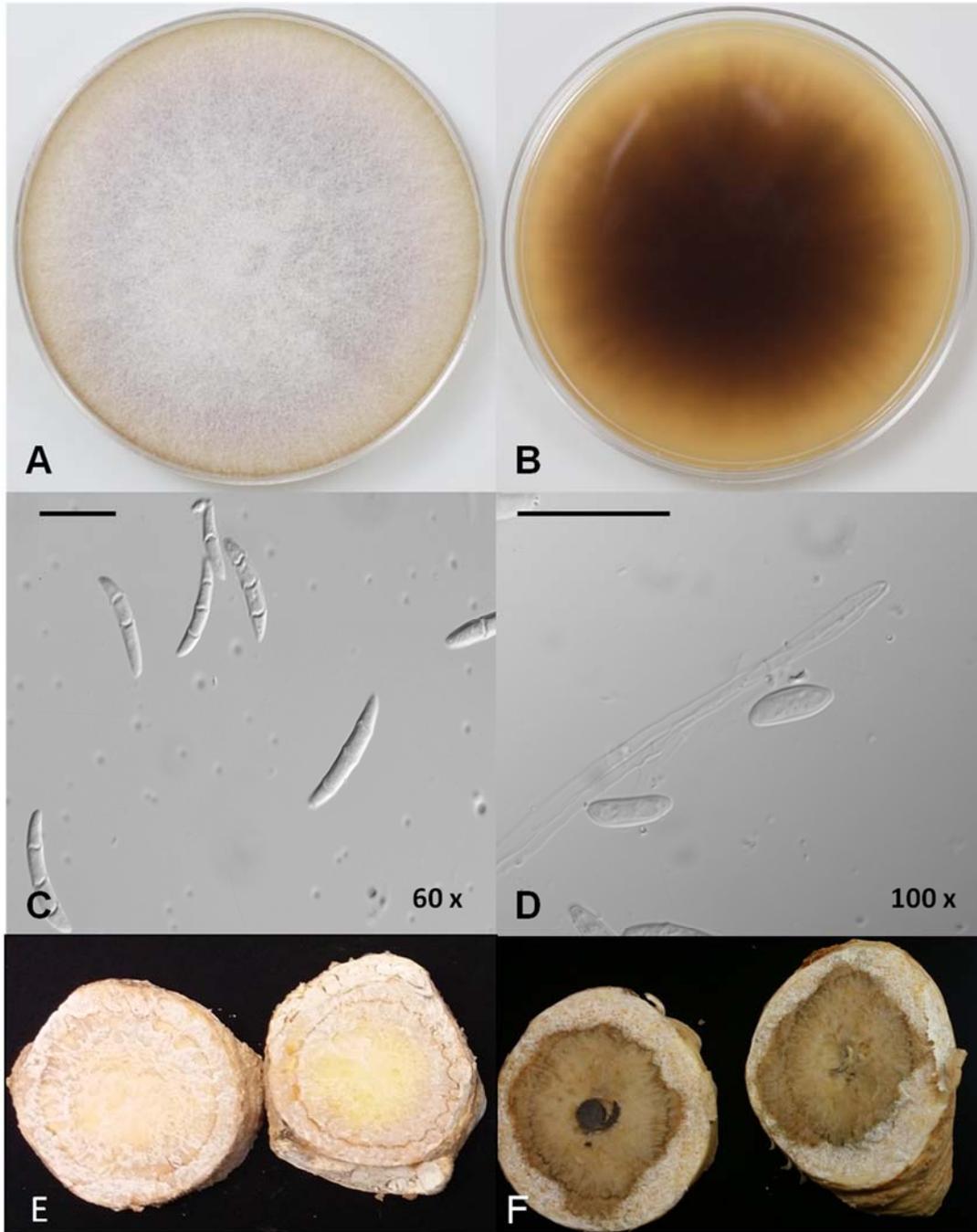


Figura 20. Características morfológicas y pruebas de patogenicidad para *Fusarium oxysporum*. **A.** Crecimiento en PDA cara anterior **B.** Crecimiento en PDA cara posterior **C.** Macroconidios **D.** Microconidios **E.** Control **F.** Inoculación con el aislamiento. Escala 10 μm .

Identificación molecular de aislamientos de *Fusarium*.

El gel de agarosa al 1.2% después de la electroforesis mostró que ocho aislamientos de *Fusarium* pudieron ser amplificados. La Figura 21 indica las bandas amplificadas, al lado izquierdo para el gen ITS con un peso aproximado de 600 pares de bases y al lado derecho para el gen EF con un peso aproximado de 750 pares de bases.

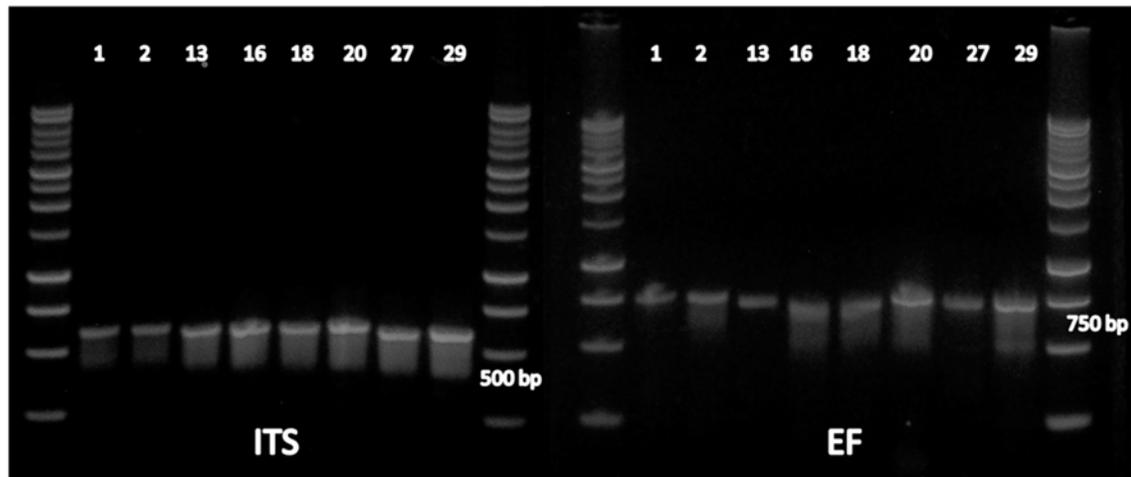


Figura 21.- Gel de agarosa con amplificación de ITS y EF de ocho aislamientos de *Fusarium* patogénicos al cultivo de apio.

Las secuencias de nucleótidos fueron manipuladas manualmente para su correspondiente identificación. El Cuadro 18 y Cuadro 19, muestran los pares de bases modificados para cada dirección de la cadena de ADN y el número de bases para su respectivo consenso. Además, se puede observar el número de entrada en el Banco de Genes con mayor porcentaje de identidad para la selección de cada especie.

Los aislamientos una vez identificados en la base de datos del banco de genes fueron organizados para obtener arboles filogenéticos, la Figura 22 y Figura 23 muestran los árboles filogenéticos para cada uno de los genes utilizados que

ayudaron a discriminar las dos especies de *Fusarium* identificadas morfológicamente, tanto para el gen ITS como EF separan en dos clados los aislamientos de *Fusarium*, en el primero a *F. oxysporum* y en el otro a *F. solani*.

Cuadro 18. Análisis de las secuenciadas con el cebador EF para cada aislamiento y su respectiva identificación.

Aislado	Cadena ¹	Largo ²	Especie	Max score	Query cover	Ident	Accesión
H-1	F	693	<i>F. solani</i> isolate Ch65	1262	1.00	0.99	KP400743.1
	R	686	<i>F. solani</i> isolate Ch65	1266	0.99	1.00	KP400743.1
	C	722	<i>F. solani</i> isolate Ch65	1332	0.99	1.00	KP400743.1
H-2	F	675	<i>F. solani</i> isolate M113A	1310	0.99	0.99	KP674184.1
	R	687	<i>F. solani</i> isolate M113A	1256	0.99	0.99	KP674184.
	C	718	<i>F. solani</i> isolate M113A	1310	0.99	0.99	KP674184.1
H-13	F	663	<i>F. oxysporum</i> f. spp. vasinfectum strain CDR1131	1216	0.99	1.00	KT323848.1
	R	654	<i>F. oxysporum</i> f. spp. pisi strain Pt1	1184	1.00	0.99	KF913727.1
	C	704	<i>F. oxysporum</i> isolate JB4	1264	0.98	0.99	KP964880.1
H-16	F	656	<i>F. oxysporum</i> isolate SAT77	1206	1.00	0.99	DQ465933.1
	R	655	<i>F. oxysporum</i> f. spp. fragariae strain 16C-30KFsa	1197	0.99	0.99	KJ776746.1
	C	687	<i>F. oxysporum</i> f. spp. fragariae strain 16C-30KFsa	1256	0.99	0.99	KJ776746.1
H-18	F	664	<i>F. oxysporum</i> f. spp. cubense strain FJ-2-1	1210	0.99	0.99	KC889014.1
	R	666	<i>F. oxysporum</i> strain FJZ1	1210	0.98	1.00	JF430181.1
	C	705	<i>F. oxysporum</i> strain 14-147	1273	0.99	0.99	KT006896.1
H-20	F	678	<i>F. solani</i> isolate Ch65	1208	1.00	0.99	KP400743.1
	R	689	<i>F. solani</i> isolate Ch65	1266	0.99	0.99	KP400743.1
	C	720	<i>F. solani</i> isolate Ch65	1325	0.99	0.99	KP400743.1
H-27	F	661	<i>F. oxysporum</i> f. spp. vasinfectum isolate IMI-141148	1203	0.99	0.99	EU246571.1
	R	663	<i>Fusarium</i> spp. S99F	1266	0.99	0.99	KT286760.1
	C	701	<i>Fusarium</i> spp. S99F	1266	0.99	0.99	KT286760.1
H-29	F	677	<i>F. solani</i> isolate N2214	1230	0.99	0.99	KT211624.1
	R	680	<i>F. solani</i> isolate N2214	1245	0.99	0.99	KT211624.1
	C	703	<i>F. solani</i> isolate N2214	1280	0.99	0.99	KT211624.1

¹Secuencia de la cadena hacia adelante (F); hacia atrás (R) Consenso (C)

²Número de pares de bases de la secuencia

Cuadro 19. Resultados de manipulación de cadenas secuenciadas con el cebador ITS para cada aislamiento y su respectiva identificación.

Aislado	Cadena ¹	Largo ²	Especie	Max score	Query cover	Ident	Accession
H-1	F	553	<i>F. solani</i> isolate E02_004	1013	0.99	1.00	JX524021.1
	R	549	<i>F. solani</i> strain GWG5(1)	1014	1.00	1.00	KM268689.1
	C	581	<i>F. solani</i> strain GWG5(1)	1064	0.99	0.99	KM268689.1
H-2	F	540	<i>F. solani</i>	998	1.00	1.00	LC092109.1
	R	545	<i>F. solani</i> strain GWG5(1)	996	1.00	0.99	KM268689.1
	C	577	<i>F. solani</i> strain GWG5(1)	1061	1.00	0.99	KM268689.1
H-13	F	531	<i>F. oxysporum</i> strain SFCF2012	974	0.99	1.00	KF313101.1
	R	522	<i>Fusarium</i> spp. KR4 18S	966	1.00	1.00	KC623568.1
	C	556	<i>F. oxysporum</i> isolate AFIC35	1029	0.99	1.00	KU872840.1
H-16	F	533	<i>F. oxysporum</i> isolate CK-2	981	1.00	1.00	KJ699120.1
	R	523	<i>Fusarium</i> spp. KR4	963	0.99	1.00	KC623568.1
	C	556	<i>F. oxysporum</i> isolate AFIC35	1026	0.99	1.00	KU872840.1
H-18	F	536	<i>F. oxysporum</i> strain SFCF2012	989	1.00	1.00	KF313101.1
	R	533	<i>F. oxysporum</i> strain EECC-643	985	1.00	1.00	KP942940.1
	C	557	<i>F. oxysporum</i> strain EECC-643	1062	1.00	1.00	KP942940.1
H-20	F	547	<i>F. solani</i> isolate E02_004	1009	0.99	1.00	JX524021.1
	R	570	<i>F. solani</i> isolate 832	1020	0.99	0.99	JN232138.1
	C	593	<i>F. solani</i> strain GWG5(1)	1066	0.97	1.00	KM268689.1
H-27	F		ND				
	R	527	<i>F. oxysporum</i> isolate CK-2	974	1.00	1.00	KJ699120.1
	C	527	<i>F. oxysporum</i> isolate CK-2	974	1.00	1.00	KJ699120.1
H-29	F	551	<i>Nectria ipomoeae</i>	1013	1.00	0.99	AB513846.1
	R	553	<i>Nectria ipomoeae</i>	1029	0.95	1.00	AB513846.1
	C	583	<i>Nectria ipomoeae</i>	1029	0.95	1.00	AB513846.1

¹Secuencia de la cadena hacia adelante (F); hacia atrás (R) Consenso (C)

²Número de pares de bases de la secuencia

ND. Cadena no secuenciada

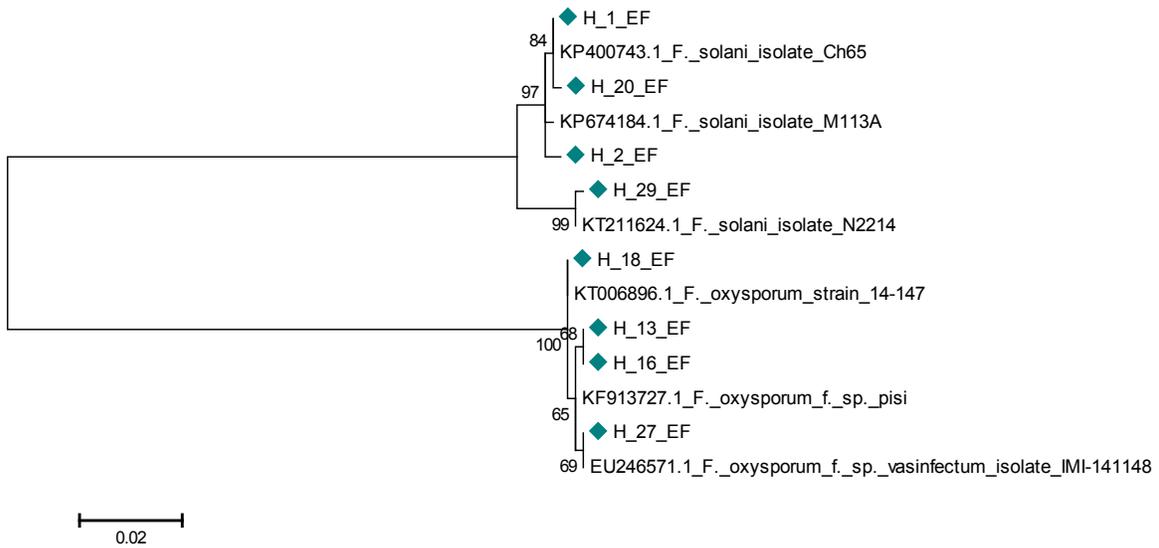


Figura 22. Árbol filogenético de ocho aislamientos de *Fusarium* asociados a la pudrición del corno de apio mediante la secuencia del gen EF. ◆ Aislamiento en estudio.

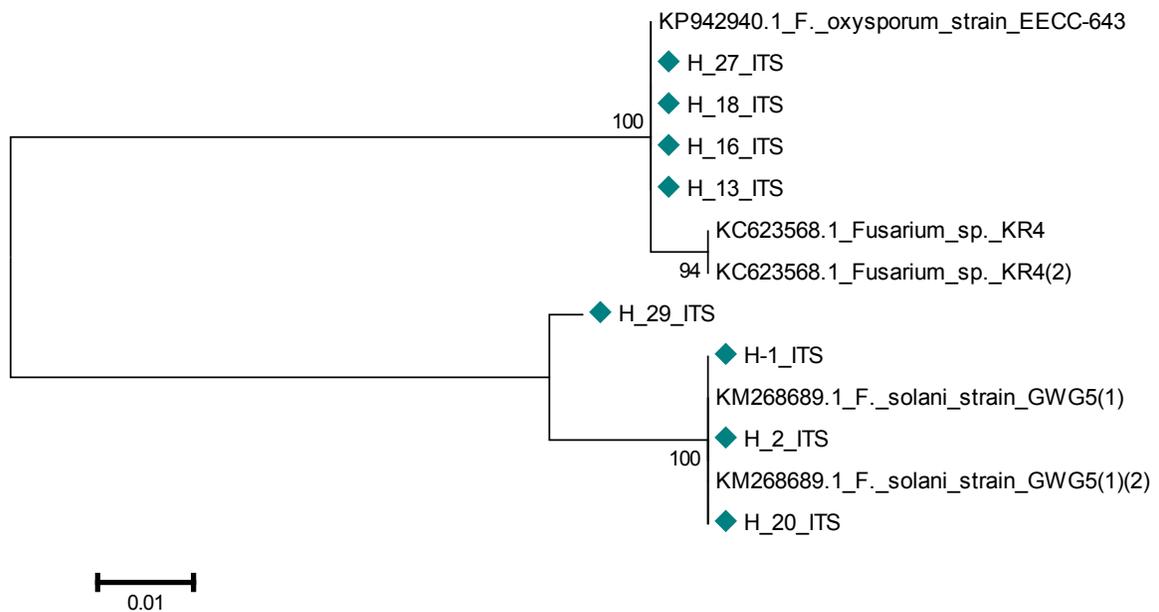


Figura 23. Árbol filogenético de ocho aislamientos de *Fusarium* asociados a la pudrición del corno de apio mediante la secuencia del gen ITS. ◆ Aislamiento en estudio.

Caracterización morfológica de género *Rhizoctonia*.

Tres aislamientos similares de *Rhizoctonia* fueron patogénicos al cultivo de apio, a diferencia de los síntomas observados por el género *Fusarium*, se observó una rápida colonización de los tejidos pero la pudrición fue seca, este aislamiento produjo un tejido de apariencia corchosa en la parte superior y no produjo cambio de coloración, Figura 24. El crecimiento en PDA fue rápido, el micelio no es aéreo y de color café claro, al observar en el microscopio se pudo evidenciar la coloración café y el ángulo de 90° que produce el crecimiento de las ramificaciones del micelio, característico del género *Rhizoctonia*.

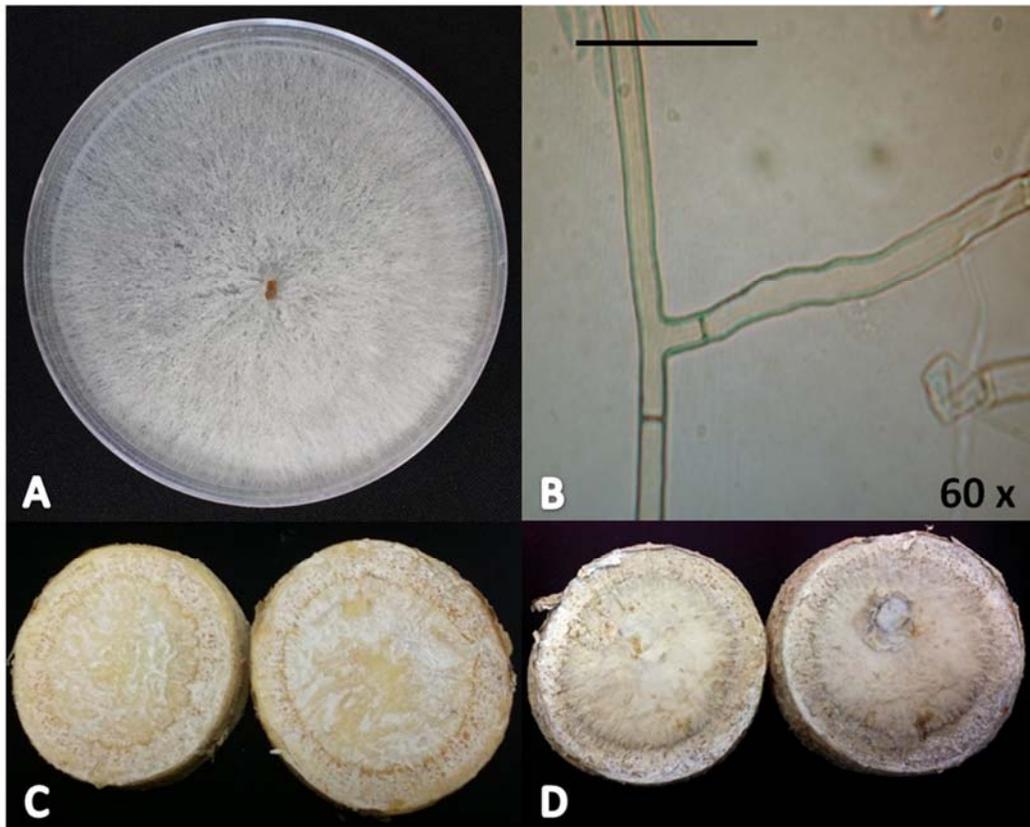


Figura 24. Características morfológicas y pruebas de patogenicidad de *Rhizoctonia*: **A.** Crecimiento en PDA cara anterior **B.** Micelio con ángulo recto en ramificaciones **C.** Control **D.** Inoculación con el aislamiento.

Caracterización morfológica de género *Rhizopus*.

Tres aislamientos pertenecientes al género *Rhizopus* fueron patogénicos. En el medio de cultivo de PDA se caracterizó por un crecimiento micelial rápido de color blanco y aéreo, que a los tres días produjo esporangios de color negro y esporangióforos, característicos de su género. De las pruebas de patogenicidad se observó un profuso crecimiento del micelio del hongo y cambio de coloración en el tejido infectado a marrón, Figura 25.

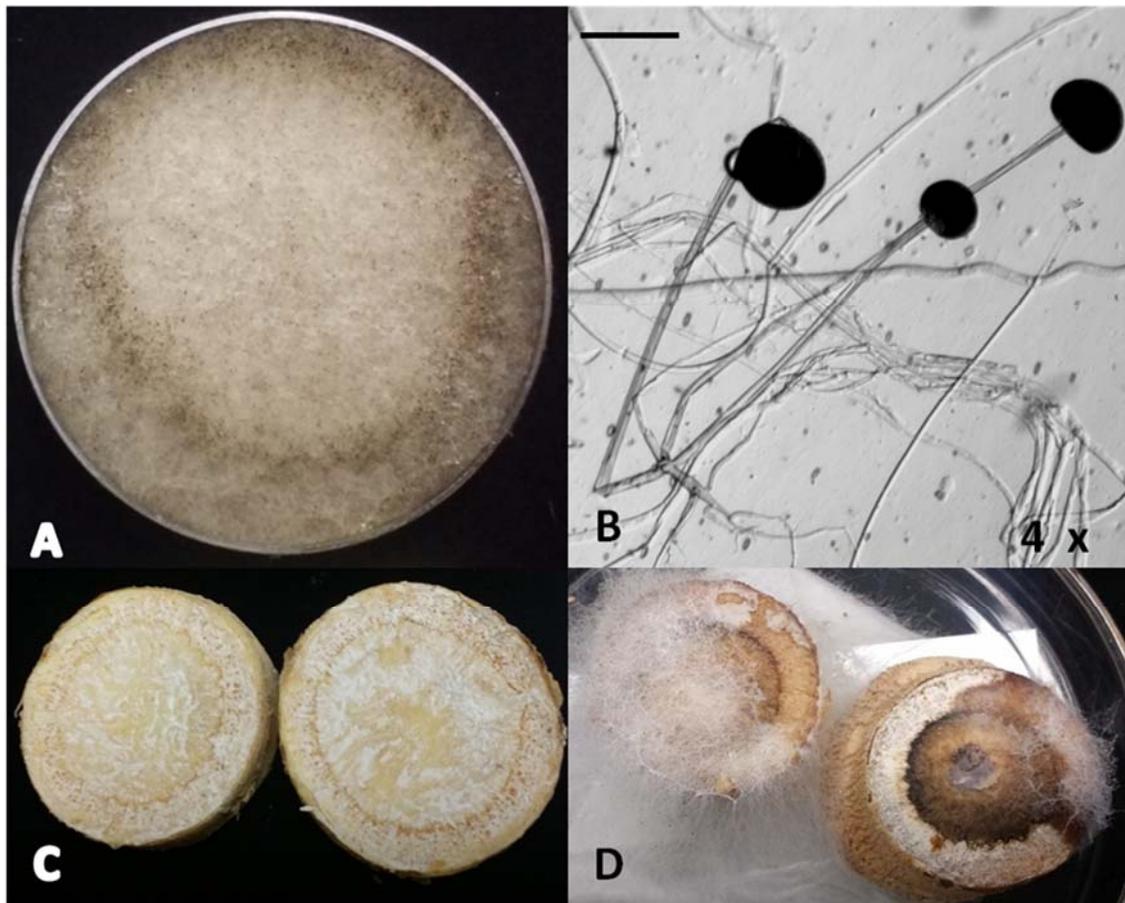


Figura 25. Características morfológicas y pruebas de patogenicidad de *Rhizopus* spp: **A.** Crecimiento en PDA cara anterior **B.** Esporangios y esporangioforos para identificación **C.** Control **D.** Inoculación con el aislamiento

Descripción y caracterización de colonias bacterianas.

Morfológicamente todos los aislamientos presentaron una forma circular de la colonia, con elevación no muy pronunciada y de márgenes enteros con pocas variaciones en color, tamaño y crecimiento en el medio de cultivo, Cuadro 20. El Cuadro 21, muestra los principales resultados de la caracterización química de las bacterias aisladas de cormos enfermos, para la prueba de tinción Gram, se observaron que todas fueron gram negativas, a excepción del aislamiento B-1 que fue gram positiva. De la misma forma para la prueba de crecimiento en condiciones anaerobias, todos los aislamientos fueron aerobios mientras que para el aislamiento B1, el crecimiento fue de dos tipos, anaerobio y aerobio.

En total se aislaron siete colonias de bacterias, pero solo cinco fueron positivas para las pruebas de patogenicidad. Mediante la caracterización morfológica, química y genética se pudieron encontrar tres géneros de bacterias en la pudrición, estos géneros fueron:

Clavibacter michiganensis, el cual presentó coloración de la colonia de crema a rosáceo, de tamaño pequeño y apariencia viscosa después de 48 horas de incubación, crecimiento lento, crecimiento facultativo en condiciones anaerobias, gram positiva; para la prueba de patogenicidad este género de bacteria causó una pudrición blanda y viscosa con un leve cambio de color y degradación del tejido infectado, Figura 26, A y B.

Pseudomonas spp. Presentó una coloración crema brillante de tamaño mediano y pequeño, crecimiento lento, crecimiento en condiciones aerobias, gram negativa; para la prueba de patogenicidad, este género de bacteria causó una pudrición blanda y viscosa con un leve cambio de color y degradación del tejido infectado, estos aislamientos fueron no fluorescentes bajo rayos ultra violeta, Figura 26, C y D.

Erwinia carotovora, presentó coloración crema translúcida, tamaño mediano, crecimiento rápido, crecimiento en condiciones aerobias, gram negativa; para la prueba de patogenicidad este género causó una pudrición blanda que ocurrió mucho más rápido que las otras bacterias (-12 horas) y pudrió completamente el tejido infectado dando una apariencia de macerado, además se caracterizó por no cambiar de tonalidad el tejido que infectó estos síntomas fueron acompañados de un olor a fermentos. Síntomas similares se observaron al realizar la inoculación en tubérculos de papa, Figura 26, E y F.

La identificación molecular de las bacterias la realizó el laboratorio de bacterias fitopatógenas en la Universidad de Florida, identificando a los aislamientos B-1 como *Clavibacter michiganensis*, y los aislamientos B-3, B-4, B-5 como *Pseudomonas* spp. Mientras que el aislamiento B-2 se identificó como *Erwinia carotovora* mediante características morfológicas y pruebas bioquímicas en la Universidad de Puerto Rico.

Cuadro 20. Características morfológicas de aislamientos bacterianos obtenidos de cormos de apio con pudrición.

Aislamiento	Crecimiento en ATS ¹	Morfología de la colonia	Inoculación en papa
B-1	Blanca rosácea de tamaño pequeño de crecimiento lent	Borde regular y con elevación	+
B-2	Crema traslucida de rápido crecimiento y tamaño mediano	Borde regular y con elevación	+
B-3	Blanca brillantes de tamaño pequeño y rápido crecimiento	Borde regular y con elevación	-
B-4	Crema brillantes de tamaño mediano y rápido crecimiento	Borde regular y con elevación	-
B-5	Crema brillantes de tamaño mediano y rápido crecimiento	Borde regular y con elevación	-
B-6	Blancas de tamaño grande y de crecimiento rápido	Borde irregular y plana	-
B-7	Blancas de tamaño pequeño y de crecimiento rápido	Borde regular y con elevación	-

¹Agar Trípico de Soya (ATS).

Cuadro 21. Resultados de pruebas bioquímicas de colonias bacterianas asociadas a la pudrición del corno del apio (*A. xanthorrhiza*).

Aislamiento	Género	Aerobia	Anaerobia	Tinción Gram	Catalasa	Oxidasa	K(OH)	Pruebas de ¹ Patogenicidad
B-1	<i>Clavibacter michiganensis</i> *	+	-	+	+	-	-	+
B-2	<i>Erwinia carotovora</i>	+	+	-	+	-	-	+
B-3	<i>Pseudomonas</i> spp.*	+	-	-	+	-	-	+
B-4	<i>Pseudomonas</i> spp.*	+	-	-	+	-	-	+
B-5	<i>Pseudomonas</i> spp.*	+	-	-	+	-	-	+
B-6	-	+	-	-	+	+	-	-
B-7	-	+	-	+	+	+	-	-

¹Inoculaciones realizadas en discos de apio de aproximadamente 5 cm de diámetro y 2.5 de grosor.

*Identificación molecular facilitada por Universidad de Florida, E.E.U.U.

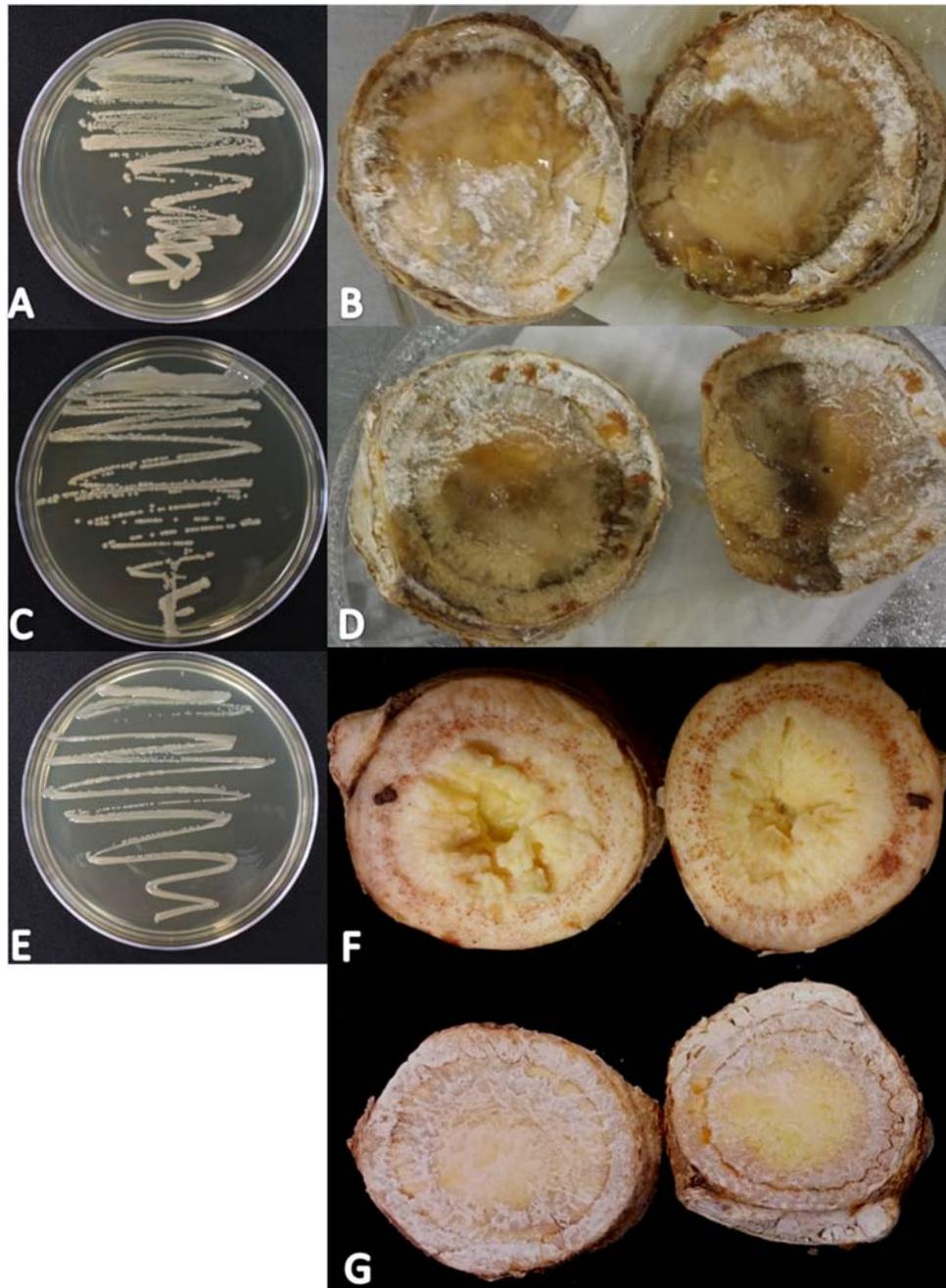


Figura 26. Colonias bacterianas en medio de cultivo ATS y pruebas de patogenicidad para aislamientos asociados a la pudrición del cormo del apio. **A.** Crecimiento en ATS de *Clavibacter michiganensis* **B.** Prueba de patogenicidad de *Clavibacter michiganensis* **C.** Crecimiento en ATS de *Pseudomonas* spp. **D.** Prueba de patogenicidad de *Pseudomonas* spp. **E.** Crecimiento en ATS **F.** Prueba de patogenicidad de *Erwinia carotovora*. **G.** Control.

DISCUSIÓN

La identificación del agente principal de la enfermedad es muy importante para orientar las medidas necesarias para el control de una enfermedad. El nematodo fitoparásito encontrado con mayor frecuencia asociado al cultivo de apio en Puerto Rico fue *Rotylenchulus reniformis*, este estudio es el primer reporte de este nematodo fitoparásito asociado a la pudrición del cormo del apio. Los nematodos fitoparásitos no solo son importantes por el daño directo que pueden causar a la epidermis de las raíces, sino también por las heridas que causan y son utilizadas por patógenos secundarios responsables de los daños de la planta (Jones 2013; Agrios, 2005; Luc *et al.*, 2005). *R. reniformis* ha sido reportado como fitoparásito en otros tubérculos similares como la papa dulce, yautía, malanga y papa china (Luc *et al.*, 2005), donde causa síntomas como: limitado crecimiento de raíces secundarias, deficiencias nutricionales con muy pocos o ausencia de síntomas directos en la raíz (Jones, *et al.*, 2013). La hembra adulta de este nematodo se alimenta penetrando parcialmente en las raíces, formando un sitio permanente para alimentarse es decir es semiendoparásito sedentario y desde su estado J2 hasta adulto, pasa en el suelo sin alimentarse. Por esta razón, fue encontrado en mayor población en las muestras de suelo y no en las muestras de tejido ya que las hembras al medir más de 0.06 mm no atravesaron el filtro del embudo Baermann. Resultados similares se encontraron en estudios realizados para el cultivo de ñame en Puerto Rico, donde la mayor población de *R. reniformis* correspondía a las muestras de suelo (Román-Soto, 2015). Adicionalmente, se detectaron pequeñas poblaciones de *Helicotylenchus multicinctus* y *Pratylenchus coffeae*, éste último reportado en otros países como Brasil, donde identifican a especies como: *P. penetrans*, *P. coffeae* y *P. brachyurus* (Méndez *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 1998, 2000; Monteiro, 1980); causando obscurecimiento de la epidermis de las raíces y de los haces vasculares del apio. A diferencia de Puerto Rico, *Pratylenchus* y *Meloidogyne* han sido identificados como los nematodos más limitantes para el cultivo de apio en Brasil y Venezuela (Borges-Pinheiro *et al.*, 2013; Henz, 2002). Es

importante recalcar que las tres especies asociadas para el cultivo de apio son fitoparásitos de gran importancia en los cultivos de guineo y plátano (Chavarría-Carvajal *et al.*, 2016) y que una de las prácticas más comunes entre los agricultores de apio es realizar rotación con plátano y guineo, incrementando de esta manera las poblaciones de nematodos en el suelo, sin tener conocimiento de ello.

Para la reducción de nematodos fitopatógenos, el tratamiento en el que se incorporó composta con gallinaza y solarización, fue el que presentó poblaciones menores de nematodos fitoparásitos hasta el tercer muestreo (cuatro meses después de la siembra) con una reducción del 30.53% comparados con las poblaciones iniciales y un incremento en la población de nematodos de vida libre 81.98% más que en el primer muestreo. Resultados similares se encontraron en investigaciones realizadas por Castillo-Almanzar (2016), Conce-Conce (2016) y Chavarría *et al.*, 2001, donde la incorporación al suelo de gallinaza solo y en combinación con otros métodos de control, fue efectivo para reducir las poblaciones de nematodos fitoparásitos, a la vez que incrementó las poblaciones de nematodos de vida libre y de hongos benéficos asociados a la rizósfera. La gallinaza mostró similares efectos en la reducción de nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de calabaza, incrementando también el rendimiento (Rosado-Arroyo, 2005).

La variable de germinación fue la más limitante en el experimento. Aunque en general, el material de propagación facilitado por los agricultores de Barranquitas reunió las características morfológicas deseables y necesarias para cumplir con un mínimo del 70% de germinación (Ortiz *et al.*, 2003), en este estudio la germinación más alta fue de un 42.50% para el tratamiento de control biológico y químico comparado con el tratamiento testigo que presentó 21.88 % de germinación. Este bajo porcentaje refleja la baja calidad de la semilla, causada posiblemente a que la mayor parte de la semilla utilizada ya estaba contaminada con la enfermedad. Estudios previos en Puerto Rico, que reportaron esta enfermedad causada por un complejo de hongos y bacterias (Ortiz-Vazquez, *et al.*, 2008; Rosa-Márquez, *et al.*,

2000) y nuestros resultados, sugieren que una vez ocurre daño por el nematodo *R. reniformis*, patógenos secundarios como hongos y bacterias colonizan sistemáticamente las plantas moviéndose a la semilla vegetativa, sin signos o síntomas evidentes de enfermedad al momento de la siembra. Posiblemente este proceso ha ocurrido desde la aparición de la enfermedad en las áreas más afectadas de los agricultores de apio en Barranquitas y Orocovis, quienes al continuar utilizando las semillas provenientes de plantas enfermas en la siguiente siembra van incrementando cada vez más las densidades de nematodos fitoparásitos, hongos y bacteria fitopatógenos.

La siembra continua de material de propagación contaminado, incrementa los patógenos en suelo a la vez que reduce el contenido de materia orgánica, empobreciendo el suelo y reduciendo considerablemente la producción de apio en la región. En el experimento de control, el tratamiento que empleó la rotación con un producto biológico (DiTera® DF) y un producto químico (Vydate® L) presentó mayor porcentaje de brotación, sugiriendo que la aplicación de un producto Biológico que controla nematodos en suelo también puede estimular el desarrollo de microorganismos benéficos en el suelo, dándole mayor vigor y sanidad a la semilla, ya que el producto está basado en fermentación solida de metabolitos del hongo *Myrothecium verrucaria* (Hoja técnica 2015). Presentando este tratamiento el mayor rendimiento en producción total 42.50 ton/ha. Teniendo en cuenta la baja tasa de germinación obtenida y la heterogeneidad de brotación en las parcelas, el mejor indicativo de un aumento en la producción es el peso individual del corno dependiendo del tratamiento. Así los tratamientos que incluyen enmiendas al suelo como plantas cobertoras sembradas antes de la siembra e incorporadas al suelo y la aplicación de composta con gallinaza y solarización, obtuvieron el mayor incremento en peso de corno 0.97 y 0.85 kg por corno comparados con el tratamiento control que presentó 0.62 kg. Estos resultados sugieren que la aportación de materia orgánica al suelo ayuda a controlar daños y pérdidas por pudrición, permitiendo obtener una mejor producción. Por otro lado, el tratamiento

en que se utilizó rotación de un producto biológico y químico presentó menor incidencia de plantas enfermas 12%, aunque no se obtuvo un peso de corno superior al obtenido en los tratamientos en que se utilizaron plantas cobertoras y composta con gallinaza y solarización. Resultados similares fueron obtenidos con la incorporación de enmiendas al suelo y el uso de cobertoras en Brasil, donde los recomiendan para el manejo de nematodos fitoparásitos (Torres, *et al.*, 2009). Países productores de *A. xanthorrhiza*, como Brasil, realizan esfuerzos para mejorar la tecnología de producción del material de propagación libre de enfermedades, y así mejorar los niveles de producción reduciendo pérdidas por enfermedades en campo; y en tecnologías de almacenamiento que reduzca las pérdidas producidas por enfermedades poscosecha (Torres *et al.*, 2009; Dos-Santos *et al.*, 2004, Santos *et al.*, 2000 Santos, 1997).

Para el caso de hongos en el suelo, se obtuvo un incremento en la cantidad de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco con un promedio final de 1×10^4 ($4.0 \log_{10}$ ufc/g suelo seco). Los principales géneros de hongos identificados en el primer muestreo del experimento fueron *Paecilomyces* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., con frecuencias mayores al 12 % dichos hongos han sido relacionados a indicadores de contenido de materia orgánica en suelos, y han sido identificados en otras investigaciones como los más frecuente en el cultivo de guineo en Puerto Rico, (Castillo-Almanzar, 2016; Conce-Conce, 2016; Chavarría-Carvajal *et al.*, 2001). Además, se encontraron aislamientos pertenecientes al género del género *Fusarium* spp., que generalmente actúa como un patógeno facultativo, y en éste estudio representó al género con mayor número de especies benéficas y dos especies fitopatógenas. Por otro lado, la mayoría de las bacterias identificadas en este primer muestreo fueron gram positivas y se encontró una leve reducción de la población con un promedio final de 1×10^4 (4.0 ufc/g de suelo seco), aunque no se hayan encontrado diferencias significativas. Según investigaciones relacionadas esta densidad bacteriana, está por debajo de una concentración significativa de organismos en el suelo, identificados como

significativas aquellas que van de 10^6 a 10^8 para bacterias. De la misma manera el mismo estudio identifica como significativas a concentraciones de 5×10^4 a 10^6 para el caso de hongos (Back *et al.*, 2002). La presencia de microorganismos benéficos representados en altas cantidades de materia orgánica en suelo es imprescindible para promover procesos como descomposición mineralizado y reciclado de nutrientes de los suelos, además de la importancia antagónica que ejerce sobre los microorganismos fitopatógenos (Pfenning *et al.*, 2011). Las enfermedades por nematodos fitoparásitos son mayores en condiciones de trópico y subtrópico, por el bajo contenido de materia orgánica y nutrientes en el suelo (Luc *et al.*, 2005); Éstas limitaciones en la producción de los cultivos tropicales sugieren la necesidad de incrementar los niveles de materia orgánica en suelo. Los contenidos de materia orgánica se pueden incrementar mediante la aplicación de enmiendas orgánicas o cubiertas vegetales como las que fueron evaluadas en este experimento.

Al comparar la dinámica poblacional de microorganismos en el suelo al principio y final del experimento se notó una leve reducción de unidades formadoras de colonias bacterianas y un leve incremento para las colonias de hongos, posiblemente debido a los cambios en clima de temperatura y precipitación que generan cambios importantes en pH del suelo y poblaciones de microorganismos. Para el año 2016, durante el ciclo del cultivo en este estudio se experimentó una época de sequía presentando un promedio de 3.87 mm al día afectando directamente a los microorganismos del suelo, especialmente las poblaciones bacterianas, lo cual puede explicar las diferencias encontradas.

En adición, el incremento de la población de nematodos fitoparásitos, en el último muestreo, muy posiblemente se debió a que el material de propagación utilizado ya estaba contaminado aportando así, una nueva fuente de inóculo que en presencia del cultivo tuvieron una mayor posibilidad de reproducirse, teniendo en cuenta que antes de la siembra las poblaciones de nematodos fitoparásitos ya se habían reducido por el efecto de los tratamientos previos a la siembra. Sin

embargo, el tratamiento con composta con gallinaza y solarización presento un menor incremento de poblaciones de nematodos fitoparásitos al momento de la cosecha con poblaciones de 240.78 nematodos por 100 cm³ de suelo.

En las pruebas de patogenicidad se pudieron detectar hongos pertenecientes al género *Fusarium*, *F. oxysporum* y *F. solani*, encontrados anteriormente por (Ortiz-Vazquez et al., 2008; García, 2000; Rosa-Márquez, et al., 2000; Díaz 1976) Este género de hongos es característico de suelos tropicales que comparten nicho ecológico y aspectos morfológicos, son cosmopolitas y atacan a un sin número de plantas en el trópico (Leslie et al., 2006; Summerell et al., 2003). Estas especies están asociadas a problemas de pudrición de raíces y tubérculos como papa, yautía, ñame, yuca y papa dulce, donde causa importantes pérdidas económicas (Wang et al., 2014, Ames, 1997). Estos géneros de *Fusarium* tienen la capacidad de penetrar en la cutícula de las plantas mediante la enzima cutinasa, celulasa citosanasas entre otras. En el caso de *F. oxysporum* está más relacionado a problemas vasculares que causan marchitez (Leslie et al., 2006). El hongo después de su penetración, coloniza las células corticales migrando intercelularmente por el parénquima invadiendo el xilema, haciendo más difícil el control de la enfermedad (Pieterse, et al., 2013). La ausencia de *Phytophthora*, que fue reportado en estudios anteriores (Rosa-Máquez, 2000) donde los promedios de precipitación fueron normales para esta área de producción, es de esperarse diferencias significativas en las poblaciones de microorganismos dependientes de las condiciones medioambientales.

En el caso de *Rhizoctonia solani*, reportado anteriormente en *Arracacia* spp. en Puerto Rico, donde presentó colonización y necrosis en el cormo de apio (Rosa-Márquez et al., 2000), muy relacionado a problemas radiculares de tubérculos sin embargo, en este estudio presentó un síntoma diferente al de la pudrición blanda, tornando el tejido afectado en una corteza corchosa, no húmeda y sin cambiar el color del tejido afectado. El hongo *Rhizopus* spp. que colonizó completamente los

tejidos de apio, ha sido reportado como una enfermedad importante en almacenamiento de cultivos como papa dulce en la cual causa pudriciones en el producto mercadeable (Wang *et al.*, 2012).

Entre las bacterias encontradas se identificó a *Erwinia carotovora*. En estudios realizados en Brasil por Henz, *et al.*, 2006, se identificaron a *E. chrysanthemi*, *E. carotovora* subsp. *atroseptica*, como un problema significativo de pos cosecha en apio. En Perú, reportan a *E. chrysanthemi* como agente causal de la pudrición del apio conocida como “pierna negra” o “Pudrición bacteriana blanda” (Ames de Icocha, 1997), el cual tiene la capacidad de colonizar y movilizarse por los haces vasculares de la planta (Piqué *et al.*, 2015) permitiendo que las semillas vegetativas, sin síntomas aparentes, proveniente de una planta enferma se diseminen de manera rápida (Hermann, 1997). El complejo de *Erwinia* ha sido caracterizado en varios cultivos de raíces y tubérculos como el de mayor importancia.

Otras bacterias encontradas, identificadas como *Clavibacter michiganensis*, y *Pseudomonas* spp. asociadas a los síntomas de la pudrición del apio también se han reportado ocasionando síntomas parecidos en papa, en la cual se conoce como “pudrición del anillo bacteriano de la papa” (Sparks *et al.*, 2008), Otros estudios indican que *C. michiganensis* tiene inóculo en forma latente en semillas de papa que hace más difícil la erradicación de la enfermedad basándose en síntomas visibles (Yasuhara-Bell *et al.*, 2015; Yasuhara-Bell *et al.*, 2013 De-León *et al.*, 2006; Franc, 1999;). A diferencia de los hongos, las bacterias identificadas no tienen la capacidad de infectar un organismo por si solas (forma de infección pasiva) sino mediante aperturas naturales, vectores o daños mecánicos en los tejidos (Agris, 2005; Pieterse *et al.*, 2013).

La sintomatología o enfermedad en una planta puede estar asociada a la acción de más de un organismo fitopatógeno, y puede estar determinada por un

complejo de interacciones planta-patógeno, relacionados al medio ambiente especialmente, cuando se trata de enfermedades causadas por organismos de suelo (Agrios, 2005; Back *et al.*, 2002). Es importante mencionar que además de la identificación de los patógenos asociados a los síntomas de la pudrición del apio, su interacción es determinante en los niveles de severidad de la enfermedad que cada uno puede causar de forma separada. Como se observó en este estudio y se ha demostrado en otros estudios, *Rotylenchulus* en asociación con hongos como *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora* y bacterias como *Erwinia* pueden llegar a incrementar el nivel de severidad en plantas (Jones *et al.*, 2013; Agrios, 2005; Back *et al.*, 2002). Estos organismos al estar asociadas a enfermedades vasculares y causar marchitez vascular, son considerados como los más destructivos en cultivos y de difícil control, siendo la mejor alternativa la resistencia varietal (Pieterse *et al.*, 2013). Para el caso del cultivo de apio, esta resistencia se ha podido observar en aquellas variedades de cormo con color blanco (Amaya *et la.*, 2006; Luc *et al.*, 2005; Hermann, 1997). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la mayor producción está definida por la preferencia del consumidor, y en Puerto Rico la demanda mayor es por la variedad más susceptible, apio con cormo de color amarillo (Ortiz *et al.*, 2003).

CONCLUSIONES

- *Rotylenchulus reniformis* fue el nematodo fitoparásito de mayor frecuencia poblacional en suelo, asociado al cultivo de apio.
- La calidad de la semilla fue el factor más limitante para el análisis de los resultados obtenidos en este estudio.
- La semilla contaminada, sin ningún tratamiento de desinfección, aumento las poblaciones de nematodos al finalizar el ciclo aunque se habían logrado reducir previamente con los tratamientos pre-siembra.
- Los tratamientos que incluyeron el uso de cobertoras; composta con gallinaza y solarización y manejo integrado, presentaron una disminución en la población de nematodos fitoparásitos, incrementaron el peso del cormo y las poblaciones de nematodos de vida libre, sugiriendo un incremento en los niveles de materia orgánica, a diferencia del tratamiento testigo que presentó resultados opuestos en las variables evaluadas.
- Se identificaron molecularmente a *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*, morfológicamente a *Rhizoctonia* spp. y *Rhizopus* spp. asociados a los síntomas de la pudrición.
- Se identificaron morfológicamente a *Erwinia carotovora* y molecularmente, a *Clavibacter michiganensis* y *Pseudomonas* spp. asociadas a la pudrición del cormo.

RECOMENDACIONES

- Evaluar métodos para la descontaminación de la semilla vegetativa.
- Reemplazar la semilla contaminada de los lotes comerciales en Barranquitas y Orocovis.
- Adoptar un manejo integrado en el cultivo de apio que incluya los mejores tratamientos evaluados que ayudaron a reducir la población de nematodos y la pudrición.
- Realizar pruebas de patogenicidad a nivel de invernadero para determinar los niveles de severidad de los patógenos identificados en este estudio, por separado y en combinación.
- Realizar un análisis económico para la producción de apio, incluyendo los costos de la aplicación de los tratamientos evaluados que presentaron un mayor control de la enfermedad en ésta investigación.

LITERATURA CITADA

Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology*. 5th ed. Elsevier. Burlington, Vermont. 922 p.

Alvarado, G. A. y L. Ochoa. 2010. Tecnologías Locales de Producción de Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) en el Municipio de Boyacá, Actualidad y División Científica 13(1):125-133.

Amaya, J. E. y J. L. Julca. 2006. "ARRACACHA" *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. Área Temática: Biodiversidad y Conservación de los Recursos Fitogenéticos Andinos. Gerencia Regional de Recursos Naturales y Conservación del Medio Ambiente, Trujillo, Perú. 15 p.

Ames, I. T. 1997. Enfermedades fungosas y bacterianas de raíces y tubérculos andinos. Lima, Perú: Centro Internacional de la papa.

Back, M. A., P. P. J. Haydock and P. Jenkinson. 2002. Disease complexes involving plant parasitic nematodes and soilborne pathogens. *Plant Pathology*, 51(6), 683–697.

Barnett H. L. and B. B. Barry. 2010. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4th ed. American Phytopathological Society Press. St. Paul. Minnesota, USA.

Blas, R., M. Hermann and J. P. Baudoin. 2008. Analysis of the geo-graphic distribution and relationships among Peruvian wild species of *Arracacia*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55: 643–655.

Borges-Pinheiro, J., R. Madeira, A. Ferreira, R. Borges-Pereira, and F. Mendes-Aguiar. 2013. Nematoides na cultura da mandiocinha-salsa. EMBRAPA, 123, 11 p.

Brune, S., L.B. Giordano, C.A. López y P.E. Melo. 1996. Tratamiento Químico de Mudas de Mandioquinha-salsa. Horticultura Brasileira, 14: 207-210.

Camino, J. y C. Días. 1972. Identificación de una bacteriosis en apio (*Arracacia xanthorrhiza*). CIA. Sección de Fitopatología, Maracay. Venezuela. Agronomía Tropical. 22(5): 563-567.

Carval, A., F. Pinheiro, N. Madeira, C. Doss, y C. Rodríguez. 2012. Avaliação de Novos Clones de Mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*) em Área Infestada Pelo Nematóide-das-galhas. In Congresso Brasileiro de Nematologia, Uberlândia. Anais. Uberlândia: 250-251 p.

Castillo-Almánzar, Y. 2016. Prácticas Alternas para el Manejo de Nematodos Fitoparásitos en Plátano (*Musa acuminata* x *Musa balbisiana*, AAB): Efecto sobre la Actividad Microbiológica del Suelo. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, 125 p.

Chavarría-Carvajal, J. A., E. Hernández-Lopez y J.C. Santiago-González. 2017. Manejo de nematodos fitoparásitos y picudo negro (*Cosmopolites sordidus* Germar) en plátano. Impresos RUM, Mayagüez, Puerto Rico. 38 p.

Chavarría-Carvajal, J. A., R. Macchiavelli, y E. Hernández. 2016. Poultry litter and a rotation crop for the management of plant-parasitic nematodes and banana weevil on plantain. Submitted to J.Agric.Univ.P.R.

Chavarría-Carvajal, J. A., R. Rodríguez-Kábana, J.W. Kloepper y Morgan-Jones G. 2001. Changes in populations of microorganisms associated with organic amendments and benzaldehyde to control plant-parasitic nematodes. *Nematropica* 31:165-185.

Chavarría-Carvajal, J. A. y R. Rodríguez-Kábana. 1998. Alginate films for assessment of parasitism of *Meloidogyne incognita* eggs in soil treated with organic amendments. *Nematropica* 28: 41-48.

Chavarría-Carvajal, J.A. 1988. Evaluación de dosis, intervalos y rotación de cuatro plaguicidas granulados registrados para el control de nematodos y el picudo negro (*Cosmopolites sordidus* Germar), en plátanos. Tesis M.S., Depto. Prot. Cult., Recinto de Mayagüez, Universidad de Puerto Rico. 87 p.

Conce-Conce, M. 2016. Prácticas agrícolas para el manejo de nematodos fitoparásitos en plátano (*Musa* spp., AAB): efecto sobre la actividad microbiológica del suelo. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, 114 p.

Cook, O. F. and G. N. Coilins. 1903. Economic plants of Puerto Rico. *Contr. U.S. Natural Herbology*. 8:57-269.

Cortés, M. 2015. Los farináceos en Puerto Rico: VIII-Apio. *Agrotemas de Puerto Rico*. Estación Experimental Agrícola. Noviembre, 2015.

Costa, H., J. A. Ventura, Santos, J. M. y C. A. Carmo. 2000. Nematóides das Lesões em Batata Baroa. *Emcaper: Vitória-ES, Emcaper*, 106 p.

Costa, H., J. M. Santos, J. A. Ventura y L. Zambolim. 1998. *Pratylenchus coffeae* em mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza*) no Estado do Espírito Santo. *Nematologia Brasileira*, 22(2):1-7.

De-León, L., F. Siverio, and A. Rodríguez. 2006. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds using immunomagnetic separation. *Journal of Microbiological Methods*, 67(1):141–149.

Departamento de Agricultura. 2015. Compendio Estadístico. Oficina de Estadísticas Agrícolas. San Juan, P.R.

Díaz, C. y J. Camino. 1976. Una nueva forma de *Fusarium solani*, Patógeno del Apio (*Arracacia xanthorrhiza*) en Venezuela. *Agronomía Tropical*. 26(4): 353-358.

Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini M.G., González L., Cuadroda, M. y Robledo C.W. InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>.

Domínguez, S., R. Delgado, D. Coronado, y F. Dos Santos. 2006. Desarrollo Rural Desde las Personas: Una Experiencia del Mejoramiento de la Competitividad de la Arracacha. Primera Edición. Red de Agroindustria Rural del Perú, Lima, 116 p.

Dos-Santos, F., S. Salas, D. Flores-Salgado, A. Guananga and G. Coronado. 2004. Manejo de semilla y uso de almacigo en el cultivo de la arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*). Desarrollo de Agroindustrias y Mercados para la Arracacha 17 p.

Franc, G. D. 1999. Persistence and latency of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in field-grown seed potatoes. *Plant Disease*, 83(3):247–250.

García, R. 2000. Especies y sub-especies de *Erwinia*, causantes de pudrición blanda y pierna negra en la papa cultivada, en el estado Mérida-Venezuela. *Revista Forestal Venezolana*, 44(1):107–114.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.

Henz, G., F. Reifschneider and V. Duarte. 2006. *Erwinia chrysanthemi*: Pectolytic bacterium causing soft rot outbreaks of arracacha in Brazil. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 41(10):1567–1571.

Henz, G. P., F. J. Reifschneider, and F. F. Dos Santos. 2005. Reaction of arracacha genotypes to the root soft rot caused by *Pectobacterium chrysanthemi*. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 40(1), 95–98.

Henz, G. 2002. Doenças da mandioquinha-salsa e sua situação atual no Brasil. *Horticultura de Brasil*, 20(2):135–144.

Hermann, M. 1997. Arracacha. In: Hermann, M. and Heller, J. (eds.) *Andean Roots and Tubers: ahupa, arracacha, maca and yacon*. International Potato Center, Perú. 21:75–172.

Jiménez, F. 2005. Características nutricionales de la arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) y sus perspectivas en la alimentación. *Publicación Virtual Red Peruana de Alimentación y Nutrición*. Lima, Perú. 22 p.

Jones, J. T., A. Haegeman, E. G. Danchin, H. S. Gaur, J. Helder, M. G. Jones, R. N. Perry. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14(9), 946-961.

Lelliott, R. A. and D. E. Stead, 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants in: *Methods in Plant Pathology*, Vol. 2. British Society for Plant Pathology, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.

León, M., M. Villacorta, and S. Pagador. 2011. Chemical Composition of oca (*Oxalis tuberosa*), Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) and tarwi (*Lupinus mutabilis*). Formulation of a base mixture for food. *Rev. Venez. Cienc. Tecnol. Aliment.* 2(2):239-252.

Leslie, J., B. Summerell and S. Bullock. 2006. *The Fusarium Laboratory manual*. First ed. Manhattan, Kansas.

Lim, T. K., 2015. *Arracacia xanthorrhiza* in: Edible medicinal and non medicinal plants, modified stems, roots, bulbs. Springer. Vol. 9. Dordrech 361-266 p.

Liquet-González R. 2016. Efectividad de nematicidas biológicos, nematodos entomopatógenos y micorrizas en el control de fitonematodos y picudo negro (*Cosmopolites sordidus* Germar) en plátano. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, 157 p.

Luc, M., R. A. Sikora, and J. Bridge, 2005. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. 2da ed. Netherlands: CABI.

Mai, W. F. and P. G. Mullin. 1996. *Plant-parasitic nematodes (A pictorial key to genera)* 5 ed. Ithaca, New York, USA. Cornell University Press.

Martínez-Méndez H. 2016. Efectividad de nematocidas biológicos y nematodos entomopatógenos en el control de fitonematodos y picudo negro (*Cosmopolites sordidus* Germar) en plátano. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, 97 p.

Mazón-Ortíz, N., R. Castillo-Torrez, M. Hermann y P. Espinosa. 1996. La arracacha o zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) en Ecuador. Micelánea N°67. Quito, Ecuador. 15 p.

Melo M., L. Pimenta, L. Oliveira, and M. Ferreira. 2016. First report of *Ceratocystis fimbriata* causing black rot on *Arracacia xanthorrhiza* in Brazil. Plant Disease 2016 100:3, 652.

Mendes, M. L., M. D. Pria, D. M. Geus-Bouwman , F. R. Vicente, F. Tomaselli. 2001. Ocorrência de *Pratylenchus penetrans* (Cobb, 1917) Chitwood & Oteifa, 1952, em Mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancr.) no Município de Castro, PR. Nematologia Brasileira, Brasilia, DF, 25(1):85-87.

Monteiro, A. R. 1980. nematoide *Pratylenchus penetrans* causa necrose em mandioquinha- salsa no Brasil. In: Reunião Brasileira de Nematologia, Piracicaba. Sociedade Brasileira de Nematologia, São Paulo, p. 59-63.

Morillo, E., and G. Sécond. 2016. Tracing the domestication of the Andean root crop arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancr.): A molecular survey confirms the selection of a wild form apt to asexual reproduction. Plant Genetic Resources, 1–8.

Muños, A. L., A. G. Alvarado, y P. J. Almazar-Merchan. 2015. Caracterización preliminar del cultivo de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) en el departamento de Boyacá. Revista de Ciencias Agrícolas, 32(1), 3–11.

Orlío, A. F., N. Lucinda, A. N. Dusi, T. Nagata and A. K. Inoue-Nagata. 2013. Complete genome sequence of Arracacha Mottle Virus. Arch. Jan; 158(1): 291–295. doi: 10.1007/s00705-012-1473-x.

Ortiz-Vázquez, O. E., C. Estévez de Jensen y B. Vega. 2008. La pudrición de la raíz y del corno en el apio amarillo *Arracacia xanthorrhiza*. Cartel Estudiante Graduado. Puerto Rico: Sociedad Puertorriqueña de Ciencias Agrícolas, Reunion Científica. Noviembre 2008.

Ortiz, C. E. y W. I. Lugo. 2003. Memorias del Foro de Apio. El cultivo de apio (*Arracacia xanthorrhiza*) en Puerto Rico. Estación Experimental Agrícola. Universidad de Puerto Rico. Recinto de Mayagüez. 34 p.

Ortiz, C.E., A. Acosta and E. Orengo-Santiago. 2000. Dry weight accumulation in *Arracacha* plant parts. I. Agric. Univ. de PR. 84(1-2): 87-90.

Pfenning, L., y L. Magalhães. 2011. Hongos del suelo, saprófitos y patógenos de plantas In: Manual de biología de suelos tropicales. México. Secretaría d Medio Ambiente y Recursos Naturales. 243–280.

Pieterse, C. M. J., E. H. Poelman, S. C. M. Van Wees and M. Dicke. 2013. Induced plant responses to microbes and insects. *Frontiers in Plant Science*, 21 (Nov) 2013. 475 p.

Pinheiro, J. B. 2013. Nematoides na cultura da mandioquinha-salsa. (P. y. Ministerio de Agricultura, Ed.) Circular técnica Embrapa, 123 (ISSN 1415-3033), 1-11.

Piqué, N., D. Miñana-Galbis, S. Merino and J. M. Tomás, 2015. Virulence factors of *Erwinia amylovora*. A review. International Journal of Molecular Sciences, 16(6), 12836–12854.

Reis, A. and W. M. Nascimento. 2011. New Apiaceous hosts of *Sclerotinia sclerotiorum* in the cerrado region of Brazil. Horticultura Brasileira, 29(1), 122-124.

Ribeiro, R., F. Finger, M. Puiatti y V. Días. 2007. Vida útil e metabolismo de carboidratos em raízes de mandioquinha-salsa sob refrigeração e filme de PVC. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 42(4):453-458.

Román-Soto, E. 2015. Control de la pudrición seca en ñame (*Dioscorea rotundata* Poir) .causado por nematodos en Puerto Rico. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, 129 p.

Rosado-Arroyo, S. Y. 2005. Efecto de prácticas agrícolas sustentables en el manejo de nematodos fitoparasíticos en calabaza (*Cucurbita moschata* Dutch). Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, 114 p.

Rosa-Márquez E. 1998. Hongos Fitopatógenos del corno de apio (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) en Puerto Rico Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, 75 p.

Rosa-Márquez, E. L. Rivera, C. Ortiz, y A. Rodríguez. 2000. Hongos Patógenos del Corno de Apio (*Arracacia xanthorrhiza* Bacroft) en puerto Rico. J. Agric. Univ. P.R., 84(1–2), 53–64.

Rosso, C., C. Medina and M. Lobo. 2006. Morphologic characterization and agronomic evaluation of a colombian collection of arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). Neesletter. FAO-Bioiversity. Issue No. 132, 22-29.

Salas, S., R. Delgado y J. Espinosa. 2002. Informe de fase de proyecto. Desarrollo de agroindustrias y mercados para la arracacha. Fase 1999-2002. Lima, Perú. Agosto, 2002.

Salas-Domínguez, S., R. Delgado y J. Espinoza. 2002. Desarrollo de agroindustrias y mercados para la arracacha. Informe de Fase 1999 – 2002. Centro Internacional de la Papa. Lima. 104 p.

SAS, Statistical Analysis System (2004) SAS Institute Inc. SAS/STAT® 9.1. User's Guide Cary, NC: SAS Institute Inc. Cary, N.C., USA.

Santos, F. 1997. Utilização de mudas juvenis e do pré-enraizamento no impedimento da floração em mandioquinha-salsa. Informe Agropecuário. 19(190):27-28, 33-34

Santos, F., S. Salas, D. Flores, A. Guananga y G. Coronado. 2000. Desarrollo de agroindustria y mercados para la arracacha; manejo de semillas y uso de almacigo en el cultivo de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) 16 p.

Schaad, N. W., J. B. Jones and W. Chun. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd ed. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA, 378 p.

Scruggs, A. C. and L. M. Quesada-Ocampo. 2016. Cultural, chemical, and alternative control strategies for *Rhizopus* soft rot of sweetpotato. Plant Disease, 100(8):1532-1540.

<http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-01-16-0051-RE>

Sousa, C. 2014. Ocorrência de Viroses em Mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Brancroft) nas Principais Regiões Produtoras do Botucato Brasil: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Dissertação de Maestria. 113 p.

Sparks, A., and M. Kennelly. 2008. Bacterial ring rot of potato. Kansas State University. Plant Pathology. EP-150. Manhattan.

Summerell, B. A., B. Salleh and J. F. Leslie. 2003. A Utilitarian approach to *Fusarium* identification. Plant Disease, 87(2):117–128.

Tapia, M. E., A. M. Fries. 2007. Agronomía de los cultivos andinos en: Guía de Campo de los Cultivos Andinos. 1er ed. Lima: Cadmo Rosell. 21-122 p.

Torres, R. G., N. R. Ribeiro, C. A. Boer, A. F. Neto and E. Corbo, 2009. Manejo Integrado De Nematóides Em Sistema De Plantio Direto No Cerrado, (1):1–30.

Velezmore, J., y D. P. Panizo. 2004. Perfil de Mercado de la ARRACACHA. Programa de Desarrollo Rural y Sostenible. Cajamarca. 17 p.

Wang, R., B. Gao, S. Chen, J. Ma, X. Li and C. Xue. 2012. First report of *Rhizopus oryzae* causing soft rot on storage roots of sweetpotato in China. Plant Disease.

Wang, R.Y., B. Gao, Li X. H., Ma J. and L.S. Chen. 2014. First report of *Fusarium solani* causing *Fusarium* root rot and stem canker on storage roots of sweet potato in china. Plant Disease 98(1):160-160.

Watanabe, T. 1994. Pictorial atlas of soil and seed fungi: Morphologies of cultured fungi and key to species. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida. 403 p.

Yasuhara-Bell J., F. Baysal-Gurel, S. A. Miller and A. M. Alvarez. 2015. Utility of a loop-mediated amplification assay for detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in seeds and plant tissues, Canadian Journal of Plant Pathology, 37(3):260-266

Yasuhara-Bell, J., R. Kubota, D. M. Jenkins and A. M Alvarez. 2013. Loop-mediated amplification of the *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Canadian Journal of Plant Pathology, 103(12):1220–1226.

APÉNDICES

Apéndice 1. Análisis químico de la composta con gallinaza utilizada en el tratamiento de composta con gallinaza y solarización.

INFORME DE RESULTADOS			
SOLICITANTE		L-15- 121	
Nombre	Martha Giraldo	Fecha de informe	3-Sep-15
Compañía	EEA - Corozal		
Dirección predio			
Dirección postal			
Ciudad	Zip Code		
Teléfono	787-859-3075		
Email	martha.giraldo@upr.edu		
Propósito	H-094C		
ANÁLISIS DE MATERIAL ORGÁNICO			
CUSTODIOS EN LCA			
Analista	Z. Nieto	<i>Julia M. O'Hallorans</i> Dra. Julia O'Hallorans, Directora	
Analista		<i>Yamilis Ocasio-Rodríguez</i> Leda. Yamilis Ocasio-Rodríguez, Químico	
Revisor	Y. Ocasio		
Num. LCA	O-15-0423	O-15-0424	
Identificación	Composta gallinaza	Composta café	
pH	7.90	7.27	
Conductividad $\mu\text{S}/\text{cm}$	82000	4020	
Nitrógeno orgánico total %TKN	2.50	0.85	
Fósforo total %TKP	1.28	0.47	
Materia orgánica %MO	27.4	6.92	
Calcio mgCa/Kg	3840	5558	
Magnesio mgMg/Kg	995	557	
Potasio mgK/Kg	16900	5200	
Sodio mgNa/Kg	5235	60.3	

La información detallada en este reporte es para uso exclusivo de investigación y no podrá ser utilizada para procesos legales ni como certificación para agencias reguladoras. El Laboratorio Central Analítico de la Estación Experimental Agrícola no se hace responsable por los resultados de los análisis realizados ni por sus implicaciones legales a terceros. Los análisis químicos no son absolutos y están sujetos variables que por su naturaleza no siempre pueden ser controladas.

Laboratorio Central Analítico
 Universidad de Puerto Rico
 1193 Calle Guayacán
 Jardín Botánico Sur
 San Juan, PR 00926-1118
 (787) 767-9705, ext. 2134, 2187
 laboratorio.central@upr.edu



UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
UPR

Apéndice 2. Análisis químico de tratamientos en el primer muestreo

Cuadro 22. Resultados de análisis de suelo antes de la aplicación de los tratamientos del experimento de métodos de control para la enfermedad.

Tratam.	pH	CE μS/cm	%MO	P-PO4 mg /Kg	Ca	Mg	K	Na	Al
					Cationes intercambiables, mg/Kg				
1	5.72	244	0.35	7.00	2468	179	326	27.0	ND
2	6.04	407	1.00	11.3	2001	121	221	16.5	ND
3	5.55	250	2.56	5.69	1618	159	220	23.81	ND
4	5.62	269	2.75	3.66	1555	105	201	22.5	ND
5	5.61	251	2.29	6.01	1851	101	212	13	ND
6	5.30	236	1.69	4.51	1221	95.2	160	13.0	42.3
7	6.21	351	2.22	9.10	2165	125	230	16.7	ND
8	5.02	177	1.51	2.72	997	79.2	117	12.8	191

Apéndice 3. Análisis de la varianza para las variables en la evaluación de métodos de reducción de poblaciones de nematodos y severidad de la enfermedad.

Análisis de varianzas para el primer muestreo (antes de la aplicación de os tratamientos) por especie de nematodo.

Análisis de variancia

Variable ¹	N	R ²	Adj R ²	CV
<i>Rotylenchulus</i>	32	0,24	0,00	7,04
<i>Helicotylenchus</i>	32	0,65	0,48	13,49
Vida Libre	32	0,56	0,34	16,39

¹ = Análisis de la variable transformada con logaritmo base 10

N = número de observaciones

R² = coeficiente de regresión

Cv = Coeficiente de variación (%)

Cuadrados medios

S.V.	<i>R. reniformis</i>	<i>H. milticinctus</i>	Vida libre
Model.	0,02	0,16	0,13
Bloque	0,04 n.s	0,24 *	0,29*
Tratamiento	0,02 n.s	0,12*	0,06 n.s
Error	0,03	0,04	0,05

* Diferencias significativas (P≤0.05)

n.s = diferencias no significativas (P≤0.05)

Análisis de varianzas para el segundo muestreo (antes de la siembra) por especie de nematodo.

Análisis de variancia

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
<i>Rotylenchulus</i>	32	0,56	0,34	26,60
<i>Helicotylenchus</i>	32	0,63	0,46	21,52
Vida Libre	32	0,51	0,27	22,77

¹ = Análisis de la variable transformada con logaritmo base 10

N = número de observaciones

R² = coeficiente de regresión

Cv = Coeficiente de variación (%)

Cuadrados medios

S.V.	<i>R. reniformis</i>	<i>H. milticinctus</i>	Vida libre
Model.	0,76	0,17	0,27
REP	1,78*	0,28 *	0,55 *
Trat	0,32 n.s	0,12 n.s	0,15 n. s
Error	0,21	0,06	0,13

* Diferencias significativas (P≤0.05)

n.s = diferencias no significativas (P≤0.05)

Análisis de varianzas para el tercer muestreo (cuatro meses después de la siembra) por especie de nematodo.

Análisis de variancia

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
<i>Rotylenchulus</i>	32	0,82	0,73	14,66
<i>Helicotylenchus</i>	32	0,73	0,60	43,16
Vida Libre	32	0,40	0,12	13,52

¹ = Análisis de la variable transformada con logaritmo base 10

N = numero de observaciones

R² = coeficiente de regresión

Cv = Coeficiente de variación (%)

Suma de cuadrados parcial

S.V.	<i>R. reniformis</i>	<i>H. milticinctus</i>	Vida libre
Model.	0,79	0,43	0,08
REP	2,05*	1,29 *	0,02 n.s
Trat	0,25 *	0,06 n.s	0,11 n.s
Error	0,08	0,07	0,06

* Diferencias significativas (P≤0.05)

n.s = diferencias no significativas (P≤0.05)

Prueba de Tukey para *Rotylenchulus* en el tercer muestreo.

Test: Tukey Alpha:=0,05 LSD:=0,43

Error: 0,08 df: 21

Tratamiento	Medias ¹
Solarización	387.83 b ²
Biológico + químico	177.55 a b
Composta de gallinaza y solarización	72.48 a
Desinfección semilla	307.53 a b
Plantas cobertoras	193.83 a b
Intercalado	63.37 a
Manejo Integrado	128.13 a
Testigo	490.93 b
Promedio	227.71

¹=Valores promedios sin transformar (nematodos en 100 cm³ de suelo)

²= rangos con diferentes letras muestran diferencias significativas (p > 0,05)

Análisis de varianzas para el cuarto muestreo (en la cosecha) por especie de nematodo.

Análisis de variancia

Variable ¹	N	R ²	Adj R ²	CV
<i>Rotylenchulus</i>	32	0,50	0,26	16,28
<i>Helicotylenchus</i>	32	0,60	0,41	25,68
<i>Pratylenchus</i>	32	0,76	0,64	69,49
Vida Libre	32	0,58	0,37	19,94

¹ = Análisis de la variable transformada con logaritmo base 10

N = número de observaciones

R² = coeficiente de regresión

Cv = Coeficiente de variación (%)

Cuadrados medios

S.V.	<i>R. reniformis</i>	<i>H. milticinctus</i>	<i>Pratylenchus spp.</i>	Vida libre
Model.	0,43	0,59	0,87	0,30
REP	0,13 n.s	0,66 *	2,44*	0,47 *
Trat	0,56 *	0,57 *	0,20 n.s	0,23 n.s
Error	0,21	0,19	0,13	0,10

* Diferencias significativas (P≤0.05)

n.s = diferencias no significativas (P≤0.05)

Prueba de Tukey para *Rotylenchulus* en el cuarto muestreo (en la cosecha).

Test: Tukey Alpha:=0,05 LSD:=0,67112

Error: 0,2083 df: 21

Tratamiento	Medias ¹
-------------	---------------------

Solarización	656.78	a ²	b
Biológico + químico	1814.93	a	
Composta de gallinaza y solarización	240.78		b
Desinfección semilla	874.95	a	b
Plantas cobertoras	930.33	a	b
Intercalado	476.00		b
Manejo Integrado	1457.55	a	
Testigo	2524.93	a	
Promedio	1122.03		

¹=Valores promedios sin transformar (nematodos en 100 cm³ de suelo)

²= rangos con diferentes letras muestran diferencias significativas (p > 0,05)

Prueba de Diferencias Mínimas Significativas para *Helicotylenchus* en el cuarto muestreo (en la cosecha).

Test: Tukey Alpha:=0,05 LSD:=0,64070

Error: 0,1898 df: 21

Tratamiento	Medias¹		
Solarización	64.33	a ²	b
Biológico + químico	109.23	a	
Composta de gallinaza y solarización	18.90		c
Desinfección semilla	89.55	a	b
Plantas cobertoras	148.95	a	b
Intercalado	45.98		b c
Manejo Integrado	71.83	a	b
Testigo	208.15	a	
Promedio	94.62		

¹=Valores promedios sin transformar (nematodos en 100 cm³ de suelo)

²= rangos con diferentes letras muestran diferencias significativas (p > 0,05)

Análisis de varianzas para muestras de raíz por especie de nematodo.

Análisis de variancia

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
<i>Rotylenchulus</i>	32	0,24	0,00	138,36
<i>Pratylenchus</i>	32	0,32	0,00	238,55
<i>Tylenchus</i>	32	0,55	0,34	105,36
Vida Libre	32	0,49	0,24	51,09

¹ = Análisis de la variable transformada con logaritmo base 10

N = número de observaciones

R² = coeficiente de regresión

Cv = Coeficiente de variación (%)

Cuadrados Medios

S.V.	<i>Rotylenchulus</i>	<i>Pratylenchus</i>	<i>Tylenchus</i>	Vida Libre
Model.	0,04	0,06	0,11	0,49
REP	0,10 n.s	0,05 n.s	0,11 n.s	0,51 n.s
Trat	0,02 n.s	0,06 n.s	0,12 *	0,48 n.s
Error	0,07	0,06	0,04	0,24

* Diferencias significativas ($P \leq 0.05$)

n.s = diferencias no significativas ($P \leq 0.05$)

Análisis de varianzas para la variable germinación.

Analysis of variance como DCA

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
Germinación	32	0,37	0,19	43,82

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model.	1243,75	7	177,68	2,05	0,0900
Tratamiento	1243,75	7	177,68	2,05	0,0900
Error	2081,25	24	86,72		
Total	3325,00	31			

* Diferencias significativas ($P \leq 0.05$)

n.s = diferencias no significativas ($P \leq 0.05$)

Análisis de varianzas para la variable rendimiento total en toneladas por ha.

Analysis of variance

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
Log Rend ton/ha	32	0,27	0,00	897,44

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value	Coef
Model.	0,62	11	0,06	0,67	0,7508	
Tratamiento	0,32	7	0,05	0,54	0,7919	
Bloque	0,13	3	0,04	0,54	0,6625	
% germ.	0,09	1	0,09	1,09	0,3084	-4,4E-03
Error	1,67	20	0,08			
Total	2,29	31				

* Diferencias significativas ($P \leq 0.05$)

n.s = diferencias no significativas ($P \leq 0.05$)

Análisis de varianzas para la variable rendimiento parcial, peso por cormo.

Analysis of variance

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
Log Peso/cormo(kg)	272	0,17	0,14	120,48

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value	Coef
Model.	4,75	11	0,43	4,98	<0,0001	
Bloques	0,97	3	0,32	3,73	0,0118	
Tratamientos	3,61	7	0,52	5,95	<0,0001	
%	0,53	1	0,53	6,07	0,0144	-0,01
Error	22,53	260	0,09			
Total	27,28	271				

* Diferencias significativas (P≤0.05)

n.s = diferencias no significativas (P≤0.05)

Test: Tukey Alpha:=0,05 LSD:=0,14746

Error: 0,0867 df: 260

Tratamientos	Means	n	S.E.
Intercalado	0.95	29	0,06
Plantas cobertoras	0.94	36	0,05
Manejo integrado	0.88	44	0,05
Composta de gallinaza y solarización	0.80	30	0,05
Solarización	0.79	19	0,07
Biológico + químico	0.72	50	0,04
Control	0.55	23	0,07
Desinfección semilla	0.50	41	0,05

Means with a common letter are not significantly different (p > 0,05)

Análisis de varianzas para la variable diámetro del cormo.

Analysis of variance

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
LogDiámetro(cm)	272	0,17	0,13	18,27

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value	Coef
Model.	0,87	11	0,08	4,43	<0,0001	
Repeticiones	0,30	3	0,10	5,68	0,0009	
Tratamientos	0,59	7	0,08	4,75	<0,0001	
%	0,05	1	0,05	2,99	0,0850	-1,6E-03
Error	4,62	259	0,02			
Total	5,49	270				

Análisis de varianzas para la variable numero hijuelos.

Analysis of variance

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
#dehijuelos/ha1	32	0,18	0,00	75,24

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value	Coef
Model.	1130980,60	11	102816,42	0,39	0,9450	
Rep	251247,49	3	83749,16	0,32	0,8131	
Trat	709713,75	7	101387,68	0,38	0,9012	
% brotación	99120,66	1	99120,66	0,37	0,5473	4,60
Error	5288711,20	20	264435,56			
Total	6419691,80	31				

Análisis de varianzas para la variable peso de semilla.

Analysis of variance

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
# de hijuelos/ha1	32	0,18	0,00	75,24

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value	Coef
Model.	1130980,60	11	102816,42	0,39	0,9450	
Bloque	251247,49	3	83749,16	0,32	0,8131	
Tratamiento	709713,75	7	101387,68	0,38	0,9012	
% brotación	99120,66	1	99120,66	0,37	0,5473	4,60
Error	5288711,20	20	264435,56			
Total	6419691,80	31				

Prueba de Chi² para severidad de la enfermedad.

Statistic	Value	df	p
Chi-square (Pearson)	16,60	7	0,0202
Chi-square (ML-G2)	15,55	7	0,0295
ContingencyCoef. (Cramer)	0,17		
Contingency Coef.(Pearson)	0,24		

Análisis de varianzas para la variable ufc de bacterias en el primer muestreo.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
UFC	32	0.66	0.51	3.03

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.78	10	0.08	4.17	0.0028
Bloques	0.53	3	0.18	9.32	0.0004
Tratamientos	0.26	7	0.04	1.96	0.1108
Error	0.39	21	0.02		
Total	1.18	31			

Análisis de varianzas para la variable ufc de bacterias en el segundo muestreo.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
logufcbacterias	32	0.72	0.54	4.77

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo.	1.71	12	0.14	3.98	0.0037	
Tratamientos	0.38	7	0.05	1.50	0.2266	
Bloques	0.38	3	0.13	3.53	0.0347	
%brotación	0.43	1	0.43	12.13	0.0025	0.02
Muestreo 1	0.10	1	0.10	2.87	0.1063	-0.54
Error	0.68	19	0.04			
Total	2.39	31				

Análisis de varianzas para la variable ufc/g de suelo de hongos en el primer muestreo.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
UFC/g	32	0.23	0.00	8.08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.		0.59	10	0.06	0.63	0.7738
Boque		0.36	3	0.12	1.28	0.3070
Tratamiento		0.23	7	0.03	0.35	0.9216
Error		1.99	21	0.09		
Total		2.58	31			

Análisis de varianzas para la variable ufc/g de suelo de hongos en el primer muestreo.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
UFC/g	32	0.47	0.13	6.90

8

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo.	1.29	12	0.11	1.38	0.2557	
Bloques	0.42	3	0.14	1.79	0.1841	
Tratamientos	0.64	7	0.09	1.18	0.3584	
% Brotación	0.14	1	0.14	1.81	0.1942	0.01
Muestreo 1	0.03	1	0.03	0.40	0.5351	0.13
Error	1.48	19	0.08			
Total	2.77	31				