

Meloidogyne incognita y Hongos Patógenos del Suelo en el Cultivo del Kenaf
(*Hibiscus cannabinus*)

por

Wendy Michelle Pérez Pérez

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

MAESTRO EN CIENCIAS

en

Protección de Cultivos

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGUEZ
2007

Aprobado por

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

Fecha

Miguel A. Muñoz Muñoz, Ph.D.
Miembro, Comité Graduado

Fecha

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

Fecha

Francisco M. Monroig, Ph.D.
Representante de Escuela Graduada

Fecha

Arístides M. Armstrong, M.S.
Director de Departamento

Fecha

Abstract

A research was performed to determine the susceptibility of the kenaf plant (*Hibiscus cannabinus*) in presence of certain pathogens commonly found in the soil. The effect of the nematode *Meloidogyne incognita* and the soilborne's fungi *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina* were evaluated. The interactions between the nematode and the soilborne fungi were also studied. Experiments were established in a greenhouse to determine the inoculum levels of *Meloidogyne incognita* required to cause damage to plants. For the experiment of *Meloidogyne incognita*, kenaf's plants died with inoculum levels of 12,000 eggs/J2. In the experiment of the soilborne fungi, it was demonstrated that *Fusarium oxysporum* reduced the height of the kenaf's plant; while *Rhizoctonia solani* resulted non pathogenic to the crop. The interaction between *Meloidogyne incognita*/*Macrophomina phaseolina* increased the weight of the kenaf's roots; however the interaction *Meloidogyne incognita*/*Fusarium oxysporum* had the opposite effect.

Resumen

En un estudio realizado se evidenció la susceptibilidad de la planta kenaf (*Hibiscus cannabinus*) ante la presencia de determinados patógenos habitantes del suelo. Para esto se evaluó el efecto del nemátodo *Meloidogyne incognita* y los hongos *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Macrophomina phaseolina*; además del efecto causado por la interacción de ambos patógenos. Se realizaron experimentos en invernadero con el propósito de determinar niveles de inóculo de *Meloidogyne incognita* capaces de producir daño a plántulas. Para el experimento de *Meloidogyne incognita*, las plantas de kenaf murieron al recibir el nivel de inóculo de 12,000 huevos/J2. Al inocular hongos fitopatógenos, se comprobó que el hongo *Fusarium oxysporum* afecta negativamente el crecimiento de las plantas de kenaf, mientras *Rhizoctonia solani* resultó ser no patogénico al cultivo. Se determinó que la interacción entre *Meloidogyne incognita* y *Macrophomina phaseolina* aumenta el peso fresco de raíz de la planta, contrario a la interacción de *Meloidogyne incognita* y *Fusarium oxysporum*.

Agradecimientos

- Primeramente agradezco a Dios, por darme la sabiduría y la tolerancia para poder seguir y lograr terminar este trabajo que no ha sido fácil, ha sido un poco cuesta arriba, pero esto significa mi mayor logro y satisfacción durante este año.
- Segundo, agradezco a mi familia en especial a mi madre Emma Pérez Rodríguez y por supuesto a mi hermana Janice por estar siempre conmigo en los momentos de mayor dificultad y de alegría.
- Agradezco a mi Comité Graduado, ya que sin ellos no hubiera podido terminar este trabajo. Dr. Roberto Vargas-Ayala, gracias por apoyarme y por supuesto por confiar en mí. Dra. Lydia Rivera, no sabe cuánto le agradezco el que formara parte de mi Comité Graduado. Usted es un gran ser humano y excelente profesional; gracias mil. Dr. Miguel Muñoz, gracias por confiar en mí en todo momento y por ser siempre lo más objetivo posible; Muchas gracias.
- Por último, y no menos importante, deseo agradecer a dos seres extraordinarios, a María y a Jeannette; las secretarias del Departamento de Protección de Cultivos, personas como ustedes hacen la diferencia.

Dedicatoria:

Le dedico este trabajo a tres personas importantes en mi vida: a mi hija Arianna Sophía, que llegó en un momento crucial en mi vida y me ha llenado de mucha alegría, eres la felicidad más grande para mí. A mami (Emma Pérez Rodríguez), sé que no han sido fáciles estos años, han sido muy duros para nosotras pero aquí está, mi promesa de poder terminar y lo hice. Jan, eres mi fortaleza y mi apoyo incondicional, le agradezco a Dios, el que me permitiera tener una hermana y que esa fueras tu.

Las amo Wen

Tabla de Contenido

	Página
Abstract	ii
Resumen	iii
Agradecimientos	v
Lista de Cuadros	vii
Lista de Figuras	ix
Introducción	1
Revisión de Literatura	2
Materiales y Métodos	11
Pruebas de Patogenicidad	13
Densidad Poblacional de <i>Meloidogyne incognita</i>	15
Inóculo del nemátodo	15
Densidades poblacionales iniciales (huevos/J2)	15
Presencia de Hongos Patógenos del Suelo	17
Ensayo con hongos del suelo	17
Interacciones entre Hongos del suelo y <i>Meloidogyne incognita</i>	19
Resultados y Discusión	20
Pruebas de patogenicidad	20
Densidades poblacionales de <i>Meloidogyne incognita</i>	21
Presencia de hongos patógenos del suelo	25
Interacciones entre hongos del suelo y <i>Meloidogyne incognita</i>	29
Conclusiones	35
Recomendaciones	36
Literatura Citada	37

Lista de Cuadros

	Página
Cuadro 1. Variables evaluadas durante las pruebas de patogenicidad realizadas con los hongos del suelo <i>Macrophomina phaseolina</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> y plantas control, 21 días después de la inoculación.....	20
Cuadro 2.1. Variables evaluadas en plantas de kenaf (<i>H. cannabinus</i>) inoculadas con huevos y/o J2 del nemátodo nodulador <i>M. incognita</i> después de 60 días mantenidas en condiciones de invernadero durante el primer experimento.....	22
Cuadro 2.2. Variables evaluadas en plantas de kenaf (<i>H. cannabinus</i>) inoculadas con huevos y/o J2 del nemátodo nodulador <i>M. incognita</i> después de 60 días mantenidas en condiciones de invernadero durante el segundo experimento	23
Cuadro 2.3. Variables evaluadas en plantas de kenaf (<i>H. cannabinus</i>) inoculadas con huevos y/o J2 del nemátodo nodulador <i>M. incognita</i> después de 60 días mantenidas en condiciones de invernadero durante el tercer experimento.....	24
Cuadro 3.1. Variables evaluadas en plantas de kenaf (<i>H. cannabinus</i>) inoculadas con los hongos del suelo: <i>M. phaseolina</i> , <i>F. oxysporum</i> <i>R. solani</i> después de 30 días mantenidas en condiciones de invernadero durante el primer experimento.....	26
Cuadro 3.2. Variables evaluadas en plantas de kenaf (<i>H. cannabinus</i>) inoculadas con los hongos del suelo: <i>M. phaseolina</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>R. solani</i> después de 30 días mantenidas en condiciones de invernadero durante el segundo experimento.....	27
Cuadro 3.3. Variables evaluadas en plantas de kenaf (<i>H. cannabinus</i>) inoculadas con los hongos del suelo: <i>M. phaseolina</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>R. solani</i> después de 30 días mantenidas en condiciones de invernadero durante el tercer experimento.....	28
Cuadro 4.1. Efecto de las interacciones entre: <i>Meloidogyne incognita</i> con los hongos <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Macrophomina phaseolina</i> en plantas de kenaf (<i>H. cannabinus</i>) 30 días después de la inoculación durante el primer experimento.....	31
Cuadro 4.2. Efecto de las interacciones entre: <i>Meloidogyne incognita</i> con los hongos <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Macrophomina phaseolina</i> en plantas de kenaf (<i>H. cannabinus</i>) 30 días después de la inoculación durante el segundo experiment.....	32

Cuadro 4.3. Efecto de las interacciones entre: *Meloidogyne incognita* con los hongos *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* en plantas de kenaf (*H. cannabinus*) 30 días después de la inoculación durante el tercer experimento.....33

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Patógenos del suelo al momento de la inoculación en plantas de kenaf (<i>H. cannabinus</i>).....	18
Figura 2. Cámaras húmedas de los hongos del suelo 21 días después de la inoculación: A) <i>Fusarium oxysporum</i> , B) <i>Rhizoctonia solani</i> y C) <i>Macrophomina phaseolina</i> en raíces de plantas de kenaf	21
Figura 3. Raíces de plantas de kenaf (<i>H. cannabinus</i>) 60 días después de la inoculación con el nemátodo <i>Meloidogyne incognita</i> a distintas densidades poblacionales estimadas.	24
Figura 4. Raíces de las plantas de kenaf con las interacciones entre el nemátodo nodulador y los hongos del suelo a los 30 días después de la inoculación.....	34

Introducción

Con la caída de la industria azucarera en Puerto Rico, el gobierno evalúa varias propuestas para promover el desarrollo económico en la isla. Una de las propuestas evaluadas enfocaba la implementación y desarrollo del sector laboral hacia el área noroeste de la Isla, utilizando como recurso la siembra del kenaf (*Hibiscus cannabinus*). Esta iniciativa fue apoyada en el año 2002 por el Departamento de Agricultura de Puerto Rico, debido a que se consideraba, en aquel momento, como un cultivo idóneo para sustituir la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) (Díaz Román, 2002a y b).

Entre los objetivos primordiales de crear una empresa dedicada a la producción de kenaf en Puerto Rico estaban la creación de empleos, la diversificación de la agricultura, la utilización de terrenos agrícolas antes dedicados al cultivo de caña de azúcar, y el establecimiento de una planta manufacturera para la industria de papel de periódico (Díaz Román, 2002a). Según información ofrecida por el Departamento de Agricultura Estatal, para implementar la siembra local, se proyectaba utilizar 35,000 cuerdas de terrenos ubicados en la zona oeste de la Isla, especialmente en los valles de Coloso en Aguada, Añasco, Eureka de Hormigueros y Lajas. La planta manufacturera se establecería en los predios de la antigua Central Cambalache, en el pueblo de Arecibo. A pesar de que la propuesta no fue avalada, el kenaf (*Hibiscus cannabinus*) es una planta que puede resultar susceptible a patógenos del suelo en la isla.

El propósito de esta investigación fue determinar la susceptibilidad y/o resistencia de esta planta ante la presencia del nemátodo nodulador (*Meloidogyne incognita*), hongos patógenos del suelo como lo son: *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* y la interacción de ambos en cada tratamiento utilizando suelo de la serie Coloso.

Revisión de Literatura

El kenaf, *Hibiscus cannabinus*, es una malvácea relacionada al algodón (*Gossypium hirsutum*) y al quimbombó (*Hibiscus esculentus*). Este cultivo puede ser utilizado en la producción de papel y alimento de ganado. El kenaf es originario de África y hay variedades adaptables al trópico. Es una planta anual de día corto, de crecimiento rápido, la cual puede alcanzar una altura de 4 ó 5 metros en aproximadamente 120 días (Dempsey, 1975).

De acuerdo a estudios publicados por la Estación Experimental de Mississippi en los Estados Unidos, la planta es susceptible a nemátodos fitoparasíticos y hongos habitantes del suelo durante su desarrollo (Batson *et al.*, 2000). En el estado de la Florida se reportaron nueve especies de nemátodos fitoparasíticos dañinos al kenaf. Las especies reportadas de mayor importancia son: *Meloidogyne javanica*, *M. arenaria* y *M. incognita* (Lawrence y McLean, 1992; Minton y Adamson, 1979; Tu y Cheng, 1971; Veech, 1989). Los síntomas asociados al nemátodo nodulador incluye una disminución en el crecimiento de la planta, hojas amarillentas, defoliación y eventualmente la muerte de la planta antes de la florecida y la producción de nódulos en las raíces. En Estados Unidos, la producción del kenaf se concentra en la región del Delta del Mississippi, donde este nemátodo se convirtió en un problema serio. Además del nemátodo nodulador, han reportado los nemátodos *Hoplolaimus magnistylus* y *Rotylenchulus reniformis* afectando a los cultivos de esta región (Lawrence, 1990). En pruebas realizadas en invernadero, se encontró que en un período de 60 días, la variedad 'Tainung1' mostró mayor susceptibilidad a la infección y reducción en el crecimiento de las raíces infectadas con

Rotylenchulus reniformis al compararse con *Hoplolaimus magnistylus* (Minton y Adamson, 1979).

Actualmente no hay cultivares en Estados Unidos que sean resistentes a los nemátodos fitoparasíticos, dejando como alternativas de control la rotación con plantas no hospederas y la utilización de nematicidas. Para el uso eficiente de nematicidas, es imperativo conocer las densidades poblacionales de los nemátodos fitoparasíticos que reducen significativamente la producción y que causan pérdidas económicas a la industria (Lawrence y McLean, 1992).

La patogenicidad de *M. incognita* hacia el kenaf fue descrita en Florida en 1944 y actualmente es hospedero de 4 razas del nemátodo (Veech, 1992). En 1953 el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos inició un programa de siembra, el cual incluía introducciones de plantas y cultivares de kenaf, que provenían de distintas regiones de África y de China, para identificar variedades con resistencia hacia *Meloidogyne* spp. La identificación de genes con resistencia a *Meloidogyne* spp. en estos cultivares impulsó el desarrollo y distribución de un nuevo germoplasma (Veech, 1992). En pruebas de invernadero, todas las líneas introducidas del cultivo PI- 468074, PI-468075, PI-468076, PI-468077 y la variedad ‘Everglades 71’ resultaron susceptibles a *M. incognita* raza 3. La variedad ‘Everglades 71’, resultó el cultivar más productivo de kenaf en los Estados Unidos, particularmente cuando éste se sembraba en predios libres del nemátodo nodulador de la raíz (Adamson *et al.*, 1974). En pruebas de invernadero el kenaf resultó susceptible a las especies de *M. incognita*, *M. arenaria* y *M. javanica* observándose diferentes niveles de susceptibilidad a *M. incognita*. Sin embargo, éstos cultivares no son lo suficientemente resistentes o tolerantes para permitir la producción comercial de kenaf

en suelos altamente infestados con *M. incognita*, por lo que se requiere un uso intensivo de nematicidas.

Ciclo de vida de *Meloidogyne incognita*:

La duración del ciclo de vida del nemátodo nodulador es altamente influenciada por la temperatura y otros factores edáficos (Taylor y Sasser, 1983). El ciclo de vida del nemátodo inicia con la formación de un huevo, seguido de cuatro (4) etapas juveniles (J2) y por último la etapa adulta. Las larvas del segundo estado (J2) o etapa infectiva generalmente penetran la raíz justamente en la punta o caliptra y se mueven entre las células no diferenciadas, alojándose cerca de los haces vasculares donde completan su ciclo. Con los estiletes perforan las paredes de las células alimentándose e inyectando secreciones a la planta (Taylor y Sasser, 1983).

Síntomas y Daños:

El síntoma más común producido por la hembra del nemátodo nodulador es la formación de engrosamientos radiculares conocidos como nódulos. Una raíz puede presentar nódulos pequeños causados por una sola hembra incrustada y/o nódulos grandes como resultado del ataque de varias hembras en su interior. Una vez infectadas las raíces, éstas se acortan y se deforman, se reduce el número de raíces laterales y el desarrollo de pelos radiculares, teniendo como consecuencia que se disminuya la absorción de agua y nutrientes del suelo (Taylor y Sasser, 1983). Además, se paraliza el crecimiento general del sistema radicular, y la planta se debilita.

Hongos de suelo asociados al kenaf:

Dempsey (1975) reportó que los hongos del suelo: *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp. y *Fusarium* spp. son los fitopatógenos de mayor importancia asociados al kenaf. Las enfermedades causadas por *Pythium* spp. (salcocho y pudrición de la raíz) se pueden convertir en un serio problema para la producción de kenaf y el daño puede intensificarse en un sistema de monocultivos o rotación con el algodón (White *et al*, 1970).

Se ha comprobado que estos hongos afectan el estado de plántula del kenaf, en especial, *Fusarium oxysporum*. *Fusarium* perteneciente a la clase Hyphomycetes, Orden: Moniliales, Familia: Moniliaceae; produce macroconidias, microconidias y clamidósporas. El criterio de clasificación taxonómico es la forma de la macroconidia. El teleomorfo o estado sexual de algunas especies de *Fusarium* ocurren dentro de los géneros *Gibberella* y *Nectria* (Gams y Nirenberg, 1989). El patógeno produce un micelio que primeramente es hialino, pero luego se torna color crema, amarillo pálido o rosa pálido. Los conidióforos son hialinos, simples, cortos, compactados en esporodoquios. Las conidias son hialinas, las clamidósporas son de color marrón, globoso, usualmente solitario. Los síntomas comunes que presentan las plantas afectadas por el hongo son el aclaramiento de las venas en hojas jóvenes y subsecuentemente epinastía en hojas senescentes con el decaimiento simultaneo de los pecíolos. Las plántulas mueren al surgir los primeros síntomas. En plantas senescentes se observa aclaramiento de las venas, amarillamiento en las hojas de la parte basal de la planta, formación ocasional de raíces adventicias, marchitez de hojas y brotes jóvenes, defoliación, necrosis marginal en hojas, y finalmente la muerte de la planta. (Agrios, 1997).

Etiología de la enfermedad:

Cuando las plantas crecen en suelos contaminados por *Fusarium* spp., el tubo germinativo de las esporas del micelio penetra la punta de la raíz directamente o entran por los puntos de formación de las raíces laterales. El micelio llega hasta los vasos del xilema y se moviliza a través de ellos hasta llegar a los brotes y la corona de la planta. En los vasos, el micelio produce microconidias que germinan y avanzan hasta el vaso del xilema adyacente y lo penetran. Esto hace que las hojas transpiren más agua, que la que es absorbida por las raíces. De esta manera la estomata se cierra seguida de la muerte de la planta. Luego el hongo invade el tejido de la planta extensivamente, llegando a la superficie de la planta y comienza a esporular. Las esporas se diseminan por el aire y el agua hacia otras plantas del área. Muchas veces, cuando la humedad del suelo es alta y la temperatura es fluctúa entre 25°C, plantas infectadas pueden producir buenos rendimientos (Agrios, 1997).

Hay que señalar, que las plantas de kenaf además de mostrar síntomas asociados y característicos de *Fusarium oxysporum*, estas plantas presentan otros síntomas relevantes a otros hongos de suelo. Estudios de Reynolds y Hanson (1957) notaron un aumento de salcocho (damping-off) en el algodón causado por *Rhizoctonia solani* (Kühn). Mientras que Dempsey (1975) lo reportó como uno de los patógenos que impiden el desarrollo de la planta de kenaf. El género *Rhizoctonia* perteneciente a la clase Deuteromycete, orden Agronomycetales, es causante de canchales, tizones, salcocho y pudrición de la raíz (Batten y Powell, 1971). Las hifas son de pigmentación marrón con paredes de un alto contenido de glucanos y quitina (Parmeter y Whitney, 1970).

Las condiciones óptimas para el desarrollo y crecimiento de este hongo es una temperatura aproximada de 32°C, pH 4.5-8.0 y humedad relativa de 70-100%. Este hongo, en su estado imperfecto, causa pudriciones radicales a nivel de plántulas, mientras que el estado perfecto, *Thanatephorus cucumeris*, (Frank) Donk, ataca el follaje, vainas y tallos causando la mustia hilachosa. El signo del patógeno es usualmente el micelio y muchas veces se observan pequeños esclerocios que se muestran en tejido interno no diferenciado. El micelio es incoloro cuando es joven pero se torna amarillento o color castaño a medida que envejece.

Durante los estados iniciales de infección del hipocotilo y de las raíces, el hongo produce canchales circulares u oblongos con márgenes de color café. Cuando la infección ocurre en plantas adultas puede afectar a las hojas causando manchas pequeñas, que luego se tornan marrón. Además el hongo *Macrophomina phaseolina*, causa enfermedades como tallo marrón y podredumbre del tallo en una gran variedad de plantas. Dhingra y Sinclair (1978) señalaron que el hongo presenta dos fases: una picnidial identificada como *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich, sinónimo *M. phaseola* (Maub) Ashy, y la fase esclerocial que se conoce como *Rhizoctonia bataticola* (Tabú). Este hongo está diseminado por todo el mundo en especial en países tropicales con un amplio rango de hospederos. Éste ataca gran variedad de cultivos herbáceos y leñosos en regiones templadas e infecta a diversas legumbres (Siddiqui y Mahmood, 1992). Los síntomas de este hongo son; podredumbre en la raíz y en la parte baja del tallo, caída de los almácigos de las plántulas (damping-off) y muerte prematura de las plantas maduras.

La enfermedad se conoce como podredumbre carbonosa, debido a que los tallos y raíces infectados adquieren color gris negruzco o negro que está asociado con la acumulación de

pequeñísimos esclerocios negros en forma de costra. Los síntomas incluyen amarillamiento y caída prematura de las hojas (Siddiqui y Mahmood, 1992). Este hongo presenta microesclerocios negros, esféricos a oblongo, y de forma irregular. La producción de picnidios es óptima cuando el hongo crece en tejido de planta fresco en un régimen de luz y oscuridad alternado de 12 horas (Singleton *et al*, 1992). Los picnidios son ostiolados y de color marrón oscuro y se forman a menudo en el tejido del huésped (Smits y Noguera, 1988). Estos varían de tamaño de acuerdo al huésped. Las conidias son elípticas de paredes finas, unicelulares, hialinas y son viables durante varios meses (Dhingra y Sinclair, 1978).

Los propágulos de la podredumbre carbonosa son variables, el hongo produce esclerocios y conidias dentro de los picnidios. Los esclerocios son la fuente principal de inóculo de la pudrición carbonosa. El micelio actúa como fuente de inóculo secundario y puede ser importante en la infección. La penetración ocurre a través de células epidermales o por las aperturas naturales en el tejido de la raíz. Las hifas crecen en los espacios intercelulares y más tarde llegan a invadir el xilema, ocasionando una separación en la estructura de la pared celular. Esta desorganización afecta la función de la membrana celular lo que encadena la producción de enzimas pectolíticas (Short y Wyllie, 1978). Además, la patogénesis incluye la producción de toxinas lo que ocasiona la obstrucción del xilema, a consecuencia de la formación de los esclerocios (Dhingra y Sinclair, 1978).

El hongo es un parásito facultativo diseminado por las semillas y por el suelo (Abawi y Corrales, 1980). Las temperaturas que sobrepasan los 55°C son letales para el micelio, pero no para los esclerocios. El hongo invade inter- o intra-celularmente el tejido del huésped en

cualquier etapa de desarrollo. Las plantas bajo condiciones de sequía son más susceptibles. El desarrollo de los picnidios está influenciado por temperatura, luz y la habilidad de los aislamientos para producirlos (Abawi y Corrales, 1980).

Interacciones entre el nemátodo nodulador y los hongos del suelo a ser estudiados:

La liberación de materiales en las raíces tales como compuestos aromáticos y químicos producidos por la acción de los nemátodos estimula la penetración de las hifas de los hongos (Faulkner y Skotland, 1965). Algunos hongos como *Verticillium albo-atrum* entre otros, producen ácido 3-indole acético (AIA) que estimulan la formación y crecimiento de raíces. La invasión por la larva juvenil del segundo estado del nemátodo nodulador de la raíz induce la sobreproducción de AIA en la planta (Christie, 1936). Basado en estos hallazgos, se presume que una pequeña cantidad de AIA producida por *M. phaseolina* estimula el crecimiento de las raíces durante la etapa temprana de infección, facilitando la penetración del nemátodo nodulador a las raíces. Los complejos en las raíces son muy frecuentes, pero no siempre ocurre sinergismo con respecto a la cantidad de daño causado a la planta o un efecto antagonista con respecto a la producción de uno o más agentes biológicos (Maloy y Murray, 2001).

La asociación del nemátodo nodulador, *M. javanica*, y el hongo *Macrophomina* spp. causa podredumbre de la raíz y tallo en plantas de kenaf. Las plantas infectadas con *M. phaseolina* favorecen la reproducción e infección de *M. javanica* en raíces de kenaf. Las temperaturas entre 25-35° C favorecen que *M. javanica* complete su primera generación en 20 días y las J2 de la segunda generación aparecen en las raíces, 22 días después de la inoculación. El nemátodo se desarrolla más rápidamente en raíces infectadas con *M. phaseolina*, siendo esto

una de las consecuencias del sinergismo (Tu y Cheng, 1971). La interacción entre el nemátodo y el hongo afecta la germinación de las semillas y disminuye el crecimiento de las raíces.

En el área oeste de Puerto Rico se han realizado siembras experimentales de kenaf atacado por *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, causando pudrición de la corona y añublo lanoso. Estas condiciones están correlacionadas con el incremento de poblaciones del nemátodo nodulador (Alconero y Stone, 1969). En soya, se reporta una asociación tanto de *Meloidogyne javanica*, *M. hapla* y *R. solani* reduciendo la emergencia de la soya (Taylor y Wyllie, 1959). En algodón, se ha observado susceptibilidad de las plántulas eran susceptibles a infecciones con *R. reniformis*, *M. arenaria*, *M. hapla* o *M. incognita* (Brodie y Cooper, 1964). En plantas de tabaco, hay mayor infección del complejo *Rhizoctonia solani*/*Meloidogyne incognita*, cuando la infección de *M. incognita* precede al hongo, al menos de 10 – 21 días (Batten y Powell, 1971). En este caso, la pudrición de raíz es más extensa que cuando el nemátodo y el hongo se añaden de manera simultánea o por separado.

Materiales y Métodos

Las semillas de kenaf, variedad 'Everglades 41' (variedad resistente a la antracnosis), se obtuvieron de la compañía Banana Tree, compañía suplidora de semillas ubicada en el estado de Pennsylvania, Estados Unidos. Los ensayos se realizaron en condiciones de invernadero utilizando suelo proveniente del Valle de Coloso, ubicado en el municipio de Aguada al oeste de Puerto Rico. El suelo colectado pertenece a la serie Coloso (Vertic Endoaquepts). Las muestras fueron secadas al aire y se pasaron por un cedazo de 2 mm. Una vez cernido el suelo, éste se mezcló con arena a razón de 1:1.

Primero se realizó un ensayo de determinación de patrón de crecimiento del kenaf por un periodo de 30 días. Posteriormente, realizamos pruebas de patogenicidad, en donde inoculamos nueve plántulas de kenaf con los hongos del suelo a ser estudiados. Se utilizaron tres plantas para cada hongo y se dejaron tres plantas sin inocular como controles. Una vez realizadas las pruebas de patogenicidad, se procedió con el experimento. Los tratamientos fueron arreglados en un diseño de bloque completamente al azar con 5 repeticiones para los experimentos de las densidades poblacionales del nemátodo nodulador y de las interacciones y 3 repeticiones para los experimentos de los hongos del suelo. Estos fueron distribuidos de la siguiente manera: control absoluto (T1), plantas inoculadas con *M. incognita* (T2), plantas inoculadas con *F. oxysporum* (T3), plantas inoculadas con *R. solani* (T4), plantas inoculadas con *M. phaseolina* (T5). Para el experimento de interacciones; se distribuyó de la siguiente manera: inoculación con *M. incognita/F. oxysporum* (T6), inoculación con *M. incognita/R. solani* (T7) e inoculación con *M. incognita/M. phaseolina* (T8). Los parámetros de evaluación fueron: altura de la planta, número

de hojas, peso de la raíz (fresco), peso de la planta (fresco), y el área foliar. Esta se determinó tomando la hoja del centro de la planta de kenaf, y se midió el largo (cm) * el ancho (cm). Además, se determinó el índice de nodulación para los experimentos de densidades poblacionales de *Meloidogyne incognita*.

Pruebas de Patogenicidad

Los hongos patógenos utilizados en este estudio fueron *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium oxysporum*. Estos hongos provinieron de cultivos purificados de una colección del laboratorio de microbiología de suelo ubicado en la finca laboratorio de la Facultad de Ciencias Agrícolas del RUM. Los hongos fueron transferidos en placas de agar de papa y dextrosa (PDA), para su crecimiento y desarrollo. Una vez transferidos a placas con PDA estos se pusieron en una incubadora (Imperial 111, modelo 310) a una temperatura de $29.3 \pm 2^{\circ}\text{C}$ para garantizar su crecimiento.

Se inocularon 12 plantas jóvenes y sanas de 7 días de edad, previamente sembradas en tiestos de 20 cm de diámetro y 14.5 cm de profundidad con 1,000 gr de suelo en cada tiesto. Estas se dividieron de la siguiente manera: 3 para control absoluto (agua destilada estéril), 3 con *Fusarium oxysporum*, 3 con *Rhizoctonia solani* y 3 con *Macrophomina phaseolina*. Para la realización de las suspensiones de cada hongo, se modificó el procedimiento descrito por Khan y Hossein-Nejad (1991), utilizamos una placa Petri de cada hongo, el cual fue macerado en una licuadora con agua destilada estéril (15 ml de macerado). De este macerado, se obtuvieron 10 g. el cual se añadieron 100 ml de agua destilada estéril y se mezcló en una licuadora por 30 segundos. Una vez, obtenida la suspensión, aplicamos 30 ml de la suspensión homogénea en cada tiesto, con la ayuda de una pipeta, removiendo el suelo del área de la raíz de las plántulas (Tu y Cheng, 1971).

Luego de aplicar la suspensión, cada tiesto recibió suficiente agua para distribuir el inóculo. Estas plantas se cubrieron con una bolsa plástica para mantener la humedad. Al cabo de 21 días, se procedió a realizar cámaras húmedas y se esperó hasta observar estructuras de reproducción.

Densidades Poblacionales de *Meloidogyne incognita*

Para determinar la susceptibilidad del kenaf (*Hibiscus cannabinus*) al nemátodo nodulador, *Meloidogyne incognita*, se realizó un experimento para determinar la densidad poblacional que resultaría ser perjudicial para las plántulas de kenaf.

Inóculo del nemátodo:

El inóculo inicial del nemátodo nodulador se obtuvo de plantas de tomates, que fueron mantenidas en un invernadero de la Facultad de Ciencias Agrícolas, Recinto Universitario de Mayagüez (RUM) e inoculadas con *Meloidogyne incognita* durante 60 días. El inóculo se aumentó en el invernadero utilizando plantas de tomate variedad 'Rutger'. Las extracciones de nemátodos se realizaron, siguiendo el método de hipoclorito de sodio (NaOCl) según Barker (1985). Estas plantas de tomate infectadas sirvieron como inóculo para los experimentos con las plantas de kenaf.

Densidades poblaciones iniciales (huevos/ J2):

Se determinó el efecto de las diferentes densidades poblacionales de *Meloidogyne incognita* en las plantas de kenaf. Una vez obtenidas las extracciones de las plantas de tomate, se preparó una alícuota para estandarizar y estimar el número de huevos y larvas (J2) por volumen. Los tratamientos evaluados fueron las densidades poblacionales de *Meloidogyne incognita*, a los cuales se le suministró 5 ml de suspensión a cada tratamiento de acuerdo a la densidad poblacional estimada (12,000 huevos/ J2; 6,000 huevos/ J2; 3,000 huevos/ J2; 1,500 huevos/ J2). Se inocularon plantas sanas de 7 días de edad. Con la ayuda de un estereoscopio y un syracuse

(placa de cristal calibrada) se contabilizó los nematodos y se estimaron las poblaciones en las muestras. En el syracus, se colocó 1ml de la muestra obtenida de las raíces y se cubrió con agua destilada estéril. La densidad poblacional de nemátodos se estimó contando el número de huevos y larvas (J2) encontrados en la placa.

Para el tratamiento de 1,500 huevos/ J2, se añadió 1ml de la muestra obtenida más 4 ml de agua destilada. Para el tratamiento de 3,000 huevos/ J2; se duplicó la cantidad de muestra más 3 ml de agua destilada estéril, y así sucesivamente hasta la densidad poblacional estimada de 12,000 huevos/J2. Se mantuvieron cinco tiestos libres del nemátodo suministrándole sólo agua destilada estéril como control, procedimiento modificada al descrito por Barillas *et al* (1993). Las plantas se sembraron en 25 tiestos de 20 cm de diámetro y 14.5 cm de profundidad siguiendo un diseño de bloques completamente aleatorizados (DBCA) de cinco réplicas. Las extracciones de huevos se realizaron a los 60 días donde se tomaron los datos de altura de la planta, peso seco del follaje y de las raíces.

Para estimar el daño causado por el nemátodo se utilizó una escala de nodulación de 0-5, donde 0 = ausencia de agallas, 1= 1-2 agallas, 2= 3-10 agallas, 3= 11-30 agallas, 4= 31-100 agallas y 5= más de 100 agallas por sistema radicular (Taylor y Sasser, 1983). Los tratamientos fueron evaluados para poder determinar a que densidad poblacional afectó el rendimiento de las plantas. La población estimada de 12,000 huevos y larvas (J2), fue utilizada además para los experimentos de interacciones.

Presencia de Hongos Patógenos del Suelo

Ensayo con hongos del suelo:

Se inocularon los hongos patógenos del suelo, *Fusarium oxysporum* (T3), *Rhizoctonia solani* (T4) y *Macrophomina phaseolina* (T5), a plantas de kenaf de 5 días de sembradas. Cada tratamiento constó de cinco plantas. En adición se mantuvieron otras cinco plantas sin inocular como control. Los hongos fueron crecidos en medio de PDA por cinco días (Figura 1).

Para preparar las suspensiones de cada hongo utilizamos el mismo método que describimos anteriormente para las pruebas de patogenicidad. Al cabo de 30 días, se procedió a realizar cámaras húmedas y se esperó hasta observar estructuras de reproducción.

Se realizaron cámaras húmedas para determinar los signos en las raíces, luego de observar lesiones. Se procedió a desinfectar de manera superficial las raíces de la plantas de kenaf, dejándolas 1 minuto en alcohol al 70%, 1 minuto en clorox[®] al 10% y 1 minuto en agua destilada estéril. Luego de la desinfección, se procedió a sembrar las raíces en placas de PDA. Estas placas fueron incubadas a una temperatura de $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y luego de 3 días se observaron para detección de estructuras de reproducción o signos del patógeno.

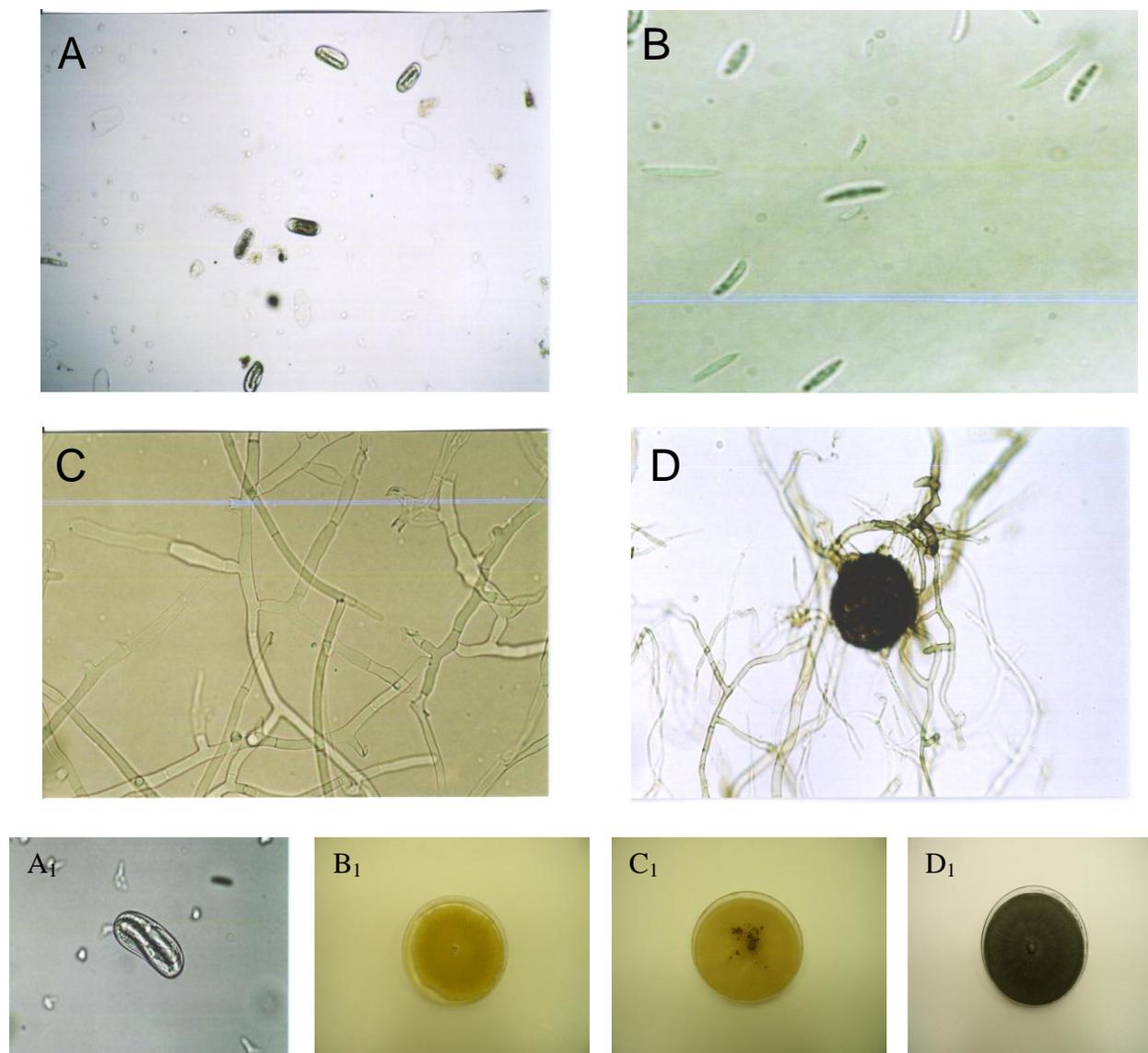


Figura 1. Patógenos del suelo al momento de la inoculación en plantas de kenaf (*H. cannabinus*).
 A) Huevos del nemátodo nodulador *Meloidogyne incognita* y A₁) Huevo del nematodo nodulador detalladamente, B) Macroconidia de *Fusarium oxysporum* y B₁) Cultivo puro del hongo, C) Micelio de *Rhizoctonia solani* y C₁) Cultivo puro del hongo, D) Picnidio de *Macrophomina phaseolina* y D₁) Cultivo puro del hongo.

Interacciones entre Hongos del Suelo y *Meloidogyne incognita*

Se inocularon 20 plantas de kenaf con la densidad poblacional de nemátodos en la cual se optimizó la presencia de nódulos en el sistema radicular, se designaron cinco plantas como el control, al cual se le suministró agua destilada estéril. Cada planta fue inoculada a los cinco días de sembrada con 5 ml de agua destilada con la densidad poblacional estimada de 12,000 huevos y J2 de *Meloidogyne incognita*.

Al cabo de 20 días, cinco plantas inoculadas previamente con nemátodos fueron inoculadas con 5 ml de suspensión de cada hongo: *Macrophomina phaseolina* (T6), *Fusarium oxysporum* (T7) y *Rhizoctonia solani* (T8). Las plantas fueron inoculadas con 5 ml de suspensión de cada hongo asignado. A los 60 días se removieron las plantas y se observaron los síntomas en las raíces de éstas. Se tomó el peso radicular, peso seco foliar y diámetro de la plantas. Luego se procedió a la identificación del hongo y determinar la interacción.

Análisis Estadístico: Los datos fueron analizados utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de la versión estudiantil del estadístico InfoStat, 1998. La media será comparada con el LSD de Fisher cuando los valores de F son significativos a $P > 0.5$.

Resultados y Discusión

Pruebas de patogenicidad:

Al evaluar las pruebas de patogenicidad realizadas a los hongos, se encontró que *Fusarium oxysporum*, es patógeno del kenaf y que su presencia en el suelo reduce la altura (6.72 cm) de la planta y el número de hojas, en comparación con los otros tratamientos (Cuadro 1). A pesar de que para los otros parámetros de estudio no existe un efecto significativo, al compararse con los demás hongos y el control, los valores obtenidos mostraron ser menores. Todas las plantas que fueron tratadas con este hongo presentaron síntomas característicos en la raíz (manchas necróticas). En las hojas se evidenciaba la clorosis y la reducción de las mismas. Esto se corroboró en la realización de las cámaras húmedas cuando se observó micelio blanco, observándose en el microscopio las estructuras de reproducción (Figura 2).

Cuadro 1. Variables evaluadas durante las pruebas de patogenicidad realizadas con los hongos del suelo *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* y plantas control, 21 días después de la inoculación.

Inóculo del hongo	Variables evaluadas en plantas de kenaf ¹				
	Altura (cm)	Núm. Hojas	Peso Raíz Fresco (gr)	Peso Follaje Fresco (gr)	Área Foliar (cm ²)
Control	18.00 B	5.55 B	0.55 A	0.88 A	10.78A
<i>F. oxysporum</i> ²	6.72 A	2.55 A	0.06 A	0.37 A	5.08 A
<i>R. solani</i> ³	17.66 B	5.33 B	0.13 A	0.85 A	11.42 A
<i>M. phaseolina</i> ⁴	14.00 AB	4.78 B	0.09 A	0.65 A	9.14 A
D.M.S.	9.78188	2.17541	0.77639	0.55138	7.56583

¹ Valores con letras iguales no varían, de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA).

² *F. oxysporum*= *Fusarium oxysporum*

³ *R. solani*= *Rhizoctonia solani*

⁴ *M. phaseolina*= *Macrophomina phaseolina*

Rhizoctonia solani resultó no patogénico al kenaf, ya que no hay diferencias significativas al compararse con el control (Cuadro 1). Contrario a lo reportado en Mississippi donde los estudios demostraron que este hongo, junto a *Pythium* spp. y *Fusarium* spp, son los agentes causales primarios de enfermedades en plántulas de kenaf (Batson et al, 2000). *Macrophomina phaseolina* presentó síntomas de manchas necróticas en las raíces (Figura 2) que iban de color gris a negro, hubo reducción de los pelos radicales y se observó moteado y amarillamiento en las hojas.



Figura 2. Cámaras húmedas de los hongos del suelo a los 21 días de inoculación:
A) *Fusarium oxysporum*, B) *Rhizoctonia solani* y C) *Macrophomina solani*
en raíces de plantas de kenaf.

Densidades poblacionales de *Meloidogyne incognita*:

Observamos que para el experimento 1 (Cuadro 2.1) las plantas de kenaf expuestas a una población de *M. incognita*, menor de 12,000 huevos/J2 no presentaron reducción significativa en el crecimiento y desarrollo. Sin embargo para los experimentos 2 y 3 (Cuadro 2.2 y Cuadro 2.3), la inoculación de sobre 12,000 huevos/J2 de *Meloidogyne incognita* causó la muerte de la plantas de kenaf Las plantas enfermas presentaron síntomas típicos tales como: cese del crecimiento de la planta, proliferación del desarrollo de nódulos en raíces, amarillamiento en las hojas, defoliación, culminando con la muerte en plantas de kenaf.

Cuadro 2.1 Variables evaluadas en plantas de kenaf (*H. cannabinus*) inoculadas con huevos y/o J2 del nemátodo nodulador *M. incognita* después de 60 días mantenidas en condiciones de invernadero durante el primer experimento.

Nivel Poblacional de <i>M. incognita</i> (huevos/J2)	Variables evaluadas en plantas de kenaf ¹				
	Altura (cm)	Núm. Hojas	Peso Raíz Fresco (gr)	Peso Follaje Fresco (gr)	Área Foliar (cm ²)
A ²	32.59 A	7.20 A	0.26 A	2.12 A	7.20 A
B ³	30.32 A	6.80 A	0.26 A	2.64 A	6.80 A
C ⁴	35.97 A	7.00 A	0.25 A	2.67 A	6.94 A
D ⁵	31.66 A	7.60 A	0.22 A	2.79 A	7.50 A
E ⁶	34.20 A	9.60 B	0.31 A	3.22 A	11.40 B
D.M.S.	10.24431	1.81868	0.12331	1.35547	2.12598

¹ Valores con letras iguales no varían, de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA).

² 12,000 huevos y larvas (J2) por tiesto.

³ 6,000 huevos y larvas (J2) por tiesto.

⁴ 3,000 huevos y larvas (J2) por tiesto.

⁵ 1,500 huevos y larvas (J2) por tiesto.

⁶ Plantas sin inocular

Para el experimento 2 (Cuadro 2.2) encontramos que poblaciones de nemátodos mayores de 6, 000 huevos/ J2 redujeron significativamente el peso fresco del follaje y el área foliar en comparación a plantas no infectadas. Las concentraciones aproximadas 1,500 huevos/J2 no redujeron el crecimiento de las plantas, al igual que el peso fresco del follaje y el peso fresco de la raíz de las mismas. Este criterio permite especular que exista cierta tolerancia de la planta a bajas poblaciones del nemátodo en el suelo. Sin embargo, resulta meritorio señalar que plantas de kenaf inoculadas con el nemátodo presentaron clorosis en sus hojas, contrario a plantas libres del nemátodo.

Cuadro 2.2 Variables evaluadas en plantas de kenaf (*H. cannabinus*) inoculadas con huevos y/o J2 del nemátodo nodulador *M. incognita* después de 60 días mantenidas en condiciones de invernadero durante el segundo experimento.

Nivel Poblacional de <i>M. incognita</i> (huevos/J2)	Variables evaluadas en plantas de kenaf ¹				
	Altura (cm)	Núm. Hojas	Peso Raíz Fresco (gr)	Peso Follaje Fresco (gr)	Área Foliar (cm ²)
A ²	24.59 A	0 A	0 A	0 A	0 A
B ³	27.75 A	4.00 B	0.92 AB	1.95 AB	0.81 AB
C ⁴	35.97 A	7.80 C	0.28 A	2.73 ABC	1.16 B
D ⁵	45.53 A	5.00 B	2.05 C	4.10 BC	1.66 B
E ⁶	39.97 A	8.80 C	1.31 B	4.96 C	1.65 B
D.M.S.	23.63438	2.65115	1.03349	2.88563	4.02273

¹ Valores con letras iguales no varían, de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA).

² 12,000 huevos y larvas (J2) por tiesto.

³ 6,000 huevos y larvas (J2) por tiesto.

⁴ 3,000 huevos y larvas (J2) por tiesto.

⁵ 1,500 huevos y larvas (J2) por tiesto.

⁶ Plantas sin inocular

Se pudo observar que en el tercer experimento (Cuadro 2.3), plantas inoculadas con niveles de aproximadamente 6,000 huevos/J2 a 1,200 huevos/J2 no tuvieron diferencias significativas, al compararse con el control, en los parámetros de peso de la raíz y peso del follaje. Resultados similares fueron reportados por Lawrence y sus colegas (1990), en donde al comparar 4 introducciones de kenaf y la variedad ‘Everglade 71’ a distintas inoculaciones de este nemátodo (6,000 huevos/J2 a 500 huevos/J2), no encontraron diferencias significativas en los mismos parámetros estudiados. Hay que señalar que a pesar de no detectarse diferencias significativas para los experimentos 2 y 3; plantas con inoculaciones de 1,500 huevos/J2 obtuvieron un índice de nodulación de 3 mientras que en poblaciones de; 3,000 y 6,000 huevos/J2 el índice de nodulación fue de 4 (data no mostrada). Estos nódulos en su mayoría eran pequeños y se distribuían por el sistema radicular (Figura 3).

Cuadro 2.3 Variables evaluadas en plantas de kenaf (*H. cannabinus*) inoculadas con huevos y/o J2 del nemátodo nodulador *M. incognita* después de 60 días mantenidas en condiciones de invernadero durante el tercer experimento.

Nivel Poblacional de <i>M. incognita</i> (huevos/J2)	Variables evaluadas en plantas de kenaf ¹				
	Altura (cm)	Núm. Hojas	Peso Raíz Fresco (gr)	Peso Follaje Fresco (gr)	Área Foliar (cm ²)
A ²	27.00 AB	0 A	0 A	0 A	0 A
B ³	19.66 A	4.60 B	0.40 AB	0.81 AB	5.20 B
C ⁴	38.06 B	6.80 C	0.61 B	1.16 B	6.70 BC
D ⁵	32.66 AB	7.27 C	1.20 C	1.66 B	7.85 C
E ⁶	23.70 AB	10.00 D	0.27 AB	1.65 B	12.00 D
D.M.S.	14.62397	2.17062	0.55842	1.01741	1.58107

¹ Valores con letras iguales no varían, de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA).

² 12,000 huevos y larvas (J2) por tiesto.

³ 6,000 huevos y larvas (J2) por tiesto.

⁴ 3,000 huevos y larvas (J2) por tiesto.

⁵ 1,500 huevos y larvas (J2) por tiesto.

⁶ Plantas sin inocular

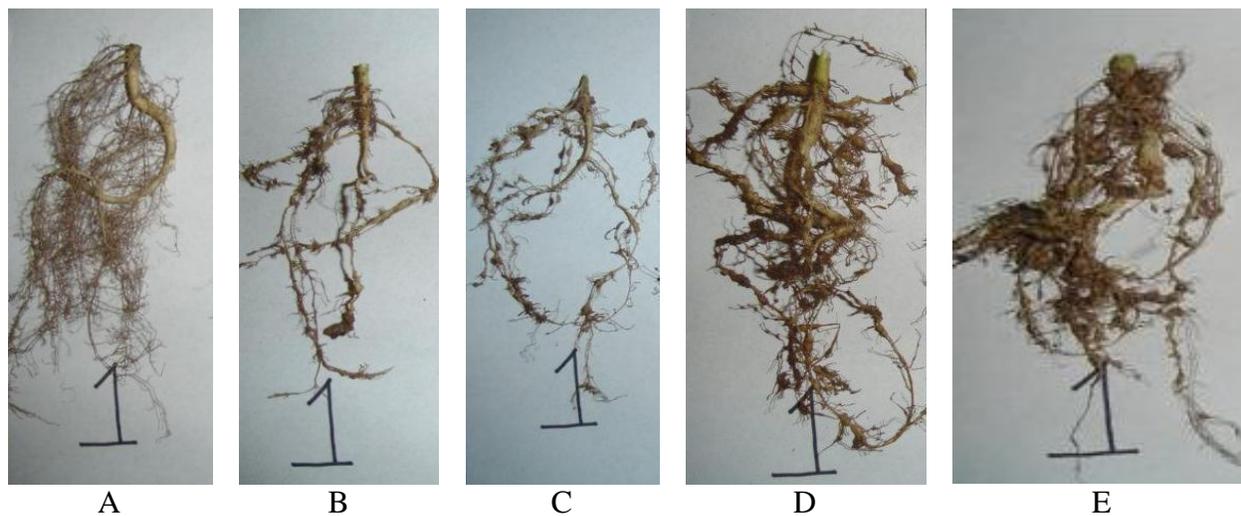


Figura 3. Raíces de plantas de kenaf (*H. cannabinus*) 60 días después de la inoculación con el nemátodo *Meloidogyne incognita* a distintas densidades poblacionales estimadas. A) Planta sin inocular, B) 1,500 huevos/J2, C) 3,000 huevos/ J2, D) 6,000 huevos/ J2 y E) 12,000 huevos/J2.

Presencia de hongos patógenos del suelo:

En este estudio, se pudo observar que en las plantas inoculadas con *Fusarium oxysporum* redujeron la altura de las plantas en comparación con *R. solani* y *M. phaseolina*. Las plantas inoculadas con *F. oxysporum* presentaron menor altura (Cuadro 3.1), sin embargo para los experimentos 2 y 3 (Cuadros 3.2 y Cuadro 3.3) no se encontró diferencias significativas en este parámetro. Las hojas más viejas mostraron puntos necróticos en los bordes, mientras que las hojas más jóvenes mostraban indicios de amarillamiento en las venas. Hay que señalar que los hongos no mostraron diferencias significativas en la mayoría de los parámetros evaluados, exceptuando a *Macrophomina phaseolina* en el experimento 2, que tuvo una diferencia significativa en el peso de la raíz (Cuadro 3.2).

Sin embargo, se observaron lesiones y manchas necróticas en las raíces, característicos de este hongo. Se debe destacar que *Macrophomina phaseolina* causa mayor daño en condiciones de sequía (Pineda y Ávila, 1993), condiciones que no ocurrieron durante la investigación. Otros reportes establecen que *Rhizoctonia solani*, no es patógeno de esta planta al excluir esta especie de un catastro en el cual se reportan hongos, bacterias y nemátodos, causantes de daños al kenaf. En este catastro se mencionan las siguientes especies de *Fusarium*: *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. moniliforme*, *F. roseum*, *F. semitectum* y *F. vasinfectum*; exceptuando a la especie *oxysporum*; al hongo *Macrophomina phaseolina* y las cuatro (4) especies de *Meloidogyne* (*incognita*, *arenaria*, *javanica* y *hapla*); (Reed, 1976).

Está documentado que *Rhizoctonia solani*, causa enfermedades difíciles de controlar a alrededor de 500 géneros de plantas. Esto se debe a que el patógeno posee un gran número de

hospederos y gran capacidad de supervivencia al formar esclerocios (Papavizas *et al.*, 1975). Hay gran variedad de aislamientos patogénicos de *Rhizoctonia solani* que son específicos para determinados cultivos de importancia económica, mientras que otros atacan a una gran variedad de hospederos (Papavizas *et al.*, 1975). Esto indica que probablemente el grado de virulencia de *Rhizoctonia solani* es expresado por genes dominantes y que la variabilidad del patógeno depende del grupo de anastomosis (capacidad de fusionarse 2 hifas en el hongo, de esta manera el hongo pierde virulencia) a que pertenece el aislamiento (Parmeter y Whitney, 1970).

Cuadro 3.1. Variables evaluadas en plantas de kenaf (*H. cannabinus*) inoculadas con los hongos del suelo: *M. phaseolina*, *F. oxysporum* y *R. solani* después de 30 días mantenidas en condiciones de invernadero durante el primer experimento.

Inóculo del hongo	Variables evaluadas en plantas de kenaf ¹				
	Altura (cm)	Núm. Hojas	Peso Raíz Fresco (gr)	Peso Follaje Fresco (gr)	Área Foliar (cm ²)
Control	41.00 C	10.00 A	0.62 A	4.41 A	12.17 C
<i>F. oxysporum</i> ²	25.31 A	7.00 A	0.40 A	2.19 A	5.83 A
<i>R. solani</i> ³	31.09 B	8.67 A	0.32 A	2.24 A	6.83 A
<i>M. phaseolina</i> ⁴	31.00 AB	8.67 A	1.98 A	2.36 A	8.33 B
D.M.S.	5.69361	3.32982	1.90030	1.94930	1.38298

¹ Valores con letras iguales no varían, de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA).

² *F. oxysporum*= *Fusarium oxysporum*

³ *R. solani*= *Rhizoctonia solani*

⁴ *M. phaseolina*= *Macrophomina phaseolina*

Cuadro 3.2. Variables evaluadas en plantas de kenaf (*H. cannabinus*) inoculadas con los hongos del suelo: *M. phaseolina*, *F. oxysporum* y *R. solani* después de 30 días mantenidas en condiciones de invernadero durante el segundo experimento.

Inóculo del hongo	Variables evaluadas en plantas de kenaf ¹				
	Altura (cm)	Núm. Hojas	Peso Raíz Fresco (gr)	Peso Follaje Fresco (gr)	Área Foliar (cm ²)
Control	40.67 B	10.00 B	0.88 A	4.47 B	6.33 A
<i>F. oxysporum</i> ²	30.07 A	7.00 A	0.40 A	1.63 A	5.83 A
<i>R. solani</i> ³	24.58 A	7.33 A	0.34 A	2.30 A	7.00 A
<i>M. phaseolina</i> ⁴	30.10 A	8.33 AB	2.61 B	2.44 A	6.50 A
D.M.S.	5.55814	2.18351	1.27901	1.37016	2.66386

¹ Valores con letras iguales no varían, de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA).

² *F. oxysporum*= *Fusarium oxysporum*

³ *R. solani*= *Rhizoctonia solani*

⁴ *M. phaseolina*= *Macrophomina phaseolina*

Cuadro 3.3. Variables evaluadas en plantas de kenaf (*H. cannabinus*) inoculadas con los hongos del suelo: *M. phaseolina*, *F. oxysporum* y *R. solani* después de 30 días mantenidas en condiciones de invernadero durante el tercer experimento.

Inóculo del hongo	Variables evaluadas en plantas de kenaf ¹				
	Altura (cm)	Núm. Hojas	Peso Raíz Fresco (gr)	Peso Follaje Fresco (gr)	Área Foliar (cm ²)
Control	37.55 A	11.00 B	0.62 A	4.39 A	11.67 B
<i>F. oxysporum</i> ²	31.72 A	7.00 A	0.52 A	2.67 A	6.33 A
<i>R. solani</i> ³	32.53 A	8.33 A	0.34 A	2.33 A	8.17 A
<i>M. phaseolina</i> ⁴	30.22 A	8.67 A	0.56 A	2.08 A	8.00 A
D.M.S.	12.37462	2.20876	0.42337	2.32021	2.33682

¹ Valores con letras iguales no varían, de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA).

² *F. oxysporum*= *Fusarium oxysporum*

³ *R. solani*= *Rhizoctonia solani*

⁴ *M. phaseolina*= *Macrophomina phaseolina*

Interacciones entre hongos del suelo y *Meloidogyne incognita*:

Para el caso de las interacciones, se pudo observar que *Meloidogyne incognita* tuvo un rol importante en la expresión de la patogénesis. En el caso de la interacción de *Meloidogyne incognita*/*Fusarium oxysporum* el peso de la raíz y el área foliar se vieron afectados de manera significativa al compararse con el control (Cuadros 4.1, 4.2 y 4.3). Al ocurrir pobre desarrollo del sistema radicular la planta mostró pobre desarrollo de de sus partes aéreas (Figura 4). Resultados similares fueron reportados por Yang *et al.* (1976), en donde la interacción de *Meloidogyne incognita*/*Fusarium oxysporum* en algodón, promovieron la marchitez en las hojas, ocasionando que las plantas sean más susceptibles a *Fusarium*.

La interacción *Meloidogyne incognita*/*Rhizoctonia solani*, mostraron lesiones y nódulos en las raíces, síntomas característicos del nemátodo. A pesar de presentar estos síntomas, las plantas no se vieron afectadas significativamente en su desarrollo.

Al evaluar la interacción entre *Meloidogyne incognita*/*Macrophomina phaseolina*, la acción de estos patógenos juntos causaron un mayor número de manchas en las raíces que cuando se comparó la acción del hongo solo. El crecimiento de las plántulas se retardó en presencia de ambos agentes parasíticos encontrando que la interacción del nemátodo con *M. phaseolina* reduce la altura y el peso de la planta, de manera significativa. Resultados similares fueron observados por Tu y Cheng (1971) utilizando *Meloidogyne javanica* con *Macrophomina phaseolina*. En donde ambos organismos afectaron el desarrollo de las raíces, reduciendo la altura y el peso de las plantas de kenaf. La formación de nódulos y la incidencia de manchas necróticas, impide la absorción de agua y nutrientes del suelo. Al obstruirse los tejidos vasculares

en la planta se interrumpe el flujo normal (Taylor y Sasser, 1983). Esto nos permite explicar la reducción en altura y peso de la planta.

Los efectos de la interacción *M. incognita*/*M. phaseolina* en plántulas de kenaf se manifestaron de manera sinérgica en este experimento. Estudios previos revelan que este hongo, actúa de manera sinérgica con *Meloidogyne incognita*, causando síntomas y daños significativos a las plántulas de kenaf. Faulkner y Scotland (1965), sugirieron una liberación de posibles sustancias de la raíz, tales como el ácido índole acético (AIA), provocada por los nemátodos, lo que causa un estímulo en la penetración de las hifas. Esto se pudo observar en el experimento, ya que para las tres repeticiones esta interacción tuvo un desarrollo significativo de nódulos y manchas, y a la vez un mayor peso de la raíz.

Cuadro 4.1. Efecto de las interacciones entre: *Meloidogyne incognita* con los hongos *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* en plantas de kenaf (*H. cannabinus*) 30 días después de la inoculación durante el primer experimento.

Inóculo del nemátodo asociado al hongo	Variables evaluadas en plantas de kenaf ¹				
	Altura (cm)	Núm. Hojas	Peso Raíz Fresco (gr)	Peso Follaje Fresco (gr)	Área Foliar (cm ²)
<i>Mel/Fus</i> ²	36.00 BC	11.40 AB	0.20 A	2.00 B	5.30 A
<i>Mel/Rhiz</i> ³	32.40 B	10.40 A	0.23 AB	1.84 B	6.50 AB
<i>Mel/Macro</i> ⁴	27.20 A	10.40 A	0.33 C	1.20 A	7.00 B
Control	39.80 C	13.60 B	0.25 B	2.85 C	6.70 AB
D.M.S.	4.74027	2.35675	0.03117	0.47153	1.60233

¹ Valores con letras iguales no varían, de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA).

² Interacción de *Meloidogyne incognita* con *Fusarium oxysporum*.

³ Interacción de *Meloidogyne incognita* con *Rhizoctonia solani*.

⁴ Interacción de *Meloidogyne incognita* con *Macrophomina phaseolina*.

Cuadro 4.2.Efecto de las interacciones entre: *Meloidogyne incognita* con los hongos *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* en plantas de kenaf (*H. cannabinus*) 30 días después de la inoculación durante el segundo experimento.

Inóculo del nemátodo asociado al hongo	Variables evaluadas en plantas de kenaf ¹				
	Altura (cm)	Núm. Hojas	Peso Raíz Fresco (gr)	Peso Follaje Fresco (gr)	Área Foliar (cm ²)
<i>Mel/Fus</i> ²	34.00 BC	11.20 AB	0.21 A	1.94 B	5.50 A
<i>Mel/Rhiz</i> ³	33.20 B	10.20 A	0.23 AB	1.89B	6.40 AB
<i>Mel/Macro</i> ⁴	26.60 A	9.20 A	0.34 C	1.17 A	7.10 B
Control	37.80 C	12.40 B	0.24 C	2.98 C	6.80 AB
D.M.S.	4.29361	2.56570	0.02401	0.10924	1.60180

¹ Valores con letras iguales no varían, de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA).

² Interacción de *Meloidogyne incognita* con *Fusarium oxysporum*.

³ Interacción de *Meloidogyne incognita* con *Rhizoctonia solani*.

⁴ Interacción de *Meloidogyne incognita* con *Macrophomina phaseolina*.

Cuadro 4.3. Efecto de las interacciones entre: *Meloidogyne incognita* con los hongos *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* en plantas de kenaf (*H. cannabinus*) 30 días después de la inoculación durante el tercer experimento.

Inóculo del nemátodo asociado al hongo	Variables evaluadas en plantas de kenaf ¹				
	Altura (cm)	Núm. Hojas	Peso Raíz Fresco (gr)	Peso Follaje Fresco (gr)	Área Foliar (cm ²)
<i>Mel/Fus</i> ²	34.00 B	10.40 A	0.19 A	1.87 B	5.50 A
<i>Mel/Rhiz</i> ³	32.60 B	10.00 A	0.24 B	1.82 B	6.70 BC
<i>Mel/Macro</i> ⁴	27.40 A	10.00 A	0.34 C	1.26 A	7.40 C
Control	38.69 C	11.20 A	0.22 AB	2.65 C	6.40 AB
D.M.S.	4.54949	2.21840	0.04109	0.30435	1.98047

¹ Valores con letras iguales no varían, de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA).

² Interacción de *Meloidogyne incognita* con *Fusarium oxysporum*.

³ Interacción de *Meloidogyne incognita* con *Rhizoctonia solani*.

⁴ Interacción de *Meloidogyne incognita* con *Macrophomina phaseolina*.

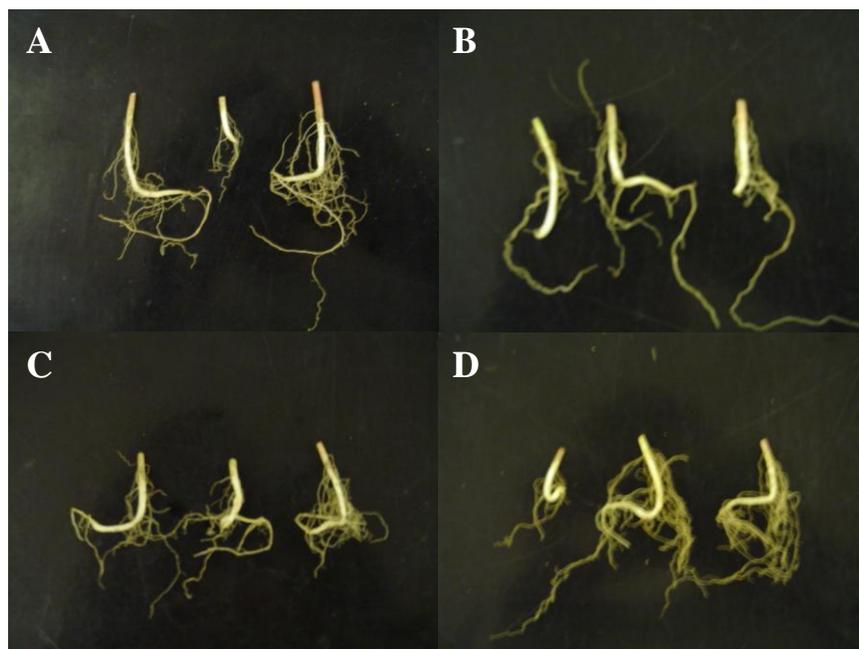


Figura 4. Raíces de las plantas de kenaf con las interacciones entre el nemátodo nodulador y los hongos del suelo a los 30 días después de la inoculación.
A) Raíces infectadas con la interacción de *M. incognita*/*F. oxysporum*
B) Raíces infectadas con la interacción de *M. incognita*/*R. solani*
C) Raíz infectada con la interacción de *M. incognita*/*M. phaseolina*
D) Raíces de plantas sin inocular.

Conclusiones

- Densidades poblacionales de *Meloidogyne incognita* mayores a 12,000 huevos/J2 por tiesto causaron amarillamiento, defoliación y hasta la muerte de la planta de kenaf (*H. cannabinus*).
- Las plantas infectadas con *Meloidogyne incognita* mostraron clorosis en hojas.
- Poblaciones de 6,000 huevos/J2 estimadas, redujeron significativamente el peso fresco del follaje.
- Bajo condiciones de invernadero, pudiera existir cierta tolerancia de la planta de kenaf a bajas poblaciones del nemátodo en el suelo.
- El hongo *Fusarium oxysporum* disminuyó la altura de las plantas de kenaf.
- El hongo de suelo *Rhizoctonia solani* no resultó patogénico al kenaf
- La inoculación de los hongos *Fusarium oxysporum* y *Macrophomina phaseolina* puede tener el efecto de reducir el peso y la altura de la planta al compararse con el control.
- La interacción *Meloidogyne incognita*/*Macrophomina phaseolina* aumentó el peso de la raíz debido a producción de nódulos.
- La interacción *Meloidogyne incognita*/*Fusarium oxysporum* afectó negativamente el peso de la raíz y el área foliar al compararse con el control.

Recomendaciones

Se recomienda que se lleve a cabo este experimento bajo condiciones de campo para poder observar el desarrollo normal de la planta. Para poder controlar la incidencia de nemátodos se debe establecer un buen programa de manejo y control. Más aún, aquellas variedades de kenaf con cierta resistencia a hongos habitantes del suelo pudieran ser invadidas por éstos si son pre-infectadas por nemátodos.

Se debe enfatizar en la utilización de controles, dejando como última alternativa el control químico. Para el caso del nemátodo nodulador, la utilización adecuada de nematicidas se puede considerar, ya que la rotación de cultivos puede no resultar efectiva debido a que el nemátodo nodulador tiene una gran gama de hospederos. Es necesario determinar la densidad poblacional del nemátodo que produce daño al cultivo y registrar cuan perjudicial puede ser para la planta. Esta información es necesaria para justificar el uso adecuado de nematicidas en un programa de manejo de nemátodos.

Hay que destacar, que la utilización de agentes de biocontrol, resulta ser una herramienta de gran utilidad tanto para controlar hongos como nemátodos. Debemos orientarnos más en el modo de acción de los mismos, como es el caso del hongo *Paecilomyces lilacinus*, que no permite el desarrollo del nemátodo nodulador e inhibe el crecimiento de determinados hongos. Teniendo esto como base, podríamos establecer un buen programa de manejo integrado de plagas, en donde sea costo-efectivo, controlemos a los patógenos del suelo sin dañar el medioambiente.

Literatura citada

Abawi, G.S. y M.A. Corrales. 1980. Seed transmission and effect of fungicide seed treatment against *Macrophomina phaseolina* isolate on dry edible beans. Turrialba 40: 334-339.

Adamson, W.C., E.G., Stone y N.A. Minton. 1974. Field resistance to the Javanese root-knot nematode in kenaf. Crop Science 14: 334-335.

Agrios, G.N. 1997. Plant Pathology. Harcourt Academic Press. 4th Edition. Pp. 343-345, 390-395.

Alconero, R. y E. Stone. 1969. Phytophthora parasitica nicotianae in Roselle and Kenaf in Puerto Rico. Plant Disease Reporter 53: 702- 705.

Barillas, J.R., G.W. Lawrence y K.S. McLean. 1993. Effect of initial population density of *Meloidogyne incognita* race 3 on the growth of kenaf (*Hibiscus cannabinus*). Nematropica 23: 15-19.

Barker, K.R. 1985. Nematode extraction and bioassays. En: K.R. Barker, C.C. Carter y J.N. Sasser (ed.). An Advanced Treatise on *Meloidogyne II*, pp. 27-31. International Meloidogyne Project. North Carolina State University, Raleigh, C.N.

Batson, W.E., J. Cáceres y R. Carvajal. 2000. Evaluation of selected seed treatment fungicides and combinations for kenaf stand establishment. Research Report: Mississippi Agricultural and Forestry Experiment Station 22: 1-3.

Batten, C.K. y N.T. Powell. 1971. The *Rhizoctonia- Meloidogyne* disease complex in flue-cured tobacco. J. Nematol 3: 164-169.

Brodie, B. B. y W.E. Cooper. 1964. Relation of parasitic nematodes to post-emergence damping-off of cotton. Phytopathology 54: 1023-1027.

Christie, J.R. 1936. The development of root- knot nematode galls. Phytopathology 26: 1-22.

Dempsey, J. 1975. Kenaf. En: J. Dempsey (ed.). Fiber crops, pp.203-304 The University Press of Florida, Gainesville. Rose Printing Co., Tallahassee.

Dhingra, O.D. y J.B. Sinclair. 1978. Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina*. Universidad Viscoza, Brasil: 166.

Díaz-Román, M. 2002a. Aflora un nuevo cultivo. Periódico El Nuevo Día, San Juan, Puerto Rico, Sept. 7, 2002, p.110.

Díaz-Román, M. 2002b. Variadas las posibilidades del kenaf. Periódico El Nuevo Día, San Juan, Puerto Rico, Sept. 11, 2002, p.107.

Faulkner, L.R. y C.B. Skotland. 1965. Interaction of *V. dahliae* and *Pratylenchus mynyus* in *Verticillium* wilt of peppermint. Phytopathology 55: 583-586.

Gams, W. y H.I. Nirenberg. 1989. A contribution to the generic definition of *Fusarium*. Mycotaxon 35: 407-416.

Khan, M.W. y S.A. Hosseini-Nejad. 1991. Interaction of *Meloidogyne javanica* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* on some chickpea cultivars. Nematol. mediterranean 19: 61-63.

Lawrence, G.W. 1990. Plant-Parasitic Nematodes – Pest of Kenaf. En: G.W. Lawrence (ed.). A summary of kenaf Production and product development research 1989-1993, pp. 1-14. South Mississippi Branch Experiment Station.

Lawrence, G.W. y K.S. McLean. 1992. Host status and response of kenaf (*Hibiscus cannabinus*) to *Meloidogyne incognita* race 4, *M. javanica*, *Hoplolaimus magnistylus* and *Rotylenchulus reniformis*. Nematropica 22: 247-250.

Lawrence, G.W., K.S. McLean., B.S. Brasher., S.W. Neill., y M.J. Fuller. 1990. Association of plant parasitic nematodes with kenaf in Mississippi. En: G.W. Lawrence y K.S. McLean (ed.). Proceedings Mississippi Association of Plant Pathologists and Nematologists, pp. 4. Mississippi State University, Mississippi State, Mississippi U.S.A. 9:4.

Maloy, O.C. y T.D. Murray. 2001. Encyclopedia of Plant Pathology (1): 337- 338.

Minton, N.A y W.C. Adamson. 1979. Control of *M. javanica* and *M. arenaria* on kenaf and roselle with genetic resistance and nematicides. *J. Nematol.* 11: 37-41.

Papavizas, G.C., P.B. Adams., R.D. Lumsten., J.A. Lewis., R.L. Dow., W.A. Ayers y J.G. Kantzes. 1975. Ecology and epidemiology of *Rhizoctonia solani* in field soil. *Phytopathology* 65:871-876.

Parmeter, J.R.Jr. y H.S. Whitney. 1970. Taxonomy and nomenclature of the imperfect state. En: J.R.Parmeter Jr (ed.). *Biology and Pathology of Rhizoctonia solani*, pp. 225. Univ of California Press, Berkely CA.

Pineda, J.B. y J. Ávila. 1993. Pérdidas causadas por *Macrophomina phaseolina* en cultivares de girasol (*Helianthus annuus*). *Agronomía Tropical* 43: 241-252.

Reed, C.F. 1976. Information summaries on 1000 economic plants. Typescripts submitted to the USDA. www.biomatnet.com.

Reynolds, H.W. y R.G. Hanson. 1957. *Rhizoctonia* disease of cotton in presence or absence of the cotton root-knot in Arizona. *Phytopathology* 47: 256-261.

Siddiqui, Z.A., I. Mahmood. 1992. Biological control of root-rot disease complex of chickpea caused by *Meloidogyne incognita* race 3 y *Macrophomina phaseolina*. *Nematol. mediterr* 20: 199-202.

Singleton, L.L., J.D. Mihail y C.M. Rush. 1992. *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. APS Press, St. Paul, Minnesota, 115,134,157 pp.

Short, G.E. y T.D. Wyllie. 1978. Inoculum potential of *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology* 68: 742-746.

Smits, B.G. y R. Noguera. 1988. Ontogeny and morphogenesis of sclerotial and picnidial of *Macrophomina phaseolina*. *Centro Nacional de Investigación Agropecuaria de Venezuela*. 38: 69-78.

Taylor, A.L. y J.N. Sasser. 1983. Biología, identificación y control de los nemátodos de nódulo de la raíz (Especies de *Meloidogyne*). Proyecto Internacional de *Meloidogyne*. Universidad del Estado de Carolina del Norte, Raleigh, C.N, pp. 1-50.

Taylor, D.P. y T.D. Wyllie. 1959. Interrelationship of root knot nematode and *Rhizoctonia solani* on soybean emergence. *Phytopathology* 49: 552 (Abstr).

Tu, C.C. y Y.H. Cheng. 1971. Interaction of *Meloidogyne javanica* and *Macrophomina phaseoli* in Kenaf Root Rot. *J. Nematol* 3: 39-42.

Veech, J.A. 1989. The response of kenaf (*Hibiscus cannabinus*) to the root-knot nematode (*M. incognita*). *J. Nematol* 21: 593.

Veech, J.A. 1992. Reproduction of four races of *Meloidogyne incognita* on *Hibiscus cannabinus*. Supplement to *Journal of Nematology (Annals Applied Nematology)* 24:717-72.

White, G.A., D.G. Cummins., E.L. Whiteley, W.T. Fike., J.K. Greig., J.A. Martin., GB. Killinger., J.J. Higgins y T.F. Clark. 1970. Cultural and harvesting methods for kenaf. An annual crop source of pulp in the Southeast. Production Research Report No.113Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture.

Yang, H., N.T. Powell y K. Barker. 1976. Interactions of concomitant species of nematodes and *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* on cotton. *J. Nematol.* 8:74-80.