



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE MAGISTER EN CIENCIAS AGRARIAS

“Estudio de hongos patógenos de *Phyla canescens* y *Alternanthera philoxeroides*,  
dos plantas argentinas invasoras en Australia”

GUADALUPE TRAVERSA

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2015

## PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Magister en Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Agronomía durante el período comprendido entre Enero 2006 y Marzo 2011, bajo la dirección del Dr. R. Delhey (2006-2014) y de la Dra. Virginia Bianchinotti (2014-2015).

Guadalupe Traversa  
D.N.I: 25665369



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el .... / .... / ..... , mereciendo la calificación de .....(.....)

*A Mariela y a mi pareja, Guillermo*

*“La genialidad es  
producto del esfuerzo cotidiano”*

(Antonio De Luca)

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al CSIRO-Australia por el financiamiento parcial para realizar esta tesis a través de una beca otorgada en el marco de los proyectos “Consultancy-Surveys for plant pathogen natural enemies of Lippia (*Phyla canescens*)”, “Surveys for and selection of plant pathogens as biological control agents for Lippia (*Phyla canescens*)” y “Estudio preliminar. Búsqueda y estudio de patógenos asociados con *Alternanthera philoxeroides*” (2006-2011).

Al Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur, por el otorgamiento de un cargo para realizar estudios de posgrado en el área Producción Vegetal a través del Programa “Promagro” (Proyecto de Mejoramiento de la Enseñanza en Agronomía).

Les agradezco a las siguientes personas que colaboraron para que esta tesis se hiciera posible: Virginia Bianchinotti, Mic Julien, Alejandro Sosa, Freda Anderson, Natalie O`Leary, Carol Ellison, Louise Morin, Mirta Kiehr y Silvia Frayssinet.

## INDICE DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN</b>	1
ABSTRACT	2
Capítulo I: Introducción General	3
Capítulo II: Estudios de patógenos sobre <i>Phyla nodiflora</i>	
1. Introducción	11
2. Materiales y Métodos	17
2.1. Viajes de exploración	17
2.2. Recolección de muestras	18
2.3. Búsqueda de hongos patógenos	19
2.4. Identificación	19
2.5. Aislamiento y cultivo	20
2.6. Ensayos de inoculación	21
2.7. Estudios especiales sobre <i>Puccinia lantanae</i>	22
2.8. Estudios especiales sobre <i>Cercospora lippiae</i> y <i>Colletotrichum</i> spp.	24
3. Resultados	27
3.1. Distribución de <i>Phyla nodiflora</i> en Argentina	27
3.2. Hongos encontrados en <i>Phyla nodiflora</i>	28
3.3. Distribución de <i>Puccinia lantanae</i>	30
3.4. Descripción de <i>Puccinia lantanae</i>	31
3.5. Estudios experimentales en <i>Puccinia lantanae</i>	33
3.6. Distribución de <i>Cercospora lippiae</i>	44
3.7. Descripción de <i>Cercospora lippiae</i>	44
3.8. Estudios experimentales en <i>Cercospora lippiae</i>	47
3.9. Distribución de <i>Colletotrichum</i> spp.	48
3.10. Descripción y ensayos de inoculación en <i>Colletotrichum</i> spp.	49
4. Discusión	54
<b>Capítulo III: Estudios de patógenos de <i>Alternanthera philoxeroides</i></b>	
1. Introducción	62
2. Materiales y Métodos	66
3. Resultados	67
3.1. Distribución de <i>Alternanthera philoxeroides</i>	67

3.2. Hongos encontrados en <i>Alternanthera philoxeroides</i>	67
3.2.1. Roya. <i>Uredo pacensis</i>	69
3.2.2. Roya blanca. <i>Wilsoniana bliti</i>	70
3.2.3. Mancha foliar y cancro. <i>Alternaria</i> sp.	71
3.2.4. Antracnosis. <i>Colletotrichum</i> spp.	73
4. Discusión	77
<b>Capítulo IV: Conclusiones</b>	81
<b>Literatura citada</b>	83

## RESUMEN

*Phyla nodiflora* var. *minor* y *Alternanthera philoxeroides* (lagunilla) son plantas invasoras consideradas malezas en Australia. Este país propuso el estudio de los enemigos naturales en el ambiente nativo, Argentina y Bolivia, con el fin de seleccionar posibles agentes de control biológico. Con este fin se llevaron a cabo viajes exploratorios para coleccionar plantas sintomáticas y aislar hongos patógenos. Asociados a *Phyla nodiflora* se encontraron *Puccinia lantanae*, *Cercospora lippiae* y *Colletotrichum* spp. En lo que se refiere a lagunilla los patógenos hallados fueron *Uredo pacensis*, *Alternaria* sp., *Wilsoniana blitti* y *Colletotrichum* spp. Se realizaron ensayos experimentales de inoculación, germinación, shock térmico, almacenamiento y velocidad de crecimiento con los patógenos hallados. Para *P. nodiflora*, *Puccinia lantanae* y *C. lippiae* podrían utilizarse como agentes de control clásico y las especies de *Colletotrichum* como agentes de control inundativo. *Uredo pacensis* y *W. blitti* podrían considerarse como agentes de control clásico de la forma terrestre de lagunilla una vez completados los estudios de especificidad. Se recomendaría el uso de *Alternaria* sp. y *Colletotrichum* spp. como micoherbicidas. Cuando se aclare la situación taxonómica de *Phyla nodiflora* en Australia y Argentina, se podrán definir con certeza los agentes de biocontrol de la variedad *minor*.

## ABSTRACT

*Phyla nodiflora* var. *minor* and *Alternanthera philoxeroides* (alligator weed) are considered weeds in Australia. Studies of its natural enemies were realized in the native range, Argentina and Bolivia to select pathogenic fungi as biocontrol agents. Exploratory trips were carried out to collect diseased plants and to isolate pathogenic fungi. *Puccinia lantanae*, *Cercospora lippiae* and *Colletotrichum* spp. were found in *P. nodiflora*. *Uredo pacensis*, *Alternaria* sp., *Wilsoniana blitti* and *Colletotrichum* spp were found in alligator weed. Experimental assays (inoculation, germination, storaging, growth rate) were performed with the pathogens. For *P. nodiflora*, *Puccinia lantanae* and *C. lippiae* might be used as classical biocontrol agents and *Colletotrichum* species as inundative agents. *Uredo pacensis* and *W. blitti* would be considered as classical biocontrol agents after specificity is determined. *Alternaria* sp. and *Colletotrichum* spp. could be recommended as bioherbicides. Biocontrol agents of *P. nodiflora* var. *minor* will be thoroughly confirmed once taxonomic discrepancies between Argentina and Australia can be elucidated.

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Una de las principales causas de pérdida de biodiversidad en ecosistemas naturales son las invasiones biológicas (Williamson, 1996; Mack et al., 2000; Keane & Crawley, 2002). Los riesgos de una comunidad a ser invadida han aumentado en los últimos años, debido a la expansión del transporte aéreo, del comercio internacional, de la migración y el turismo (Mullin et al., 2000). Miembros de todos los reinos de organismos (incluso virus) pueden actuar como agentes de invasiones o invasores.

Tres factores contribuyen principalmente a la tasa de crecimiento poblacional de una especie invasora: la disponibilidad de los recursos (Davis et al., 2000; Blumenthal 2006), el escape a los enemigos naturales (EN) (Mack et al., 2000) y el ambiente físico (Stokes & Cunningham, 2006), todos estos varían en tiempo y espacio. Respecto al segundo factor, cuando organismos exóticos son liberados de sus EN se vuelven ecológicamente más “adaptables” que sus competidores nativos. En ausencia de esta presión y bajo condiciones ambientales favorables estos inmigrantes pueden adquirir el nivel de maleza invasora (Evans, 2002a). Ambos conceptos, invasor y maleza están estrechamente relacionados.

En el caso particular de las plantas, se definen como malezas a aquellas que crecen en un determinado lugar y tiempo donde no son deseadas, y que, por ende, son perjudiciales en esos sitios ya que interfieren en la utilización de los recursos o afectan adversamente el bienestar humano (Sabbatini et al., 2004). Todas las plantas invasoras son consideradas malezas, si bien no todas las malezas actúan como plantas invasoras (Culliney, 2005). Así, pueden actuar como malezas tanto plantas introducidas como autóctonas, pero es raro que una planta catalogada

como maleza en un ecosistema, también lo sea en su centro de origen. En el ambiente nativo esas mismas plantas pueden ser económicamente útiles y ecológicamente importantes (Cronk & Fuller, 1995).

Entonces, las plantas invasoras son malezas en el amplio sentido de la palabra porque producen efectos indeseables para el hombre (Radosevich et al., 2007). En los agroecosistemas, compiten con los cultivos por espacio y/o nutrientes o perjudican las pasturas mediante la invasión de campos destinados a la ganadería. En este último caso puede ser tanto por competencia con plantas que sirven de alimento al ganado y/o por sus efectos nocivos directos sobre este. En áreas de vegetación natural o seminatural, una vez establecidas, pueden dispersarse sin la asistencia humana y provocar alteraciones en las comunidades preexistentes, desplazando a especies nativas o provocando efectos indirectos indeseables en estos ambientes (Randall, 1997).

Para mitigar los efectos producidos por las malezas, se utilizan tres estrategias: *prevención, erradicación y control* (Mack et al., 2000). La prevención consiste en la promulgación y ejecución de leyes que prohíban la entrada de malezas o restrinjan su movimiento dentro de un país. La eficacia de estas leyes ha sido fuertemente cuestionada (Schmitz & Simberloff, 1997). Una vez que una maleza ha alcanzado una densidad y extensión tal, que es reconocida como un problema, la erradicación es difícil de lograr. Su eliminación total se convierte en una imposibilidad económica y práctica (Radosevich et al., 2007).

Una vez que la prevención falla y la erradicación deja de ser una opción, deben aplicarse medidas de control con el fin de minimizar el impacto económico y ambiental producido por la maleza. Existen cuatro tipos de control: físico, químico, biológico y cultural.

Los métodos de *control físico* pueden ser efectivos en pequeñas infestaciones. En este tipo de control se incluyen métodos manuales de extracción de malezas, métodos mecánicos por medio de herramientas y maquinarias, labranza, quemado y mulching (Sheley et al., 2003). Algunos autores agregan a esta lista otras estrategias como la inundación, la rotación y lo engloban bajo el nombre de *control cultural* (Akobundu, 1987). El uso de herbicidas sintéticos (*control químico*) es una parte integral del control de malezas en sistemas agrícolas y pastizales (DiTomaso, 2000). Esta estrategia no es aplicable en ecosistemas naturales (Mc Fadyen, 1998). Los controles mecánico y químico son costosos, laboriosos y precisan repetidas aplicaciones, sobretodo donde la maleza ocupa extensas áreas y el valor de la tierra es bajo o en áreas de difícil acceso. A su vez el control mecánico tiene la desventaja de perturbar el hábitat y contribuir a la compactación y erosión del suelo (Tu et al., 2001).

El *control biológico* (CB) es el uso de organismos vivos para contener la población de una maleza haciéndola menos abundante o menos dañina (Eilenberg et al., 2001). El control biológico de malezas con insectos ha sido empleado por más de un siglo (Julien & Griffiths, 1999), mientras que el control con hongos comenzó a implementarse a partir de los años 1970. Este último enfoque se constituye en una alternativa valiosa de control con el fin de reducir el uso de herbicidas (Evans et al., 2001a). Por otra parte el CB con insectos muchas veces resulta dificultoso debido a la imposibilidad de hallar organismos que cumplan con los requisitos necesarios de un agente de biocontrol (Evans & Ellison, 1990).

Existen distintas estrategias de CB. El **control biológico clásico** (CBC) tiene como objetivo reestablecer el “balance natural” que controla a la maleza en su ambiente nativo (Hajek, 2004). Éste tipo de CB, a veces llamado *inoculativo*

(Evans et al., 2001a), es el enfoque más aplicado para controlar malezas exóticas. Consiste en introducir un enemigo natural exótico en un nuevo ambiente para que el mismo pueda establecerse y regular la maleza a largo plazo (Mortensen, 1986; Evans & Ellison, 1990; Barreto & Evans, 1997) sin necesidad de una intervención ulterior (Hajek, 2004). Esta premisa se denominó “hipótesis de liberación de enemigos” (enemy release hypothesis, ERH). El requisito más importante es que el agente seleccionado sea altamente específico de la maleza “blanco” (o “target”) (Evans, 2002b). Los patógenos son generalmente específicos a una especie o inclusive a una variedad de planta (Hasan, 1972) producto de la coevolución a lo largo de un periodo prolongado de tiempo (Whapshere, 1989). En una asociación coevolucionada, el enemigo natural se adapta a los cambios genéticos del hospedante, pero es genéticamente estable por fuera de esta asociación (Evans, 2002b). Como agentes de CBC se utilizan hongos patógenos coevolucionados provenientes del centro de origen de la maleza.

Los pasos a seguir para identificar patógenos que sean candidatos de biocontrol clásico son los siguientes: realizar estudios taxonómicos y de diversidad del hospedante, búsquedas bibliográficas de EN, viajes exploratorios en el ambiente nativo, selección de candidatos, colección de distintas razas de patógenos. Para optar por un candidato, se realizan estudios de patogenicidad, de taxonomía y ciclo de vida, así como también se determina el impacto, la agresividad y especificidad de las distintas razas de patógenos (Morin et al., 2006).

Una búsqueda combinada de patógenos y artrópodos al comienzo de un programa de control clásico es la mejor estrategia para identificar los candidatos más promisorios (Charudattan, 2005).

El CBC es considerado una alternativa de manejo **segura, económica y sustentable** (Watson, 1991; TeBeest et al., 1992; Evans 1995; Evans, 2002a). Sin embargo, todavía siguen existiendo algunas dudas por parte de las autoridades regulatorias acerca de la seguridad de transferir patógenos entre países o regiones geográficas (Evans et al., 2001b), a pesar de que, como ya se ha explicado, exhaustivos ensayos de rango de hospedantes y estudios fundamentales de biología y ecología de los potenciales agentes son requisitos esenciales para que un patógeno pueda ser introducido (Adams, 1988). Las controversias acerca de los riesgos ecológicos que produce el CBC (Louda et al., 2003; Thomas et al., 2004), se refieren a insectos introducidos que atacan plantas nativas (Louda et al., 1997). Por el contrario, de acuerdo a nuestro conocimiento, ninguno de los hongos patógenos introducidos, hayan sido exitosos o no en el control, ha causado un daño significativo a plantas “no blanco” (Barton, 2004). Además, es difícil que un patógeno acceda a nuevos hospedantes ya que la compatibilidad esta controlada por varios genes que codifican factores de patogenicidad (Frank, 1993). Un ejemplo es el caso de la roya *Puccinia chondrillina* introducida para el control de yuyo esqueleto (*Chondrilla juncea*) en Australia que atacó únicamente la forma “hoja angosta”. Por este motivo, otra raza de esta roya debió introducirse con el fin de controlar las formas “hoja intermedia” y “hoja ancha” (Hasan, 1981).

En el **control biológico inundativo**, los hongos fitopatógenos son aplicados por lo general en forma de pulverización para matar o reducir el crecimiento de una maleza (“micoherbicida”). Tanto algunos hongos exóticos como endémicos pueden poseer potencial micoherbicida pudiendo controlar malezas exóticas y autóctonas (Templeton et al., 1979). Los micoherbicidas se producen por medio de un aumento artificial del patógeno y se aplican de la misma manera que un

herbicida (Mortensen, 1986), pudiendo requerirse varias aplicaciones anuales (Evans et al., 2001b). La aplicación debe coincidir con el momento más susceptible de la maleza y con las condiciones ambientales óptimas de infección del agente (Evans, 1995). Generalmente se seleccionan especies de patógenos endémicas, por lo que la importancia de la especificidad es menor respecto al CBC. A pesar de esto, la habilidad del patógeno para dispersarse largas distancias debe ser limitada lo que disminuirá la posibilidad de que se infecten otras especies de plantas (Evans, 1992). A su vez, el registro comercial de estos bioherbicidas es un requisito necesario por lo que se necesita demostrar cierta especificidad y seguridad de que esas grandes cantidades de inóculo no dañarán otras especies (Charudattan, 1982; Templeton, 1992). Aunque los microherbicidas se continúan investigando, problemas en la producción, formulación y comercialización han reducido su utilización (Morin, 1996).

A pesar de los obvios requerimientos de especificidad, hongos polífagos como *Sclerotinia sclerotiorum* (Brosten & Sands, 1986) y *Chondrostereum purpureum* (de Jong et al., 1990) se estudiaron como bioherbicidas para controlar a *Cirsium arvense* en Norteamérica y a *Prunus serotina* en Holanda, respectivamente. En el caso de *C. purpureum* se logró desarrollar un microherbicida denominado Biochon (de Jong, 2000). Respecto a *S. sclerotiorum* no se observó un control continuo de *C. arvense* (Bourdot et al., 2006).

Otro método de control biológico es aquel llamado “**control de conservación**” (o “**fomento**”), en este caso los EN no son liberados, en cambio se modifica el ambiente o las prácticas existentes para proteger y favorecer la población de EN específicos (Hajek, 2004). Esta técnica está relacionada con la identificación de los factores que limitan la efectividad de un enemigo residente, estos deben

modificarse de manera tal de beneficiar la acción del mismo con el fin de aumentar su impacto sobre la invasora (Müller-Schärer & Frantzen, 2000).

En 1984 en Australia se desarrolló la primer Acta de Control Biológico que estableció una base legal para la introducción de agentes exóticos de biocontrol (Harris, 1991). Los cinco países más activos, respecto al número de malezas seleccionadas como blanco de control y a los agentes liberados, son U.S.A (incluye Hawaii), junto con Australia y luego Sudáfrica, Canadá y Nueva Zelanda (Hoffmann, 1995). Históricamente Australia ha participado activamente en el desarrollo de protocolos y en el financiamiento de proyectos de control biológico con enfoque clásico usando hongos patógenos (Evans, 2000).

En ese país, dos plantas herbáceas sudamericanas, *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. (Amaranthaceae) y *Phyla canescens* (Kunth) Greene (Verbenaceae), fueron introducidas durante el siglo pasado y se transformaron en malezas invasoras que ocasionan graves perjuicios ambientales y económicos, tanto en ambientes terrestres como acuáticos.

### **Hipótesis general**

Enemigos naturales introducidos, entre ellos hongos patógenos, pueden limitar las poblaciones de especies de plantas invasoras exóticas.

### **Objetivo general**

Investigar los hongos patógenos asociados a *Phyla nodiflora* y *Alternanthera philoxeroides* en sus sitios de origen para evaluar su uso como agentes de control biológico clásico.

### **Objetivos Específicos**

- Estudiar la distribución geográfica de las enfermedades que afectan las poblaciones de *Phyla nodiflora* y *Alternanthera philoxeroides*, estimar su incidencia y/o severidad y el impacto que producen a nivel individual y poblacional.
- Aislar, cultivar *in vitro* e identificar los hongos hallados. Estudiar la biología de los patógenos que intervienen en la etiología de las enfermedades.
- Probar patogenicidad en hongos seleccionados como posibles candidatos para biocontrol.
- Analizar la especificidad de los hongos patógenos en plantas cercanamente emparentadas a las especies blanco.
- Seleccionar potenciales agentes patógenos de biocontrol en función de su especificidad y agresividad.

## Capítulo II.

### ESTUDIOS DE PATOGENOS SOBRE *Phyla nodiflora*

#### 1. Introducción

La hierba conocida vulgarmente como “yerba del mosquito” es una amarantácea perenne de origen sudamericano. En Argentina, su nombre científico es *Phyla nodiflora* var. *minor* (Hook.). En Australia, la taxonomía es diferente, la mencionada especie, *P. nodiflora* var. *minor*, es denominada *P. canescens* y su nombre vulgar es “lippia”. Esta última, es una importante maleza en Australia. Fue introducida como ornamental durante la segunda parte del siglo XIX, ahora ocupa 5.3 millones de has de la planicie de inundación de la cuenca “Murray Darlin”. Su extensión está en aumento fundamentalmente debido al efecto producido por las inundaciones (Earl, 2003). Esta especie es una importante amenaza a la biodiversidad e impacta sobre los sistemas de pastoreo, aumenta la erosión, reduce la calidad del agua, no es palatable para el ganado y las pérdidas estimadas para la ganadería han sido de 38 millones de dólares australianos anuales con un costo ambiental de 1.8 billones por año (Julien et al., 2004).

En la actualidad, los métodos de control utilizados son a corto plazo, deficientes y no sustentables, entre ellos se pueden mencionar la aplicación de herbicidas, el manejo del pastoreo y el uso de pasturas perennes. El control biológico ha sido propuesto como la única opción sustentable para controlar esta maleza en bosques, selvas y en la orilla de los ríos (Earl, 2003; Julien et al, 2004).

La situación taxonómica y nomenclatural de lippia es confusa. El género *Phyla* fue introducido en 1790 por Loureiro (O’Leary & Múlgura, 2012). Pertenece a la tribu Lantaneae, la más numerosa dentro de la familia Verbenaceae, ésta cuenta con representantes mayormente del continente americano y constituye el clado

hermano a la tribu Verbenaceae (Marx et al., 2010). Dentro de la tribu, *Phyla* se presenta como un género monofilético; siendo los géneros más cercanos *Burroughsia*, *Lantana* y *Lippia*.

En el último análisis del género, basado sólo en características morfológicas, O'Leary & Múlgura (2012) reconocen cinco especies: *Phyla betulifolia* (con distribución desde Brasil y Paraguay hasta Costa Rica y Cuba), *P. cuneifolia* (USA), *P. lanceolata* (USA), *P. linearis* (Venezuela) y *P. nodiflora*, la única que crece en la Argentina.

*Phyla nodiflora*, se distribuye desde el sur de Ecuador, abarcando los países de Perú, Chile, Argentina, Uruguay, Paraguay, Bolivia y Brazil (Collantes et al., 1998; Múlgura de Romero et al., 2003; O'Leary & Múlgura, 2012). Su crecimiento es rápido, florece durante la primavera hasta el otoño, se propaga por semillas y asexualmente por fragmentación; los fragmentos asexuales y las semillas son dispersados principalmente por el agua. El hallazgo de polen fósil en Argentina – en Santa Fé y Buenos Aires (Alzugaray et al., 2003; Fontana, 2005) – refuerza la idea de este área como “centro de origen”.

O'Leary & Múlgura (2012) distinguen tres variedades de *P. nodiflora* (*minor*, *nodiflora* y *reptans*) que pueden diferenciarse por su hábito y por las características morfológicas de sus hojas y frutos (Lám. 1).

***Phyla nodiflora* var. *minor*** tiene hábito prostrado, hojas pequeñas pubescentes, elipsoidales con ápices agudos que pueden ser serrados, vena principal prominente e inflorescencias globosas u ovoides. Se encuentra principalmente en las regiones templadas de América del Sur, desde Chile, Argentina, Uruguay y sur de Brasil hasta Ecuador y Perú (Collantes et al., 1998; Múlgura de Romero et al., 2003; O'Leary & Múlgura, 2012). Esta es la variedad más ampliamente

distribuida en Argentina, donde puede hallársela creciendo desde Chubut hasta todas las provincias del norte, salvo Misiones (O’Leary & Múlgura, 2012). Ha sido introducida a otras partes del globo (América del Norte, Europa, Oceanía, etc.) comportándose como planta invasora en Australia y otros países, se ha naturalizado en Francia, España, Italia, Algeria, Botswana, Senegal, Egipto, Sudáfrica, Nueva Zelanda y Australia (Kennedy, 1992). En la Argentina esta especie ha sido tradicionalmente denominada *P. canescens*. Sus otros sinónimos incluyen a *Lippia canescens*, *L. nodiflora* var. *minor*, etc.

***Phyla nodiflora* var. *nodiflora*** tiene hábito postrado, a veces erecto, sus hojas son grandes obovadas, espatuliformes y serradas, con ápice subobtusado y una conspicua vena principal y sus inflorescencias son cilíndricas. Esta variedad posee distribución mundial. En América se encuentra desde Argentina y Chile hasta Estados Unidos de América. Éste es el taxon que hasta ahora generalmente ha sido reconocido como *P. nodiflora*. Su distribución documentada en Argentina incluye desde el norte de las provincias de Buenos Aires y La Pampa a todas las provincias del centro, Cuyo, NOA y NEA y Litoral, con excepción de La Rioja, Catamarca y Misiones (O’Leary & Múlgura, 2012). En Australia, esta especie, según estudios morfológicos, es considerada nativa hasta el momento (Munir, 1993; Earl, 2003;).

***Phyla nodiflora* var. *reptans*** (Kunth) Moldenke A. St Hill es la única variedad que sólo crece en América, desde el norte y centro de la Argentina (norte bonaerense, Entre Ríos, Santa Fe, Corrientes, Chaco, Formosa, Salta, Jujuy, Tucumán y Santiago del Estero) hasta México y sur de Estados Unidos de América. Su hábito es erecto, sus hojas son ovadas a rómbico-ovadas, con

márgenes dentados o al menos dentados desde la línea media de la hoja y venación muy marcada (O’Leary & Múlgura, 2012).



**Lámina 1.** A–H. *Phyla nodiflora* (L.) Greene var. *nodiflora*. —A. Aspecto general de la planta. —B. Superficie adaxial de la hoja—C. Flor con brácteas florales —D. Bráctea —E. Corola —F. Caliz. —G. Fruto —H. Gineceo. I, J. *Phyla nodiflora* var. *minor*. —I. Aspecto general de la planta. —J. Superficie adaxial de la hoja. K, L. *Phyla nodiflora* var. *reptans*. —K. Aspecto general de la planta —L. Superficie adaxial de la hoja. (Extraído de O’Leary & Múlgura, 2012).

Para iniciar un programa de control biológico de una maleza es imprescindible el estudio de sus enemigos naturales. Es escasa la información acerca de los enemigos naturales de los miembros americanos de la Tribu Lantanae en general y

de las especies de *Phyla* en particular. Sólo unos pocos hongos se han descrito. Entre los biótrofos puede mencionarse la roya *Puccinia lantanae* Farl., capaz de infectar tanto a especies de *Phyla* como a otros géneros afines a éste (p.e. *Aloysia*, *Lantana*, *Lippia*, *Priva* y otros); “oídios negros” como *Meliola lippiae* Maubl. y *Meliola lantanae* Syd. & P. Syd., en *P. nodiflora* y *Lippia stoechadifolia* en Norteamérica y en *P. nodiflora* en Sudamérica, respectivamente (Viégas, 1961, Farr et al., 1989; y un oídio verdadero (*Oidium* sp.) que se registró en *P. nodiflora* en Norteamérica (Farr et al., 1989). Dentro de los hongos necrótrofos puede mencionarse a *Cercospora lippiae* Ellis & Everh. en *P. lanceolata* y *P. nodiflora* en Norteamérica y, en otras especies de *Phyla* y *Lippia* en el Caribe, Asia y África (Ellis, 1976). También *Cercospora phylae* S. Narayan, P. N. Singh & G. P. Rao (incluida en la especie colectiva *C. apii* Fresen. emend. Crous & Braun) se describió en *P. nodiflora* en India (Crous & Braun, 2003). *Sphaceloma lippiae* Baines & Cumm. (“antracnosis”) y *Sclerotium rolfsii* Sacc. han sido encontrados en *P. nodiflora* y/o *P. lanceolata* (Farr et al., 1989). *Phoma zappaniae* Speg. ha sido descrita en *P. nodiflora* (como *Lippia nodiflora*) en Buenos Aires (Spegazzini, 1911) desconociéndose si se trata de un hongo patógeno ya que fue hallado en tallos secos.

Otras royas han sido descritas asociadas con los géneros *Aloysia*, *Lantana*, *Lippia* y *Priva*. Por ejemplo, *Puccinia mariae* Jacks., una roya que forma uredos y telios ha sido encontrada en *Lippia* en Brazil (Jackson, 1932). También al menos cinco especies de *Prospodium* han sido encontradas en Verbenaceae en Argentina y países vecinos: *P. lippiae* (Speg.) Arth. en *Aloysia*, *Lippia*, *Junellia* y *Xeroaloyisia*; *P. paraguayense* (Speg.) Speg. en *Aloysia*, *Lippia* y *Junellia*; *P. perodiosum* Cumm. en *Aloysia* (Lindquist, 1982); *P. peruvianum* (Sydow) Cumm.

en una Verbenaceae no determinada taxonómicamente (*Lippia?*) (Berndt, 2002) y *P. tuberculatum* (Speg.) Arth. en *Lantana* spp.

Teniendo en cuenta que *Aloysia*, *Lantana*, *Lippia* y *Priva* forman junto con *Phyla* un clado en la subfamilia Verbenoideae, puede ser que algunas de las royas mencionadas se encuentren también sobre *P. nodiflora* y especies emparentadas. Asimismo, dada la escasez de estudios fitopatológicos en *Phyla* spp., y en el caso particular de *Phyla nodiflora* var. *minor*, su hábito de crecimiento y el tamaño pequeño de sus hojas pueden haber contribuido a que síntomas de enfermedad no hayan sido detectados, se postula la **hipótesis** de que existen hongos patógenos de *Phyla nodiflora* que pueden ejercer un eficiente control biológico sobre sus hospedantes.

### **Objetivos específicos**

- Estudiar la distribución geográfica de las enfermedades que afectan las poblaciones de *Phyla nodiflora*, estimar su incidencia y/o severidad y el impacto que producen a nivel individual y poblacional.
- Reunir información sobre la epidemiología de las enfermedades tratadas, teniendo en cuenta supervivencia, diseminación, condiciones ambientales, etc.
- Aislar, cultivar *in vitro* e identificar los hongos hallados. Estudiar la biología de los patógenos que intervienen en la etiología de la enfermedad.
- Probar la patogenicidad de aquellos hongos posibles candidatos de biocontrol en la especie blanco.
- Analizar la especificidad de los hongos patógenos en plantas cercanamente emparentadas a la especie blanco.
- Seleccionar potenciales agentes patógenos de biocontrol en función de su especificidad y agresividad.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Viajes de exploración.

El estudio de los enemigos naturales (patógenos e insectos) de *Phyla nodiflora* (Verbenaceae) en el ambiente nativo se llevó a cabo en el marco de un convenio entre la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca y la Fundación para el Estudio de Especies Invasivas (FUEDEI, antes South American Biological Control Laboratory, SABCL, Buenos Aires) con el *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization* de Australia (CSIRO) para el desarrollo de los proyectos “Consultancy-Surveys for plant pathogen natural enemies of *Lippia (Phyla canescens)*”, “Surveys for and selection of plant pathogens as biological control agents for *Lippia (Phyla canescens)*”.

Se realizaron viajes de exploración y muestreo con el fin de estudiar la identidad taxonómica de las plantas hospedantes (y formas cercanas), esclarecer su distribución geográfica, como así también coleccionar sus posibles enemigos naturales (principalmente patógenos e insectos).

Los viajes abarcaron desde la provincia de Río Negro, en el sur del país, hasta las provincias fronterizas del norte. Fitogeográficamente incluyen a las provincias Pampeana, Espinal, Monte, Yungas, Chaqueña y Paranense (Cabrera, 1971).

Los viajes de recolección se planificaron y realizaron con el Dr. Alejandro Sosa (entomólogo, SABCL) y, una vez por año, durante las campañas 2007, 2009 y 2010 se incorporó el Dr. Mic Julien (CSIRO). La mayor parte de las colecciones de plantas enfermas estudiadas en esta tesis, fueron coleccionadas por G. Traversa y A. Sosa. Otras fueron aportadas por R. Delhey y otros colegas.

Los detalles de los viajes realizados (lugar, fecha, objetivos, participantes) se presentan en el Anexo 1 (Tabla 1).

## 2.2. Recolección de muestras

Se coleccionaron plantas con síntomas de enfermedad (manchas, clorosis, senescencia, canchales, pústulas) en hojas y tallos. De cada sitio donde se recogieron muestras se registró la coordenada geográfica, asignándole un número de identificación mediante un GPS (Garmin e-Trex, ver Anexo 2). La mayor parte del material que se seleccionó en el campo se acondicionó en una prensa con abundante papel de diario que se reemplazó al fin de cada jornada. Otra parte del material se transportó vivo en macetas o se colocó en bolsas de plástico humedecidas en el caso de viajes de corta duración. *A posteriori* se transportó hasta el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Agronomía (UNS) donde se lo analizó. Para la conservación del material con síntomas, se confeccionó un herbario tomando muestras representativas de cada sitio explorado. Dicho herbario ha sido incorporado al herbario de la cátedra de Fitopatología (Dto. de Agronomía, UNS).

Las distintas variedades de *Phylla nodiflora* se identificaron en el campo según sus características morfológicas. En aquellos casos en los cuales la identificación taxonómica de las plantas colectadas resultaba dificultosa se recurrió a especialistas del Instituto de Botánica Darwinion (San Isidro, Argentina) (Dres. M. E. Múlgura y N. O'Leary). Paralelamente, se estudiaron los registros del herbario de dicho Instituto a fin de visitar sitios previamente documentados con existencia de ese hospedante en Argentina.

A partir de los síntomas observados en planta se estimó la intensidad de cada enfermedad en los distintos sitios y momentos de muestreo.

### **2.3. Búsqueda de hongos patógenos**

El material recolectado del campo, en estado fresco o herborizado, se revisó macroscópicamente con lupa de mano. Los distintos órganos del material se observaron bajo lupa binocular Olympus SZ61 registrándose los síntomas y signos en cada caso. Las estructuras reproductivas fértiles se estudiaron microscópicamente.

Cuando no se observaron signos de hongos en el material vegetal o aparecieron signos leves se realizó una *cámara húmeda* con el fin de fomentar la esporulación. Para esto, se acomodaron las hojas y tallos en bandejas plásticas con el piso recubierto por algodón húmedo sobre el cual se colocó el papel absorbente. Las bandejas se colocaron dentro de bolsas plásticas a temperatura ambiente bajo luz natural (Waller, 2002). Al cabo de 24h de incubación se realizó un preparado microscópico a partir del material esporulado.

### **2.4. Identificación**

La identificación de los hongos encontrados se realizó sobre la base de la sintomatología, morfología, el comportamiento en medio de cultivo y la respuesta a distintas condiciones ambientales (luz, temperatura, etc.). Los cortes se realizaron a mano alzada con hoja de afeitar. Como medio de montaje de rutina se utilizó agua de red o hidróxido de potasio en solución acuosa al 5%. Cuando los tabiques fueron difíciles de distinguir se realizó una tinción con azul de anilina mas glicerina ácida (Waller, 2002). Las mediciones se realizaron preferentemente en materiales montados en agua. Las medidas de las estructuras morfológicas de los hongos fueron tomadas *in vivo* del material de herbario, de cámara húmeda y/o *in vitro*. Se tomaron entre 15 y 50 medidas de acuerdo a la cantidad de estructuras

fúngicas encontradas, se fotografiaron (Cámara Olympus SP 350 con adaptadores a lupa y microscopio) y se dibujaron las estructuras más importantes.

### **2.5. Aislamiento y cultivo**

Se intentó el aislamiento y cultivo de los posibles patógenos fúngicos coleccionados. Todos los procedimientos se realizaron asépticamente en cámara de flujo laminar. Se emplearon distintos medios de cultivo (ver Anexo 1). La incubación se realizó a temperatura ambiente. Para inhibir el crecimiento bacteriano se utilizó estreptomina (Ritchie, 2002) o se agregaron 2 o 3 gotitas de ácido láctico al 25% cada 15 ml de medio de cultivo (Waller, 2002).

Con el fin de eliminar la mayor cantidad de hongos saprófitos y evitar la proliferación de bacterias y otros contaminantes, antes de intentar los aislamientos, primero se lavó y desinfectó el material vegetal colectado con una solución de lavandina comercial (0,8 % cloro activo) durante 1' para el caso de hojas, tallos y pecíolos (tejidos tiernos) o mediante una solución al 2 % de cloro activo durante 2' para los tejidos leñosos. El material húmedo se secó con papel estéril antes de cortarlo (Dhingra & Sinclair, 1985).

a) Aislamiento directo: Con bisturí flameado a la llama se procedió a la disección del material, teniendo la precaución de ir desde áreas menos contaminadas hacia las más contaminadas y de tomar pequeños trozos de la zona de transición entre lo sano y enfermo. Luego el material se colocó en forma equidistante en cajas con medio de cultivo para evitar la superposición de las colonias y facilitar los repiques del hongo buscado. Cuando las colonias comenzaron a crecer, se realizó su transferencia, “repique”, por medio de un ansa estéril, a tubos con medio agarizado en pico de flauta (Dhingra & Sinclair, 1985).

b) Transferencia de conidios: A partir de cuerpos reproductivos, provenientes de hojas incubadas en cámara húmeda o de herbario, se tomaron conidios con ansa estéril depositándolos mediante suaves toques (8-12) sobre la superficie del medio agarizado. Al cabo de 24 h los conidios germinados se repicaron bajo lupa a tubos picos de flauta.

## **2.6. Ensayos de inoculación**

Para realizar estos ensayos fue necesario contar con suficiente cantidad de plantas sanas en invernáculo. Estas plantas se obtuvieron por propagación vegetativa de plantas sanas coleccionadas a campo. Se seleccionaron plantas turgentes de las cuales se obtuvieron esquejes de 3-4 nudos con hojas, los cuales fueron enterrados dejando un nudo subterráneo y 2/3 nudos en superficie. Los esquejes fueron plantados utilizando una mezcla 50:50 de sustrato orgánico Growmix y suelo tamizado (16 mesh) de textura arenosa obtenido del campo experimental del Departamento de Agronomía de la UNS. A fin de minimizar la evapotranspiración las hojas fueron cortadas a la mitad para reducir el área foliar. Los esquejes fueron mantenidos en cámara húmeda (CH), a 25°C con fotoperiodo de 12h durante 15 días a fin de conservar la turgencia de los tejidos y así evitar el marchitamiento.

Cuando fue necesario las plantas se regaron con fertilizante. Se preparó una solución madre con nitrato de calcio (50 g.L<sup>-1</sup>) más nitrato de potasio (50 g.L<sup>-1</sup>). Se tomaron 10 ml de la solución madre que luego se diluyeron en 990 ml de agua. A cada maceta se le adicionaron 5 ml de dicha solución.

En todos los métodos se utilizaron plantas de dos o tres meses de edad, las cuales fueron incubadas en cámara húmeda a 23°C durante 72 h con fotoperíodo de 12h. La cantidad y origen de plantas a inocular fueron seleccionadas según la disponibilidad de material.

## **2.7. Estudios especiales sobre *Puccinia lantanae***

El comportamiento de *Puccinia lantanae* a partir de material de herbario en cámara húmeda fue igual al observado en medio agar agua (AA), por lo tanto, se decidió utilizar este último medio en los ensayos de germinación que se describen a continuación.

Para su conservación, las hojas infectadas provenientes tanto del campo como del laboratorio se conservaron en bolsas de papel entre diarios en cámara fría a 5°C con silicagel (Smith, 2002). De esta manera se evitó que las teleutosporas germinaran.

### **2.7.1. Evaluación de la germinación de las teleutosporas**

#### **a. Condiciones estándar de incubación**

Las esporas de 20 días de edad fueron raspadas del telio de una hoja y suspendidas en un volumen de 5 ml de agua destilada estéril. De esa suspensión se tomaron alícuotas de 0,10 ml y se sembraron en cajas de Petri con agar agua (AA). Las cajas se incubaron en cámaras de crecimiento a temperaturas constantes de 5, 20, 25 y 30°C bajo un fotoperíodo de 12 horas luz UV/fluorescente. Se registró la germinación al cabo de 0, 4, 7, 11, 20, 24 y 48 horas de incubación. El ensayo se realizó por triplicado para cada combinación de temperatura y tiempo de observación. La germinación de las teleutosporas fue registrada mediante la observación con un microscopio óptico Olympus CX 31, utilizando oculares 16X y objetivo 40X. Se calculó el porcentaje de germinación de una submuestra de 50 teleutosporas, seleccionada al azar.

#### **b. Efecto del shock térmico**

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la capacidad germinativa de las teleutosporas y la producción de basidiosporas, se sometió a las esporas a un

shock térmico. Las esporas (50 por caja) fueron expuestas a 30°C durante 3 ó 6 horas, luego se incubaron a 20°C durante 21 y 18 horas respectivamente. Las cajas del tratamiento testigo se incubaron a 20°C durante 24 horas. Se registró el porcentaje de germinación a las 0, 4, 7, 11, 20 y 24 horas de incubación. La experiencia se realizó por triplicado.

### **c. Efecto del tiempo de almacenamiento**

Se evaluó el efecto del tiempo transcurrido entre la cosecha (campo o laboratorio) sobre la germinación de las teleutosporas. Teleutosporas almacenadas entre 2 y 18 meses se incubaron en AA a 20°C durante 48 horas, luego se evaluó el porcentaje de germinación. El tratamiento se realizó por triplicado.

### **2.7.2. Ensayos de inoculación**

Los experimentos de inoculación fueron diseñados en función del inóculo y los hospedantes disponibles. Los telios que se utilizaron para inocular Pn provenían tanto del campo como de plantas Pn inoculadas en el laboratorio. Se evaluó la capacidad germinativa de los mismos antes de ser utilizados en los experimentos de inoculación.

#### **a. Procedimiento: inoculación con “Discos de hoja” Morin et al (1993).**

Se cortaron 10 trocitos circulares de hoja con telios de 2 mm de diámetro, los cuales se dispusieron en forma concéntrica en una caja de AA. La base de dicha caja de Petri se selló con parafina en la zona basal agujereada de una maceta (Fig. 1, maceta superior). Las plantas (1 mes de edad) previamente rociadas se colocaron también en una maceta (Fig. 1, maceta inferior). La maceta superior se selló a la maceta inferior de manera tal que la caja de Petri quedara ubicada a 2 cm de las plantas. Este dispositivo se introdujo en una cámara de crecimiento a 20°C y en oscuridad, fotoperiodo de 12h a 23°C +/- 2°C durante 48 h.

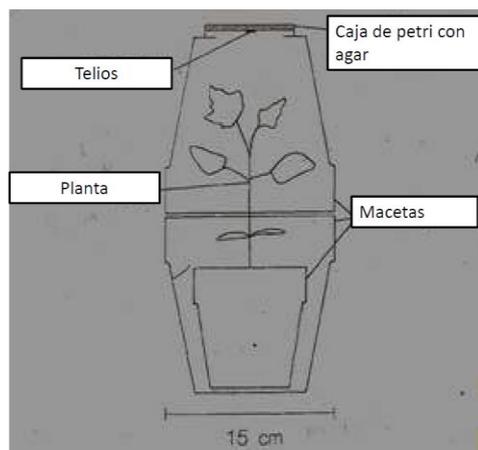


Figura 1. Cámara de inoculación (Morin et al., 1993)

## b. Evaluación

Al cabo de 15 días de la inoculación se observó periódicamente el avance de la infección en las plantas. Se contabilizaron las pústulas por planta definiendo una categoría de infección según Ellison et al. (2008):

0: sin síntomas macroscópicos.

1: clorosis.

2: entre 1-5 pústulas en hojas y tallos, infección localizada.

3: más de 5 pústulas hasta infección semi-sistémica.

## 2.8. Estudios especiales sobre *Cercospora lippiae* y *Colletotrichum* spp.

### 2.8.1. Aislamientos monospóricos

Método I. Con ansa estéril se tomaron cirros de las estructuras reproductivas del hongo creciendo en cajas de Petri con APD y se agregaron a un tubo de ensayo con 10 ml de agua destilada. Luego se transfirió 1 ml de esa solución concentrada de esporas a un tubo con 9 ml de agua destilada estéril y así sucesivamente para obtener distintas diluciones. Se realizaron diluciones hasta el momento en que se lograron observar 10 conidios con el aumento 10x. Cada dilución se dispensó en una caja con 5ml de AA (Leslie & Summerell, 2006).

Método II. Se colocó una gota de agua destilada estéril (0,1ml) en el centro de un portaobjetos estéril, por medio de un ansa se transfirieron conidios a la gota, se mezcló hasta obtener una nube de conidios. Se pipeteó una gota de la suspensión sobre la superficie de una caja de AA. Esta operación se repitió tres veces en cada caja, luego se dibujaron estrías con un ansa dispersando las gotas (Smith, 2002).

En ambos métodos las cajas se envolvieron con film y se colocaron a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\pm 3^{\circ}\text{C}$ ). Al cabo de 24h de incubación se identificaron al microscopio las esporas germinadas las que se transfirieron a tubos con APD.

### **2.8.2. Ensayos de germinación**

Se realizaron preparados microscópicos de conidios (en agua) provenientes de cultivos de un mes de edad, se colocaron en cámaras húmedas (cajas de Petri estériles y algodón húmedo selladas con parafilm). Se mantuvieron a temperatura ambiente durante 24h. Se calculó el porcentaje de germinación a partir de la observación de 50 esporas. Se consideró espora germinada cuando se observó la presencia incipiente del tubo de germinación. También se documentó la septación del conidio germinado.

### **2.8.3. Velocidad de crecimiento**

Con un sacabocado de 1 cm de diámetro se obtuvo un disco de micelio del medio de cultivo. Este disco se colocó en el centro de una caja de Petri con APD. Se midió el diámetro de la colonia cada 72 h.

### **2.8.4. Ensayos de inoculación**

#### **a. Método de Transferencia de conidios**

Se atomizaron las plantas con agua destilada con Tween 20 0,01%.<sup>1</sup> Luego, se transfirieron los conidios provenientes de caja o de cámara húmeda mediante

---

<sup>1</sup> Para obtener una solución de Tween 20 al 0,01%, se agregó una gota pequeña (20  $\mu\text{l}$ ) de Tween 20 a 200 ml de agua destilada estéril.

aguja (con agar en la punta). Se pulverizaron las plantas nuevamente con agua destilada.

#### **b. Técnica pipeta**

Se colocó una gota de agua con una masa de conidios sobre un portaobjetos. Se midió la cantidad de conidios con un hemacitómetro (ver Tabla 13). A partir del preparado, se tomaron gotas con pipeta de 1ml que se apoyaron delicadamente sobre las hojas marcando con un fibrón el lugar donde se dejaron caer. Se atomizó con agua destilada estéril.

#### **c. Suspensión de conidios**

Con la finalidad de obtener una suspensión de conidios, cajas de Petri con el hongo creciendo en APD se inundaron con 5ml de agua destilada con Tween 20 al 0,01%. Con varilla de vidrio estéril se raspó delicadamente la colonia para desprender los conidios del estroma (Beckman & Payne, 1983). La solución de conidios y/o fragmentos de micelio se filtró con gasa estéril (Médica N° 1) y el filtrado se colocó en un vaso de precipitado. Se tomó una alícuota de solución y se contaron los conidios con el hemacitómetro. Luego se atomizó la planta con una solución de concentración conocida.

### 3. Resultados

#### 3.1. Distribución de *Phyla nodiflora* en Argentina

Una de las finalidades de los viajes exploratorios fue precisar la distribución de *P. nodiflora* y sus variedades, ya que su conocimiento era esencial para comprender la distribución de los patógenos encontrados en *P. nodiflora*. Cabe aclarar que dichos viajes se realizaron antes de la publicación de O'Leary y Múlgura (2012) que detalla la distribución históricamente documentada de las tres variedades de *P. nodiflora*. Las tres variedades de *P. nodiflora* fueron halladas durante los viajes exploratorios en Argentina.

*Phyla nodiflora* var. *minor* se encontró desde la costa atlántica hasta 66°O, su límite austral de distribución fue 40°S; en cuanto a la altitud se la encontró desde el nivel del mar hasta 2100m (Jujuy). En coincidencia con O'Leary y Múlgura (2012) fue la única variedad en la vasta región patagónica y pampeana; dominó además en Cuyo, centro y el Litoral y estuvo presente en el NOA, Chaco y Formosa. *Phyla nodiflora* var. *nodiflora* sólo se encontró en las provincias de Chaco, Formosa, Jujuy, Salta y Tucumán. *Phyla nodiflora* var. *reptans* se encontró en Chaco, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Salta y Santiago del Estero (Lám. 2).



**Lámina 2.** Presencia de *Phyla nodiflora* en Argentina.

Todas las poblaciones de *Phyla nodiflora* se encontraron en áreas disturbadas como banquetas, vías del tren, en los alrededores de las ciudades, en cursos de agua, y en el césped de jardines. Esta planta crece en pequeños parches menores de 2 m de diámetro o en parches de varios metros. La mayoría de las veces se observaron numerosos parches desarrollándose en el mismo sitio como pequeñas poblaciones discontinuas. Esto ocurrió tanto en ambientes húmedos como en zonas de sequía, donde se observó a la planta creciendo en distintos tipos de suelos, arenosos, pedregosos y arcillosos.

### **3.2. Hongos encontrados en *Phyla nodiflora***

Se visitaron 220 sitios, de los cuales se recogieron 67 muestras con síntomas (Tabla 16, Anexo 2) para ser estudiadas en detalle en el laboratorio. En esas muestras se reconocieron 20 taxa fúngicos asociados con *P. nodiflora*. En la Tabla

2 se detallan los hongos encontrados, su distribución, su estado trófico y los síntomas registrados.

**Tabla 2.** Hongos asociados con plantas sintomáticas de *Phyla nodiflora* en Argentina.

Hongo	Hospedante	Hábito	Síntomas	Distribución
<i>Puccinia lantanae</i>	Pnn, Pnr,	B	Pústulas	ERI, FOR, JUJ, SAL
<i>Bipolaris spicifera</i>	Pnm, Pnr	Hb	Manchas oscuras en hoja y en tallo	BAI, JUJ, SLU
<i>Cercospora lippiae</i>	Pnm, Pnr, Pnn	Hb	Manchas en hoja	BAI, CHA, ERI, FOR, JUJ, RNE, SAL, SDE, TUC
<i>Colletotrichum</i> grupo 1	Pnm, Pnr, Pnn	Hb	Manchas en hoja circulares oscuras	BAI, FOR, SAL
<i>Colletotrichum</i> grupo 2	Pnr	Hb	Mancha circular irregular	SAL
<i>Colletotrichum</i> grupo 3	Pnn	Hb	Ampolla en hojas	CHA
<i>Pyrenophora</i> sp.	Pnm	Hb	Manchas en hojas, hojas necróticas, lesiones en tallo	BAI, JUJ, SLU
<i>Cladosporium</i> sp.	Pnm	N	Manchas en hoja	BAI, JUJ, SLU
<i>Fusarium</i> spp.	Pnm, Pnr	N	Manchas en hoja, tallos necróticos	BAI, JUJ, SAL
<i>Pestalotia</i> sp.	Pnr	N	Mancha en hoja y tallo	SAL
<i>Phoma</i> sp.	Pnm, Pnr	N	Manchas en hoja, lesiones en tallo	BAI, CHA, FOR, JUJ, SAL, SDE
<i>Phomopsis</i> sp.	Pnm	N	Manchas en hoja, lesiones en tallo	BAI, FOR, SDE
No identificado	Pnm, Pnr	N	Manchas en hoja	BAI, SAL, SDE
<i>Alternaria</i> sp.	Pnr, Pnm	S	Manchas en hoja y tallos necróticos	BAI, ERI, JUJ, SAL, SDE, SLU
<i>Epicoccum</i> sp.	Pnm	S	Manchas circulares oscuras en hoja, otras con borde oscuro	BAI
<i>Nigrospora</i> sp.	Pnm	S	Tallos y hojas necróticas	BAI, ERI
<i>Podospora</i> sp.	Pnr, Pnm	S	Manchas en hojas	BAI, SAL
<i>Sordaria</i> sp.	Pnm	S	Cancro en tallo	BAI

Referencias: Pnm: *Phyla nodiflora* var. *minor*, Pnn: *Phyla nodiflora* var. *nodiflora*, Pnr: *Phyla nodiflora* var. *reptans*, B: biótrofo, Hb: hemibiótrofo, N: necrótrofo, S: saprótrofo. BAI: Buenos Aires, CHA: Chaco, ERI: Entre Ríos, FOR: Formosa, JUJ: Jujuy, RNE: Río Negro, SAL: Salta, SDE: Santiago del Estero, SLU: San Luis, TUC: Tucumán.

En base a las observaciones en el campo y teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos, *Puccinia lantanae* y *Cercospora lippiae* fueron seleccionados para ser evaluados como posibles agentes de control biológico clásico, mientras que las

especies de *Colletotrichum* fueron elegidas como posibles agentes de control inundativo.

### 3.3. Distribución de *Puccinia lantanae*

Esta especie fue encontrada en cinco sitios pertenecientes a las provincias de Jujuy, Salta, Formosa y Entre Ríos (Lám.3), mayormente en la variedad reptans (4 sitios) y sólo en 1 sitio asociada a la variedad nodiflora Pnn (para detalles ver Tabla 2). La intensidad de ataque osciló entre baja y alta, observándose fluctuaciones muy grandes entre las distintas fechas de visita a los sitios (Tabla 3).



**Lámina 3.** Distribución geográfica de *Puccinia lantanae* en *Phyllanthus nodiflorus*.

**Tabla 3.** Colección de *Puccinia lantanae* e intensidad de la enfermedad en función del sitio y fecha de muestreo.

Sitio	Hosp	Fecha	Intensidad estimada
205. Rt 34.11 km S Pichanal. Salta.	Pnr	12 Dic 2005	Baja
		20 Jun 2007	Media
		26 En 2008	Ne
		23 Jul 2008	Baja
		30 Mar 2009	Ne
		13 Nov 2009	Ne
		22 Jul 2010	Ne
		13 En 2011	Ne
		28 Ago 2011	Media
264. Entrada del Parque Nacional Predelta, Entre Ríos	Pnr	1 Jun 2006	Ne
		24 Feb 2009	Alta
		10 Nov 2009	Ne
		10 En 2011	Ne
292. 7 km N Gral. San Martín. PN Calilegua. Jujuy.	Pnr	28 Ag 2006	Media
		11 Nov 2006	Baja
		11 Feb 2007	Baja
		20 Jun 2007	Ne
		27 En 2008	Ne
300. Dique Itiyuro. 3 km S Salvador Mazza. Salta.	Pnr	21 Jun 2007	Baja
350. Rt 81, Km 1682, 60 km NO Guillermo Juárez Formosa.	Pnn	24 Jul 2008	Alta
		22 Feb 2009	Ne
		12 Nov 2009	Ne
		17 Feb 2010	Ne
		22 Jul 2010	Ne
		12 En 2011	Ne

Ne: no se encontró roya.

### 3.4. Descripción de *Puccinia lantanae*

Se observaron teleutosoros en forma de pústulas almohadilladas, de hasta 4 mm de diámetro, castañas, descubiertas, agrupadas en círculos, principalmente en el envés de las hojas. Se observó que las hojas muy afectadas eventualmente se necrosaban, produciéndose defoliación (Lám. 4).

Cuando existían condiciones de alta humedad, se registró la germinación de las teleutosporas, observándose los soros cubiertos por una masa hialina constituida por las hifas de germinación, los promicelios (o metabasidios) y las basidiosporas.



**Lámina 4.** Síntomas de infección a campo producidos por *Puccinia lantanae*.

Se observaron dos tipos de teleutosporas (Tabla 4 y Lám. 5). Las unicelulares subglobosas, obovoides a elipsoidales, 17-28,5 x 13,5-23  $\mu\text{m}$ . Las bicelulares elipsoidales a clavadas, constrictas en el tabique, 23-36 x 12-23  $\mu\text{m}$ ; con cierta frecuencia se observaron esporas bicelulares con el tabique oblicuo resultando en una forma doblada de la espora. Pared finamente ornamentada, del tipo M “pseudoreticulado” de Cummins & Hiratsuka (1983); grosor de la pared 1,5-2  $\mu\text{m}$  en la zona lateral, hasta 5-7  $\mu\text{m}$  en la apical. Pedicelo persistente, fusco, a veces insertado excéntricamente en la base de la espora. Basidiosporas (*in vitro*) hialinas, ovaladas a cortamente elipsoidales (Lám. 6).

**Tabla 4.** Comparación del tamaño y de la cantidad de teleutosporas unicelulares y bicelulares de *P. lantanae* según los distintos orígenes de roya encontrados en el campo e inoculados artificialmente.

Hospedante	Origen roya	Infección	Teleutosporas				
			Unicelulares			Bicelulares	
			%	Largo (µm)	Ancho (µm)	Largo (µm)	Ancho (µm)
Pnr	205	Natural	70	18,5-28	12,5-15,5	18,5-34,5	12,5-22
		Artificial*	Nd	15,5-24,5	12,5-18,5	24,5-31	15,5-21,5
	292	Natural	74	22-24,5	12-16	30,5-32	14
	264	Natural	69	17-28,5	13,5-23	23-36	12-33
Pnn	350	Natural	75	15,5-24,5	12,5-18,5	20-30	12,5-24,5
		Artificial	Nd	18,5-31	12,5-21,5	21,5-30,8	12,5-18,5

\*El origen de la planta inoculada coincide con el de la roya.

### 3.5. Estudios experimentales en *Puccinia lantanae*

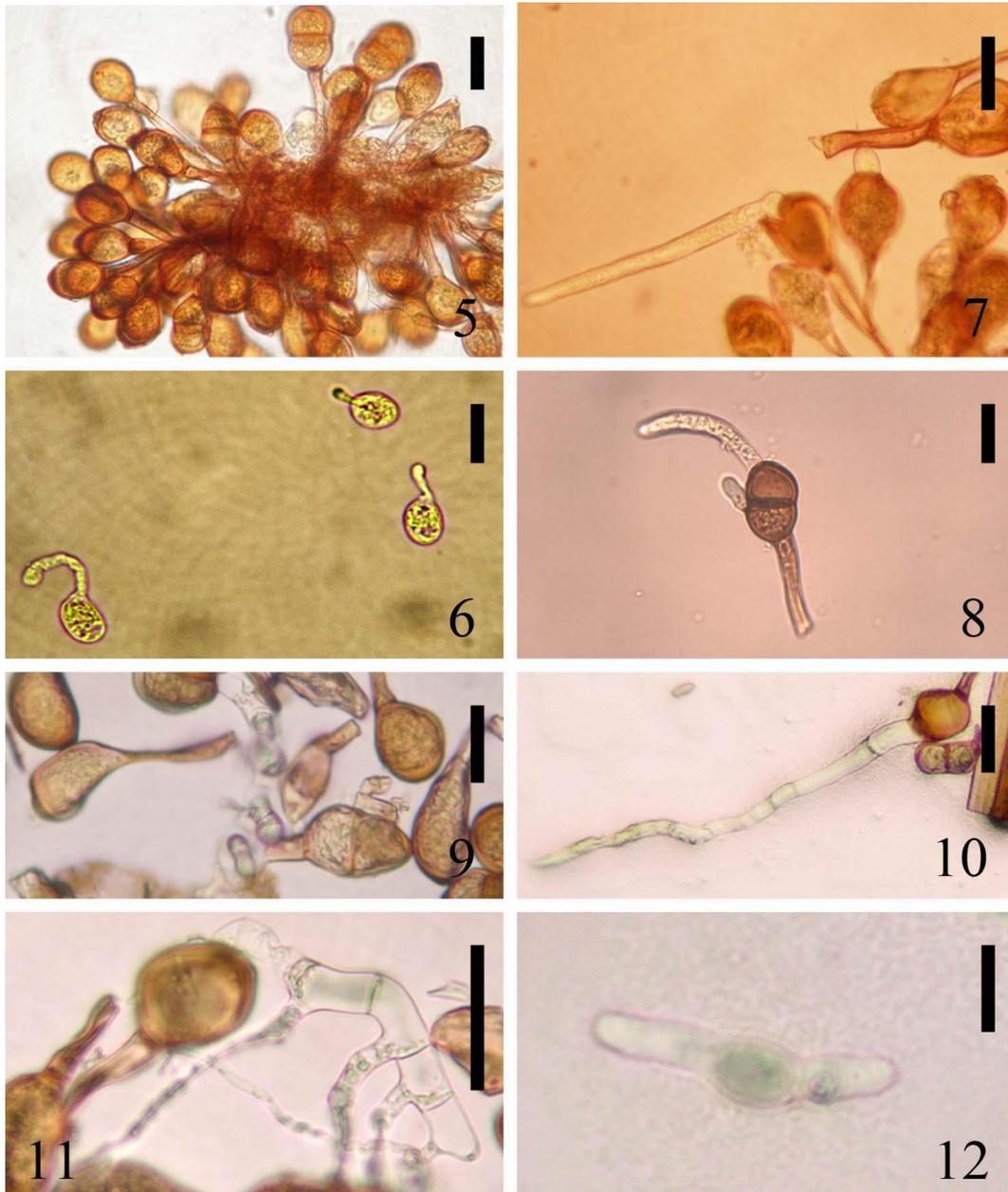
#### A. Ensayos de germinación

##### a) Estimación de la germinación de teleutosporas, formación de metabasidios y basidiosporas bajo diferentes condiciones.

En los estudios experimentales, se observaron dos procesos: (i) germinación de la teleutospora con generación de tubo germinativo, y (ii) formación de metabasidio mediante tabicamiento transversal y aparición de basidiosporas. De acuerdo a lo observado, no todas las teleutosporas germinaron y no todas las hifas germinativas formadas desarrollaron un metabasidio con basidiosporas.

La germinación de las teleutosporas se inició en un lapso de tiempo comprendido entre las primeras cuatro y siete horas de incubación (Tabla 5). Los tubos germinativos emergieron a través de los poros preformados en la parte apical de las teleutosporas unicelulares y en la célula distal de las bicelulares (Láminas 7 y 8). En las esporas bicelulares se observó la formación de tubos germinativos en

una o ambas células. En algunos casos se observó la ramificación de las hifas germinativas que siguieron creciendo, con frecuencia sin desarrollar metabasidios. Las primeras basidiosporas se formaron en los esterigmas después de 11 horas de incubación a 20°C. A esta temperatura se desarrolló una alta cantidad de metabasidios cerca del poro germinativo (Lám. 9), es decir, se formaron muy pronto luego de la germinación. A medida que aumentó la temperatura, 25°C y 30°C se observó una mayor proporción de tubos germinativos largos, que se alejaban del poro germinativo (Lám. 10). También se observaron metabasidios anchos con largos esterigmas que aparentemente no formaban basidiosporas (Lám. 11). La mayor parte de las basidiosporas observadas germinaron unidas al esterigma o cerca del mismo. También se registró la formación de basidiosporas con dos tubos germinativos (Lám.12).

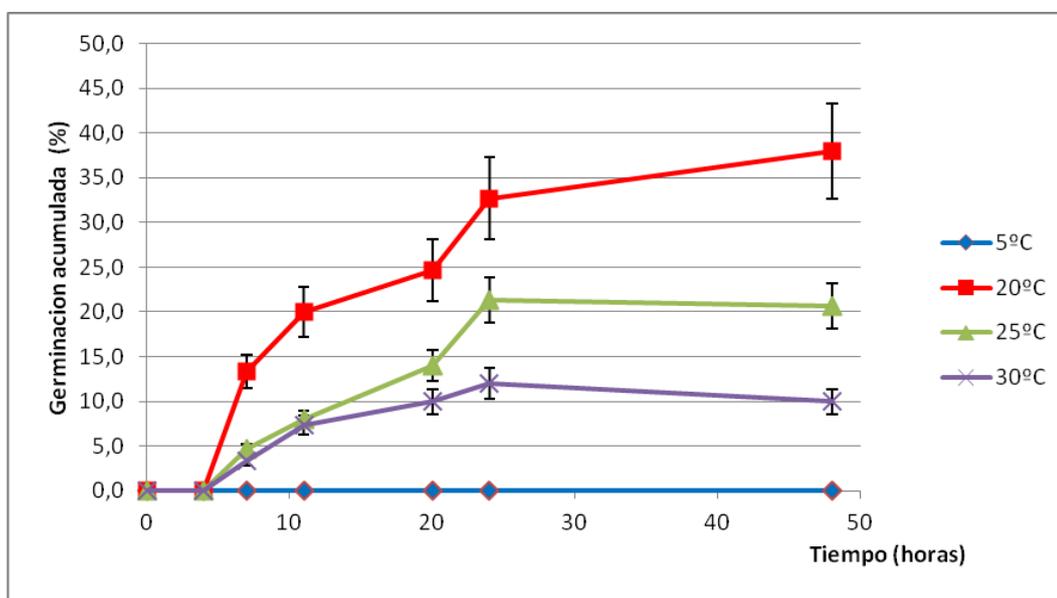


**Láminas 5-12.** *Puccinia lantanae*. 5. Grupo de teleutosporas unicelulares y bicelulares. 6. Basidiosporas. 7. Tubo germinativo emergiendo de teleutospora unicelular. 8. Tubo germinativo emergiendo de teleutospora bicelular. 9. Formación de metabasidios. 10. Tubos germinativos largos. 11. Esterigmas estériles. 12. Una basidiospora con dos tubos germinativos. Barra escala 5, 7, 8, 9, 10 y 11= 20  $\mu\text{m}$ ; 6 y 12= 10  $\mu\text{m}$ . 5-11, Objetivo 40x. 12, Objetivo 100x.

**Tabla 5.** Germinación de teleutosporas de *Puccinia lantanae* bajo diferentes condiciones de temperatura y tiempos de incubación (% promedio de germinación de 50 teleutosporas).

		Tiempo de incubación (horas)						
		0	4	7	11	20	24	48
Temperatura (°C)	5	0	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	13,3	20	24,7	32,7	38
	25	0	0	4,7	8	14	21,3	20,7
	30	0	0	3,3	7,3	10	12	10

Ninguna teleutospora germinó a 5°C; a los 20°C, 25°C y 30°C se alcanzó un *plateau* de germinación luego de 24 horas de incubación, el cual tuvo distinto nivel de acuerdo a la temperatura del tratamiento (Fig. 2).

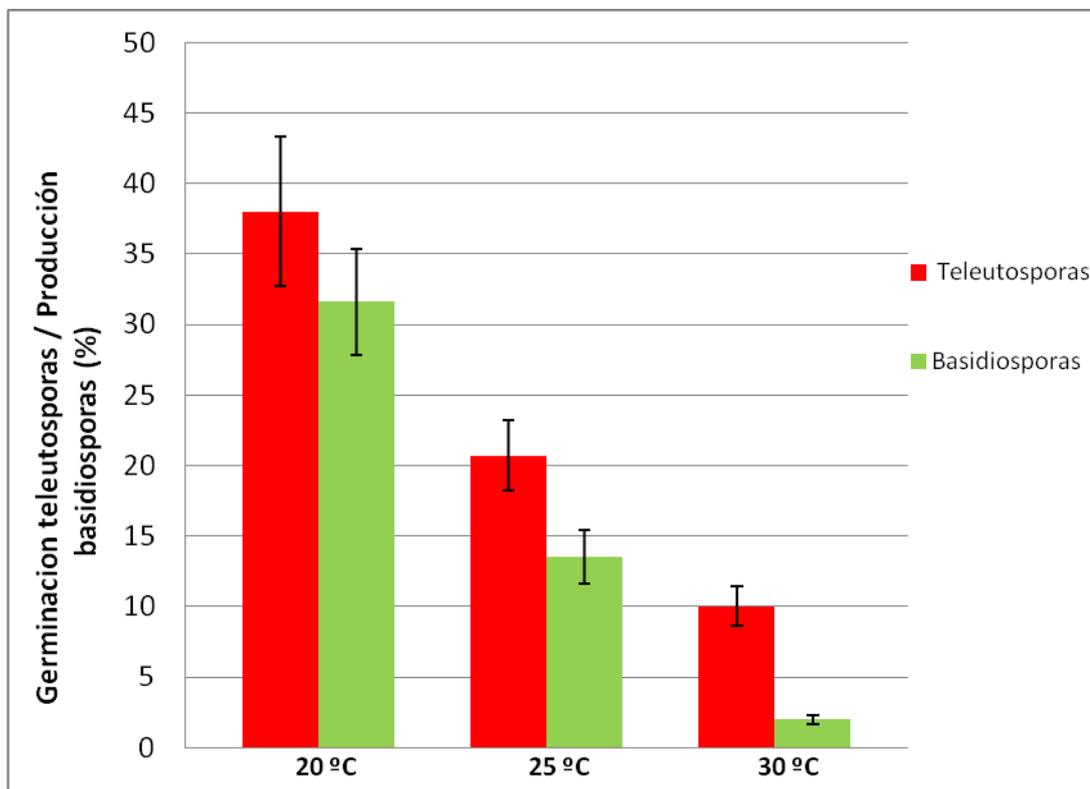


**Figura 2.** Germinación acumulada de teleutosporas de *P. lantanae* en función de la temperatura y tiempo de incubación. Barras indican ES.

Las teleutosporas incubadas a 20°C evidenciaron la mayor velocidad y el máximo porcentaje final de germinación. A 30°C se obtuvieron los menores porcentajes de germinación.

En el mismo experimento se determinó el porcentaje de las teleutosporas germinadas que produjeron basidiosporas a 20°C, 25°C y 30°C (Fig. 3). Se observó que a 20°C casi todas las teleutosporas que germinaron formaron

metabasidios y produjeron basidiosporas. A medida que aumentó la temperatura disminuyó el porcentaje de germinación y se redujo drásticamente la producción de metabasidios y basidiosporas.



**Fig. 3.** Porcentaje de germinación de teleutosporas y producción de basidiosporas. Barras indican ES.

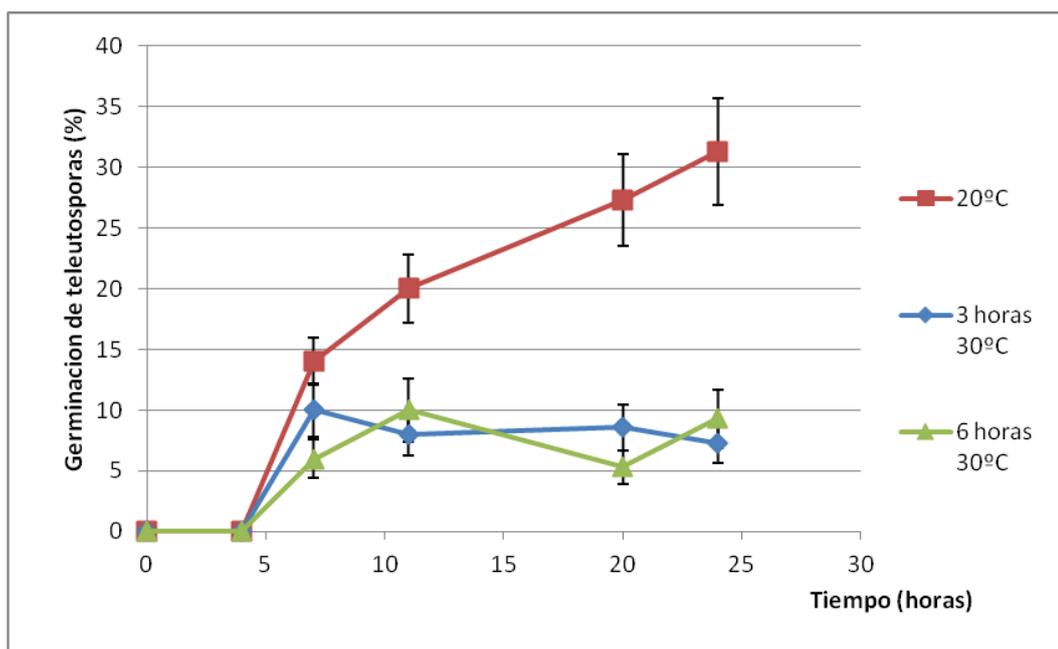
#### **b) Efecto del shock térmico sobre la germinación de las teleutosporas**

Paralelamente, se evaluó el efecto de las altas temperaturas (shock térmico) sobre la capacidad germinativa de las teleutosporas. Una incubación a 30°C durante tres horas fue suficiente para provocar un descenso significativo en la germinación de las teleutosporas comparado con el testigo a temperatura óptima (20°C) (Tabla 6).

**Tabla 6.** Porcentaje de germinación de las teleutosporas sometidas a distintos tratamientos de shock térmico: incubadas a 20°C durante 24 horas (testigo), 3 horas a 30°C + 21 horas a 20°C o 6 horas a 30°C + 18 horas a 20°C.

Tiempo (horas)	0	4	7	11	20	24
20°C	0	0	14	20	27,3	31,3
3 horas a 30°C	0	0	10	8	8,6	7,3
6 horas a 30°C	0	0	6	10	5,3	9,3

El máximo porcentaje de germinación de teleutosporas sometidas al tratamiento térmico fue de un 10%. A 20°C los porcentajes de germinación de las teleutosporas (Fig. 4) fueron similares a los obtenidos en el ensayo anterior (ver Fig. 2).

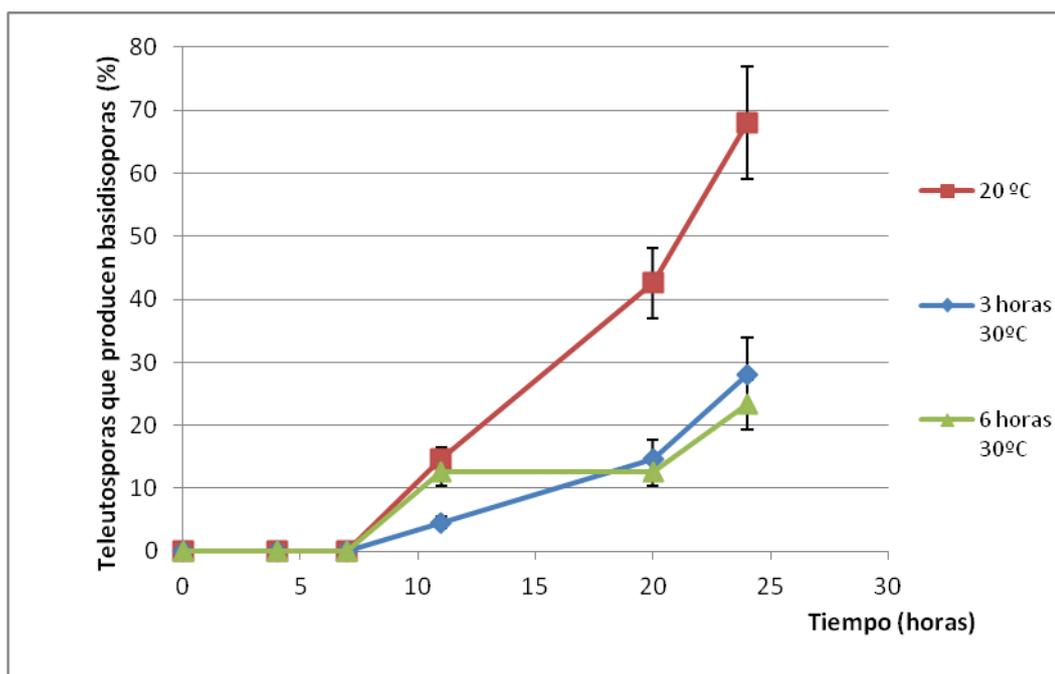


**Figura 4.** Germinación acumulada de teleutosporas de *P. lantanae* en función del tratamiento de shock térmico. Barras indican ES.

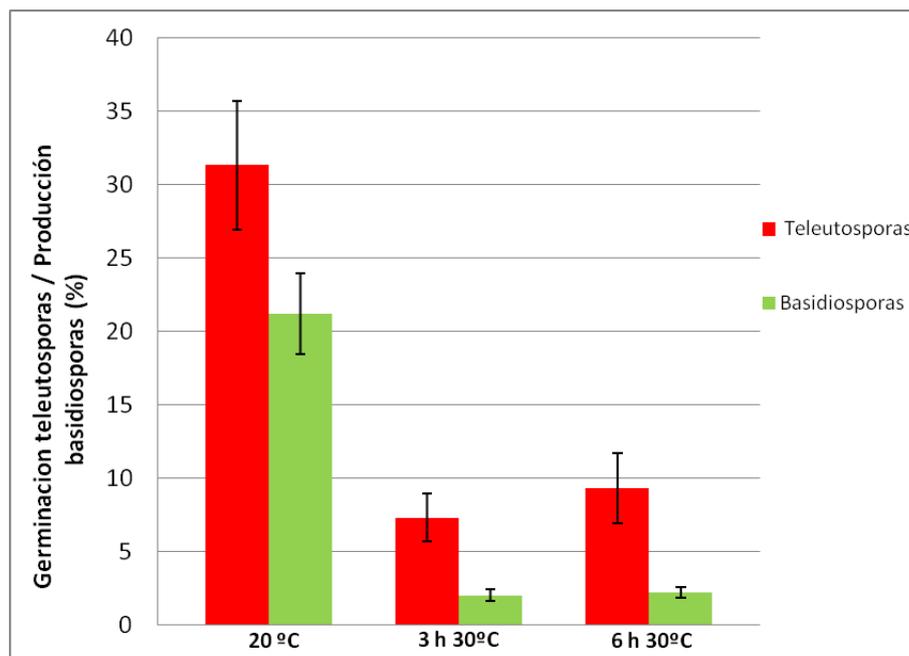
En todos los tratamientos de shock térmico se registró una disminución considerable en la producción de basidiosporas respecto al testigo (Tabla 7, Figs. 5 y Fig. 6).

**Tabla 7.** Formación de basidiosporas por teleutosporas (expresado en %) sometidas a distintos tratamientos de shock térmico a 30°C (exposición/tiempo de incubación)

Tiempo de incubación (horas)	0	4	7	11	20	24
20°C (testigo)	0	0	0	14,6	42,6	68
3 horas a 30°C	0	0	0	4,6	14,6	28
6 horas a 30°C	0	0	0	12,6	12,6	23,3



**Figura 5.** Porcentaje de teleutosporas de *P. lantanae* que producen basidiosporas en función del tratamiento de shock térmico. Barras indican ES.



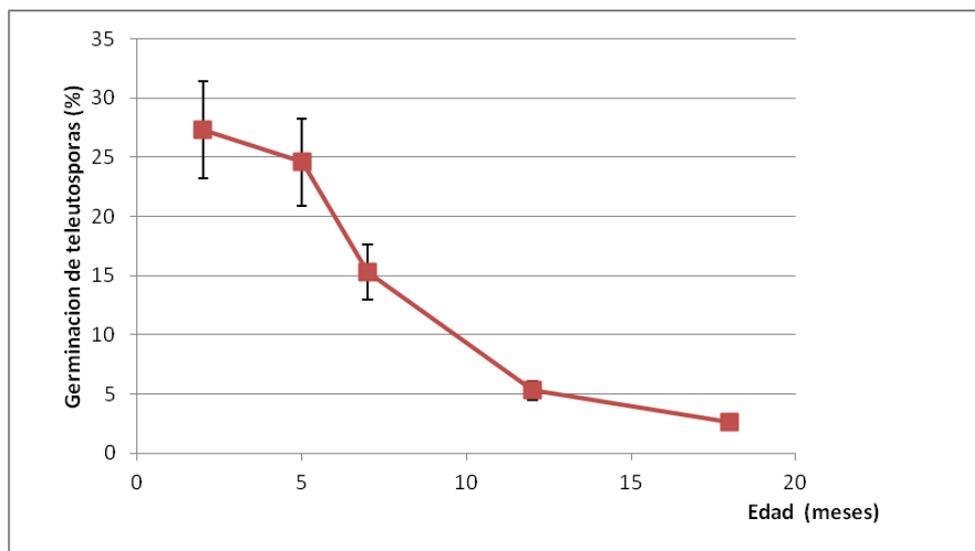
**Figura 6.** Efecto del shock térmico sobre el porcentaje de germinación de teleutosporas y producción de basidiosporas. Barras indican ES.

### c) Efecto del almacenamiento sobre la germinación

El almacenamiento tuvo un efecto negativo sobre la germinación de las teleutosporas, registrándose una disminución cercana al 50% a los 7 meses (respecto al testigo sin almacenamiento, ver Tabla 8) y mayor al 90% a los 18 meses (Fig. 7).

**Tabla 8.** Germinación promedio de teleutosporas luego de distintos tiempos de almacenamiento (sobre 50 teleutosporas, luego de 48 h de incubación a 20°C).

Tiempo de almacenamiento	2 meses	5 meses	7 meses	12 meses	18 meses
Germinación (%)	27,3	24,6	15,3	5,3	2,6



**Figura 7.** Porcentaje de germinación de las teleutosporas de *P. lantanae* en función de la edad del inoculo. Barras indican ES.

### **B. Ensayos de inoculación**

En los experimentos de inoculación artificial se observaron infecciones semisistémicas, con síntomas de engrosamiento del tallo a lo largo de varios centímetros y la formación de brotes axilares engrosados, con tintes rojizos y proliferación de teleutosporas. En general cuando se observaron síntomas, estos aparecieron 15-20 días después de inoculadas las plantas. Inicialmente se desarrollaron manchas cloróticas. Luego aparecieron pequeñas pústulas en el envés de las hojas como puntos color herrumbre rodeados por un halo clorótico. Más tarde se observó un hundimiento rojizo en el haz acompañado por clorosis y en el envés se desarrollaron telios en forma concéntrica.

Siguiendo los criterios de Ellison et al. (2008), se distinguieron 4 comportamientos o tipos de reacción luego de la inoculación: (0) plantas sin síntomas, (1) formación sólo de manchas cloróticas, (2) clorosis y bajo nivel de esporulación (infección localizada con 1-5 pústulas) y (3) elevada intensidad de la enfermedad (más de 5 pústulas hasta infección semisistémica).

Los resultados de las inoculaciones (método de discos de hoja) para plantas de las tres variedades de *Phyla nodiflora* con teleutosporas provenientes de distintos sitios de muestreo se detallan en la Tabla 9. Se puede resumir que la cepa de *P. lantanae* obtenida de Pnn (R350n) logró infectar a plantas de las tres variedades de *P. nodiflora*: Pnn, Pnm y Pnr y la cepa obtenida de Pnr (R205r) a plantas de Pnr y Pnm.

**Tabla 9.** Resultados de las inoculaciones con *Puccinia lantanae* en *Phyla nodiflora* (método discos de hoja).

Experimento	Inóculo original	inoculado en	Reacción				Pls. inoc. (N)
			0 <sup>1</sup>	1	2	3	
1	R205r <sup>2</sup>	Pnr205 <sup>3</sup>	0	0	6	0	6
2	R205r	Pnr292	2	0	0	4	6
		Pnr205	0	0	3	0	3
3	R205r	Pnr292	0	0	0	7	7
		Pnr205	0	0	0	7	7
		Pnm345	6	0	1	0	7
4	R350n	Pnr292	2	0	0	1	3
		Pnm345	2	0	1	0	3
		Pnn350	0	0	3	0	3
5	R264r	Pnm345	0	3	0	0	3
		Pnn258	3	0	0	0	3
		Pnr264	3	0	0	0	3
6	R350n	Pnn258	0	4	0	0	4
		Pnn350	0	2	0	0	2
7	R205r	Pnr205	5	0	1	0	6
8	R350n	Pnn258	2	0	0	0	2
		Pnn350	2	0	0	0	2
9	R205r	Pnr205	2	0	1	0	3
10	R350n	Pnn350	3	0	0	0	3
11	R205r	Pnr205	0	0	2	0	2
		Pnm345	0	2	0	0	2
		Pnm92	0	2	0	0	2
12	R205r	Pnr205	2	0	1	0	3

1) Reacción 0: sin síntomas; 1: clorosis, 2: entre 1-5 pústulas en hojas y tallos, infección localizada, 3: más de 5 pústulas hasta infección semisistémica.

2) Cepa del hongo, ejemplo: R205r significa cepa de Roya (R) encontrada originalmente en el sitio 205 sobre plantas de Pnr

3) Plantas inoculadas, ejemplo: Pnr205 significa *Phyla nodiflora reptans* obtenida de sitio 205

Se evaluó también el éxito de la inoculación en función del tiempo de almacenamiento de las teliosporas (medido en semanas de almacenamiento a

5°C). Se consideró exitoso a las plantas con reacción 2 ó 3. A partir de las 4 semanas se observó una importante disminución en la capacidad infectiva, perdiéndose esta totalmente en las teliosporas de 56 o más semanas (Tabla 10).

**Tabla 10.** Estimación del éxito de la inoculación en función del tiempo de almacenamiento del inóculo.

Edad del inóculo (semanas)	Experimento	Plantas con síntomas (2 ó 3)	%
1	3	15/21	71
2	2, 4	12/18	67
3	1, 9	7/9	78
4	5	3/9	33
8	11	2/6	33
20	12	1/3	33
48	6, 7	1/12	8
56	8	0/4	0
72	10	0/3	0

### 3.6. Distribución de *Cercospora lippiae*

*Cercospora lippiae* Ellis & Everh. (Capnodiales, Dothideomycetes, Ascomycota) fue encontrada en 20 sitios pertenecientes a las provincias de Buenos Aires, Chaco, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Rio Negro, Salta, Santiago del Estero, Tucumán, en Pnn (5 sitios), Pnm (11 sitios) y Pnr (4 sitios) (Lám. 13). El hongo fue aislado de plantas sintomáticas de 9 sitios (Tabla 11).



**Lámina 13.** Distribución geográfica de *Cercospora lippiae* en *Phyla nodiflora*.

### 3.7. Descripción de *Cercospora lippiae*

Manchas foliares circulares a irregulares, de tamaño diverso, pardo oscuras a grises, a veces con tintes rojizos, típicamente de borde difuso. Estas manchas se expandían, limitadas finalmente por la nervadura o llegando hasta el borde de la hoja (Lám. 14). Hojas cloróticas y necróticas; con defoliación. Manchas similares se observaron en pecíolos y tallos.



**Lámina 14.** Síntomas de infección por *Cercospora lippiae*.

Se observaron estromas subcuticulares pequeños, los conidióforos emergentes eran fasciculados, de color pardo claro, 12,5-71 x 3-4,5  $\mu\text{m}$ , rectos o geniculados, tabicados, sin ramificar, con 1-2 cicatrices apicales. Conidios subhialinos, filiformes, 2-8 septados, 20-188 x 3  $\mu\text{m}$  (Lám.15).



**Lámina 15.** Conidios de *Cercospora lippiae*. Barra escala= 10  $\mu\text{m}$ .

La variación en las dimensiones de los conidióforos y conidios de las distintas poblaciones del hongo estudiadas se muestra en la Tabla 11. En esta lista sólo se han incluido los casos donde positivamente se ha constatado la presencia del hongo ya sea por la observación de conidios o por el aislamiento a partir de los síntomas.

**Tabla 11.** Características de *Cercospora lippiae* de diversas poblaciones

Sitio	Prov.	Fecha	Hosp.	Intens.	Conidióforos <sup>1</sup>	Conidios <sup>1</sup>	aislado
11	BAI	21/3/06	Pnm	alta	35,5-61 x 3-4	43,5-103 x 3 (22-53 x 3)	si
204	JUJ	12/12/05	Pnr	alta	ND <sup>2</sup>	ND	no
221	RNE	3/2/06	Pnm	baja	ND	28-128 x 3	no
258	CHA	29/5/06	Pnn	baja	ND	28-62,5 x 3	no
262	ERI	31/5/06	Pnm	alta	ND	25-87,5 x 3	no
284	BAI	28/12/06	Pnm	alta	ND	15,5-37,5 x 3	no
287	FOR	11/1/11	Pnm	ND	ND	ND	no
294	TUC	29/3/09	Pnn	ND	ND	ND	si
295	TUC	29/3/09	Pnn	alta	18,5-40 x 3	21,5-80 x 3	si
299	SAL	21/6/07	Pnr	baja	ND	18,5-43 x 3	no
345	BAI	17/11/05	Pnm	baja	15,5-22 x 3	25-94 x 3	no
352	FOR	11/1/11	Pnm	ND	ND	ND	no
390	SDE	29/3/09	Pnm	ND	ND	(20-86 x 3)	si
391	SAL	29/3/09	Pnr	ND	(21,5-74 x 3-5,5)	34-154 x 3 (30-172,5 x 3)	si
403	TUC	31/3/09	Pnm	alta	18,5-40 x 4,5-6 (18,5-61,5 x 4,5-6)	18,5-67,5 x 3	si
405	SDE	1/4/09	Pnm	alta	(12,5-71 x 3-4,5)	18,5-71 x 3 (21,5-108 x 3)	si
440	FOR	23/7/10	Pnn	alta	20,5-45 x 3-4,5	18,5-89,5 x 3	si
441	FOR	23/7/10	Pnr	ND	ND	ND	no
443	FOR	23/7/10	Pnn	ND	ND	ND	no
Ensenada	BAI	7/5/09	Pnm	alta	15,5-34 x 3	20-188 x 3	si

1) Largo y ancho, en  $\mu\text{m}$ ; datos sin paréntesis = in planta, con paréntesis = in vitro

2) ND = no hay datos

### 3. 8. Estudios experimentales en *Cercospora lippiae*

En medio de cultivo, se observaron colonias de crecimiento lento con centro blanco y borde gris oscuro, a veces con tintes verdosos, que se desarrollaron en bandas concéntricas (Lám.16).



**Lámina 16.** Aspecto de una colonia de *Cercospora lippiae* en medio de cultivo.

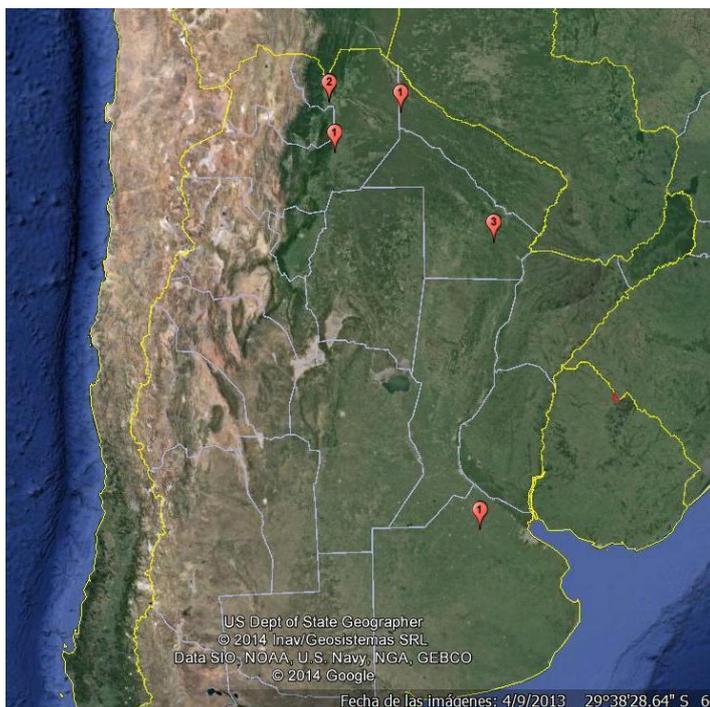
El aislado 11 esporuló abundantemente en los medios APD con ácido láctico y agar zanahoria decocción. Los aislados 294, 295, 391, 403 y 405 esporularon en diversos medios (V8, agar hoja zanahoria, APD con ácido láctico y agar hoja phyla). No se obtuvo esporulación con los aislados 440 y Ensenada.

Se realizaron inoculaciones con el aislado 11 (Pnm). En las hojas inoculadas por el método suspensión de conidios, en Pnm (345) y Pnr (205 y 292) se observó necrosis, amarillamiento y esporulación. De las mismas se reaisló *C. lippiae*. Síntomas similares, pero sin esporulación, aparecieron en 258 (Pnn), inoculada

por transferencia de conidios. No se observaron síntomas en plantas de Pnm (345 y 92) inoculadas por el método de micelio.

### 3.9. Distribución de *Colletotrichum* spp.

Especímenes con síntomas y signos de antracnosis se recolectaron de cinco sitios de muestreo (Lám. 17). En todos los casos se aislaron hongos del género *Colletotrichum*.



**Lámina 17.** Distribución geográfica de *Colletotrichum* spp. en *Phyllanthus nodiflorus*.

Actualmente, la taxonomía del género *Colletotrichum* está siendo revisada (Damm com. pers.). Ante esta situación consideramos más apropiado presentar las descripciones con una asignación abierta. Estamos en contacto con una de las especialistas del género, Ulrike Damm (Senckenberg Museum of Natural History Görlitz), para resolver la identificación en el futuro cercano.

De acuerdo a su similitud, se distinguieron **tres grupos**:

**1:** integrado por los aislados 186, 277 y 350. Se los adjudicó tentativamente al complejo de *Colletotrichum gloeosporioides*, *sensu* Weir et al. (2012).

2: aislado 205. Adjudicado al complejo *Colletotrichum truncatum* s.lat. (Damm et al., 2009).

3: aislado 259. Este hongo difiere de las especies descriptas, por lo que podría tratarse de una nueva especie del género *Colletotrichum*.

En todos los casos las descripciones morfológicas presentadas se basan en las estructuras fúngicas observadas en cultivo *in vitro*.

### 3.10. Descripción de *Colletotrichum* spp.

#### A. Grupo 1

##### a. Distribución

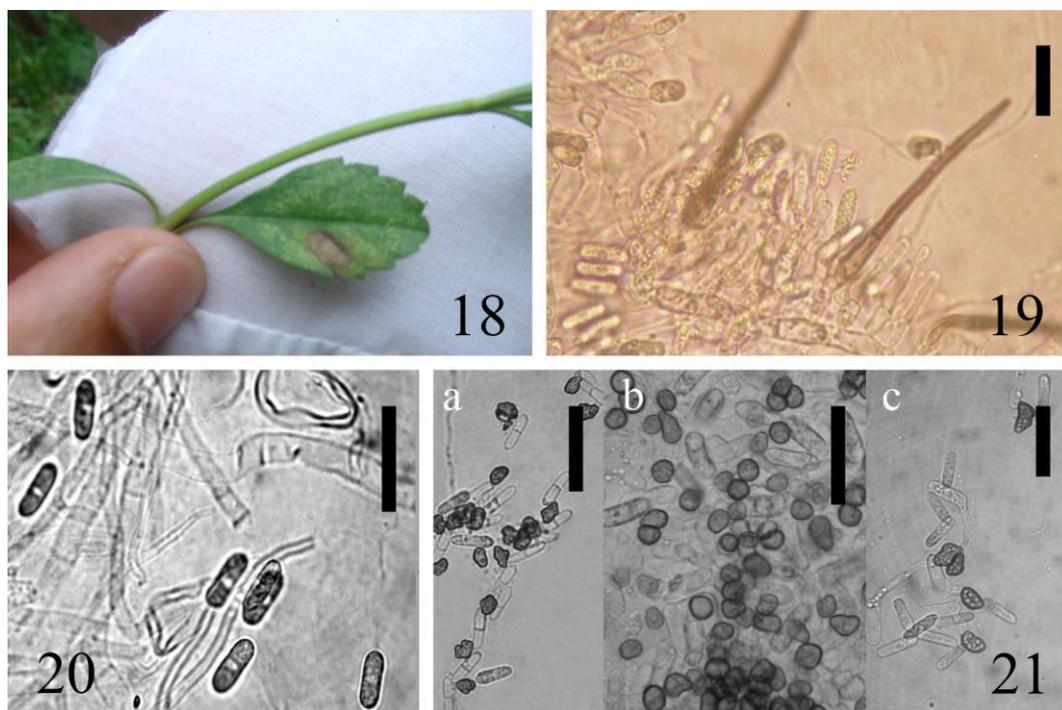
La precedente descripción se refiere a la infección hallada sobre una población de Pnm, en Silveyra, provincia de Buenos Aires (sitio 186). Las poblaciones de Pnr (sitio 277, Parque Nacional El Rey, Salta) y de Pnn (sitio 350, Guillermo Juárez, Formosa) también mostraron infección de un *Colletotrichum*, con síntomas, comportamiento cultural y morfología similar al n° 186 (Tabla 12). En todos los casos, la intensidad de la enfermedad fue baja. Es de particular interés que en el sitio 350, las plantas simultáneamente sufrieron un fuerte ataque de roya (*Puccinia lantanae*).

**Tabla 12.** Características de *Colletotrichum* spp. aislados de *Phyla nodiflora*

Sitio	Prov	Hospedante	Conidios			Setas	Apresorios	Grupo
			Forma	Medidas	Tabique			
186	BAI	Pnm	recto	9-18 x 2,5-4	1	62,5- 156 x 3	4,5-15,5 x 3-6	1
277	SAL	Pnr	recto	9,5-20,5 x 3-6	1	46-83 x 3	3-12,5 x 3-6,5	1
350	FOR	Pnn	recto	13-19 x 3-5	1	-	7,5-12,5 x 4,5-9	1
205	SAL	Pnr	falcado	18,5-28 x 2,5-4	1	64,5- 132,5	6-15,5 x 4,5-15,5	2
259	CHA	Pnn	falcado	9,5-28 x 3-6	1	90,5- 203	6-15,5 x 6-12,5	3

### b. Descripción.

Manchas foliares circulares con borde oscuro y centro claro, de hasta 3 mm de diámetro (Lám. 18). No se observaron acérvulos en hojas. Se logró aislar el hongo y las colonias obtenidas desarrollaron un denso micelio gris verdoso oscuro con el micelio aéreo gris claro teniendo la colonia una estructura sectorial. Se observó formación de estromas blandos y de estructuras acervulares con setas oscuras, con las células basales más claras,  $62,5-156 \times 3 \mu\text{m}$  (Lám. 19). Conidios cilíndricos rectos hialinos,  $9-15.5 \times 2,5-4$ , gutulados, con los extremos redondeados, la parte basal estrechándose levemente hacia la punta, con un tabique transversal luego de la germinación (Lám. 20). Apresorios de forma y tamaño muy variables, desde elipsoidales, claviformes a muy irregulares, frecuentemente con contornos angulares,  $4,5-15,5 \times 3-6 \mu\text{m}$ ; a veces formando estructuras complejas (Lám. 21).



**Láminas 18-21.** *Colletotrichum* grupo 1. 18. Aspecto de mancha foliar. 19. Acérvulo, se observan setas, células conidiógenas y conidios. 20. Detalle de

conidios. 21. Apresorios. (Sitios de colección a: 186, b: 277, c: 350). Barra escala 19 a 21= 20  $\mu\text{m}$ .

### **c. Ensayos de inoculación**

Se realizaron inoculaciones (método pipeta) del aislado 186 (Pnm) en plantas de la población 345 (Pnm) así como del aislado 277 (Pnr) en plantas de 205 (Pnr). En ambos casos se logró infección y se reaisló el hongo inoculado.

## **B. Grupo 2**

### **a. Distribución**

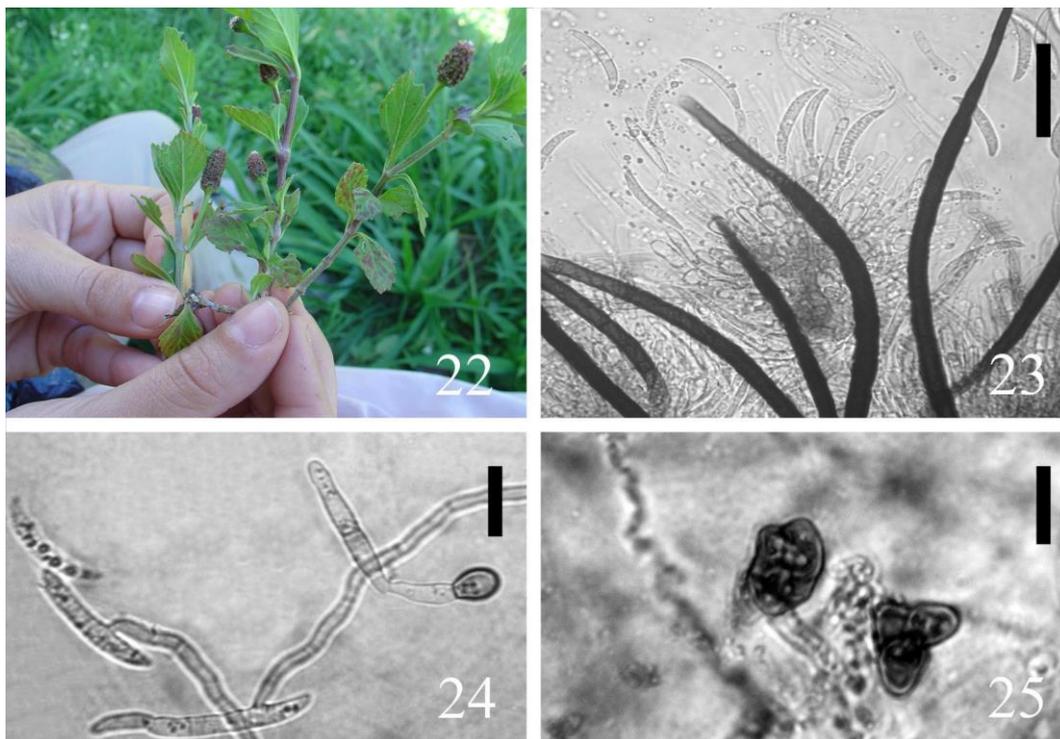
Este hongo se halló sobre Pnr, en Pichanal, Salta, sitio 205. Las plantas de la población sufrieron simultáneamente un ataque leve de roya (*Puccinia lantanae*). La intensidad de las manchas asociadas con *Colletotrichum* fue baja.

### **b. Descripción**

Manchas foliares oscuras angulares, hasta 5 mm, sin acérvulos (Lám. 22). En medio de cultivo, micelio gris oscuro levemente verdoso, con micelio aéreo gris claro. Formación de acérvulos bien definidos (Lám 23). Setas oscuras 64,5-132,5  $\mu\text{m}$ . Conidios falcados, fusoides, con los extremos puntiagudos, en la base algo más redondeado, 18,5-28 x 2,5-4  $\mu\text{m}$ , gutulados, formando un tabique transversal luego de la germinación (Lám. 24). Apresorios globosos, obovoides, elipsoidales, lobulados (guante de box) a irregulares, a veces formando complejos, 6-15,5 x 4,5-15,5  $\mu\text{m}$  (Lám. 25).

### **c. Ensayos de inoculación**

Este aislado se inoculó (método pipeta) en plantas de Pnr, del mismo sitio 205, y en plantas de Pnm del sitio 345. En ambos se desarrollaron síntomas de infección y se recuperó al hongo inoculado.



**Láminas 22-25.** *Colletotrichum* grupo 2. 22. Síntomas. 23. Detalle de acérvulo. 24. Conidio germinado con tabique y formación de apresorio. 25. Detalle de apresorios. Barra escala 23 = 20  $\mu\text{m}$ , 24, 25 = 10  $\mu\text{m}$ .

### **C. Grupo 3**

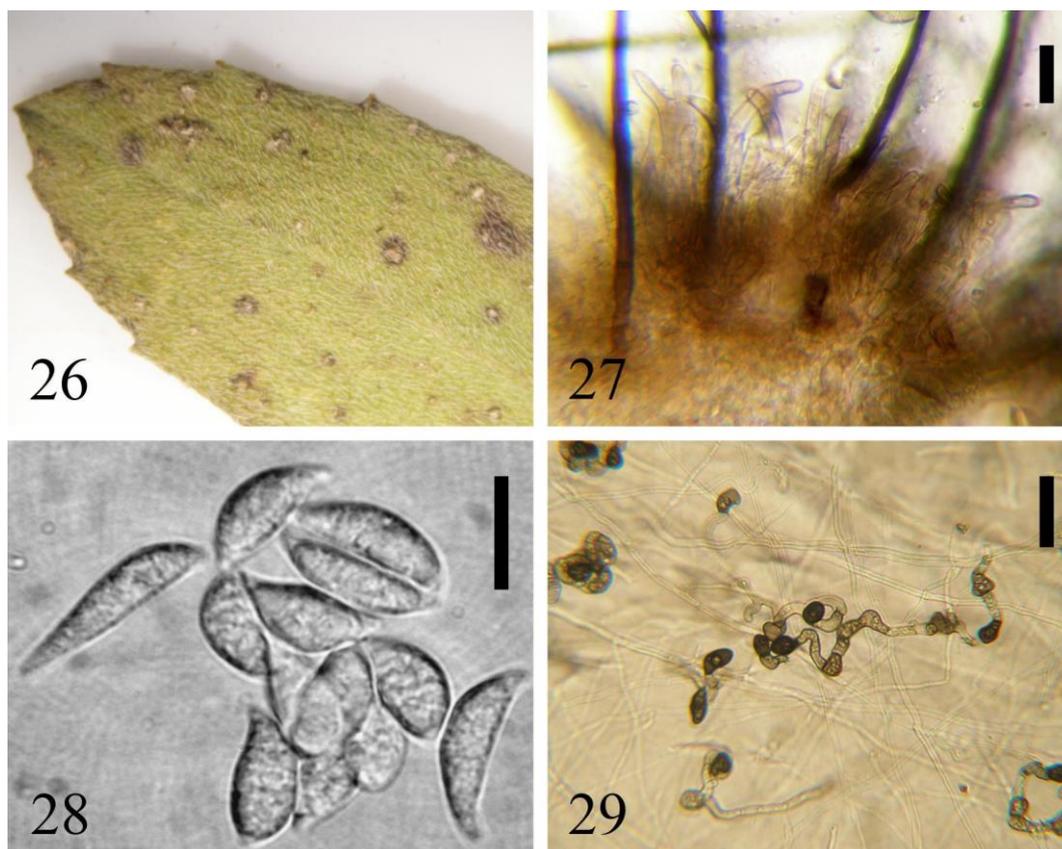
#### **a. Distribución**

Se halló sobre Pnn, en Makallé, Chaco, sitio 259, con una alta intensidad de ataque.

#### **b. Descripción**

Manchas foliares circulares a irregulares necróticas casi negras, hasta 3 mm, con la parte central elevada blancuzca (Lám. 26). Colonias en medio de cultivo de crecimiento lento, micelio aéreo floculoso, en el principio blancuzco, luego gris oscuro. Se formaron acérvulos con abundantes setas oscuras, 90,5-203  $\mu\text{m}$  (Lám. 27). Conidios subhialinos a levemente verdosos, sumamente variables en forma y tamaño; los más pequeños subglobosos a ovoides; los más grandes asimétricos,

con un lado recto a levemente curvado en forma cóncava o convexa, el otro lado curvado en forma convexa, ambos extremos terminando en punta, 9,5-28 x 3-6  $\mu\text{m}$ ; con superficie algo granulosa, con un tabique transversal luego de la germinación (Lám. 28). Apresorios obovoides, elipsoidales, claviformes, a veces lobulados, 6-15,5 x 6-12,5  $\mu\text{m}$  (Lám. 29).



**Láminas 26 a 29.** *Colletotrichum* grupo 3. 26. Síntomas en hoja. 27. Detalle de acérvulo. 28. Conidios. 29. Apresorios. Barra escala 27, 29 = 20  $\mu\text{m}$ , 28 = 10  $\mu\text{m}$ .

### c. Ensayos de inoculación

Las plantas inoculadas (método Pipeta) de Pnr 205 desarrollaron necrosis foliar que avanzaba desde la punta hacia la base. A pesar de que no se observaron

estructuras reproductivas en las plantas inoculadas, se reaisló el *Colletotrichum* inoculado.

Se evaluaron características culturales y el porcentaje de germinación de los conidios de los aislados recuperados (Tabla 13).

**Tabla 13.** Características culturales de aislados de *Colletotrichum* obtenidos de *Phyla*.

Aislado	Velocidad de crecimiento de la colonia (cm/día)	Producción de conidios <i>in vitro</i> (conidios por ml) en medio líquido	Porcentaje de germinación de conidios
<i>Colletotrichum</i> 1 (186)	2	2,7x10 <sup>4</sup>	62
<i>Colletotrichum</i> 1 (350)	2	3,9 x10 <sup>4</sup>	45
<i>Colletotrichum</i> 1 (277)	2	7,8 x10 <sup>4</sup>	29
<i>Colletotrichum</i> 2 (205)	2	5,8x10 <sup>4</sup>	35,5
<i>Colletotrichum</i> 3 (259)	2	3,4 x10 <sup>4</sup>	58

#### 4. Discusión

La roya *Puccinia lantanae* fue el único organismo biotrófico encontrado sobre *Phyla nodiflora*. Los restantes taxa fúngicos hallados fueron estadios teleomórficos o anamórficos de ascomicetes. De estos, siete eran parásitos esencialmente hemibiótrofos, siete fueron clasificados como necrótrofos y cinco como saprótrofos. Los agentes seleccionados como posibles controladores fueron *P. lantanae*, *Cercospora lippiae* y *Colletotrichum* spp.

*Puccinia lantanae* Farl. (Pucciniales, Basidiomycota) es una roya microcíclica. Fue identificada por primera vez en *Lantana odorata* L. (Farlow, 1883). De acuerdo al concepto específico aquí adoptado (*vide* Lindquist, 1982), entre sus

sinónimos se cuentan *Puccinia accedens* Syd., *P. privae* Syd., *Uromyces lantanae* Speg. y *U. lippiae* Speg. Spegazzini (1909) describió *Uromyces lippiae* (hoy sinónimo de *P. lantanae*) como “Ad folia *Lippiae canescens* ad marginis Río Sora, Salta, Apr. 1905”. Dado que *Lippia canescens* Kunth. es uno de los sinónimos de *Phyla nodiflora* var. *minor* (“*Phyla canescens*”) (según O’Leary & Múlgura, 2012), es posible que el espécimen estudiado por Spegazzini pertenezca a cualquiera de las otras variedades de *P. nodiflora* presentes en la zona del río Sora, ubicado en realidad en la provincia de Jujuy y no en la de Salta, como Spegazzini dice erróneamente. En el viaje realizado en agosto del 2006 a esa localidad, no se encontraron, sin embargo, plantas de *Phyla* en ese sector (Sosa et al., 2008a). Previamente esta roya había sido registrada en *Lippia dulcis* (Cuba y Sudamérica), en *Lippia stoechadifolia* (Norte y Sudamérica), así como en otras especies de los géneros *Lantana* y *Lippia* (Jackson 1932; Viégas, 1961; Lindquist & Da Costa 1963; Lindquist 1982; Schmiedeknecht 1984; Farr et al., 1989). En Argentina, según Spegazzini (1909, 1923, 1925), Lindquist (1982) y Hernández y Hennen (2002), el rango de distribución geográfica de *P. lantanae* (sobre varios hospedantes) abarcaba las provincias de Buenos Aires, Entre Ríos, Corrientes, Misiones, Tucumán y Salta.

La intensidad de la enfermedad en el campo fue muy variada, hasta en ciertos momentos, llegar a desaparecer. Esto pudo deberse a las condiciones de sequía registradas durante el período de muestreo (2005-2011). Según lo observado, la ausencia de la roya también estaría relacionada con la presencia de insectos y otros factores de disturbio de origen antrópico (desmonte, quema, asentamientos rurales). Las royas al ser parásitos obligados necesitan plantas sanas para alimentarse.

Los estadios de aecios y uredos no se conocen para esta especie (Lindquist, 1982; Barreto et al., 1995). En esta roya se observan dos tipos de teleutosporas, uni y bicelulares. Las unicelulares fueron siempre las más abundantes (entre 69 y 75%). Koutsidou (2000), sobre *Lantana camara*, registró mayor dominancia de teleutosporas unicelulares (96%), mientras que en los aislados de *P. nodiflora* el promedio fue de 72%.

Spegazzini (1909) también menciona las unicelulares como el tipo dominante, con un rango de tamaño similar al aquí observado (22-24 x 18-19  $\mu\text{m}$ ). El tamaño de las teleutosporas (en especial las del aislado 205) coincidió con el descrito originalmente por Farlow (1883). Teleutosporas bicelulares de mayor tamaño, aunque de ancho de pared similar, fueron descritas por Lindquist (1982) en *L. camara* (hasta 42  $\mu\text{m}$  long.).

Con respecto a los ensayos de germinación, los resultados fueron similares a los obtenidos por Koutsidou (2000) a partir de un aislado peruano de *P. lantanae* proveniente de *Lantana camara*. Si bien Koutsidou (2000) observó que la germinación de las teleutosporas se iniciaba anticipadamente, dentro de las primeras 3 horas de incubación, el porcentaje final de germinación a temperatura óptima fue menor al registrado en esta tesis (38%).

En los experimentos realizados, la temperatura óptima de germinación de las teleutosporas (aislado 205) fue de 20°C, a mayor temperatura (25°C) los porcentajes de germinación disminuyeron. En cambio Koutsidou (2000) determinó una temperatura óptima de germinación de 24°C. Estos resultados son esperables al comparar un aislado de origen subtropical como el nuestro con uno tropical. Las diferencias hasta aquí expuestas entre los aislados de *P. nodiflora* y el estudiado por Koutsidou (2000) sugieren la existencia de dos subespecies de *P.*

*lantanae*. Para establecer con certeza la existencia de posibles diferencias genéticas entre ambos se requerirá la realización de estudios moleculares comparativos.

En el aislado 205 como en otras *Puccinia* spp., se observó producción del tubo germinativo tanto desde el poro ubicado en la célula apical como a partir de ambas células simultáneamente, en coincidencia con Morin et al. (1992) y Koutsidou (2000). Basidios anchos con largos esterigmas que no producían basidiosporas fueron observados al igual que en Morin et al. (1992).

En coincidencia con lo observado por Gold & Mendgen (1991), las basidiosporas germinaron en pocas horas, por medio de tubos de germinación o formando basidiosporas secundarias. Una aberración citológica común en basidiosporas de algunas royas es su germinación aún unidas al basidio (p.e. en *Uromyces appendiculatus*, *vide* Gold & Mendgen, 1984). Esta germinación *in situ* de basidiosporas también se observó en algunos aislados de *P. lantanae* (p.e. el 205). En algunas ocasiones también se formaron dos tubos de germinación al igual que en *Gymnoporangium yamadae* (Fukushi, 1925).

En la literatura se menciona la delicada y frágil constitución de las basidiosporas, la cual afecta la supervivencia de las mismas durante la cosecha (Morin et al., 1992). Inoculaciones con basidiosporas de *P. lantanae* en *Justicia procumbens* resultaron en un bajo porcentaje de producción de telios (Ono, 2002). Otros autores (Ellison et al., 2004; Evans & Ellison 2005; Morin et al., 1993, Hasan, 1991; Parker et al., 1994) mencionan métodos de inoculación utilizando teleosporas de *Puccinia* spp. microcíclicas que han resultado exitosos. Infecciones muy severas se han conseguido, por ejemplo, utilizando el método de adherir hojas infectadas con *P. xanthii* a hojas sanas (Julien et al., 1979b). El

método “discos de hoja” utilizado en el presente estudio simula mejor lo que ocurre en la naturaleza, donde la inoculación se produce por la descarga natural de basidiosporas. El éxito de la inoculación con dicho método dependería de las especies de *Phyla* inoculadas, la procedencia y edad del inóculo.

El método de conservación de las teleutosporas utilizado permitió la supervivencia de las mismas por más de un año, pero con la edad del inóculo se observó un descenso importante en la germinación. Anikster (1986) trabajando con teleutosporas de varias especies de *Puccinia* - otras que *P. lantanae* - preservadas en seco a 2-4°C determinó que las mismas eran capaces de retener buena capacidad germinativa por el plazo de un año, perdiendo progresivamente dicha capacidad hasta hacerse nula luego de tres años.

Las teleutosporas de edad avanzada (48-72 semanas) mostraron una baja capacidad germinativa, lo que se tradujo en una muy baja infección en el control positivo. Se infiere que los telios de edad avanzada pierden capacidad de germinación, probablemente debido a condiciones de stress (ácaros, hiperparásitos) durante el almacenamiento.

A altas temperaturas (30°C) las teleutosporas produjeron tubos de germinación largos, sin producción de basidiosporas. Asimismo, resultaron permanentemente dañadas luego de los tratamientos de shock térmico. Similares observaciones consigna Koutsidou (2000). El mismo efecto observaron Morin et al. (1993) en *P. xanthii*. Se infiere que temperaturas iguales o mayores a 30°C serían altamente perjudiciales para la supervivencia de las teleutosporas. Desprez-Loustau (1986) determinaron, además, que temperaturas entre 30 y 32°C producían la muerte de las basidiosporas.

Para la roya objeto de la presente investigación, será necesario estudiar el estado nuclear del micelio que se forma a partir de tubos largos para conocer su capacidad efectiva de infección, si éste es una hifa abortiva o si da lugar a micelio dicariótico, con posibilidad de formar telios.

Estudios en *Puccinia lantanae* realizados por Barreto et al. (1995) en Brasil y por Rentería & Ellison (2004) en Perú, sugieren su uso como posible agente de control biológico de la maleza *L. camara*. En la presente tesis, los aislamientos con los que se realizaron los ensayos experimentales de infección no mostraron igual especificidad respecto a las variedades de *Phyla nodiflora*, la cepa R350n infectó a plantas de las tres variedades de *P. nodiflora*, mientras que la cepa R205r fue infectiva sólo frente a plantas de las variedades reptans y minor. Esto reforzaría la hipótesis de la existencia de dos subespecies de *P. lantanae*.

Obviamente la falta de especificidad no es un atributo deseable para un agente de control biológico clásico, teniendo en cuenta que, hasta el momento, en Australia se busca preservar la variedad nodiflora. Por ello, sólo podría considerarse como agente la cepa R205r.

Respecto a *Cercospora lippiae*, es el patógeno más ampliamente difundido en el país en *Phyla nodiflora*, encontrándose en ambientes semiáridos a húmedos en la eco-región Pampeana, norte de la Patagonia, Yungas y la región del Chaco Seco y Húmedo. Este hongo se adapta a condiciones climáticas muy diferentes, aunque varias especies de *Cercospora* se ven beneficiadas por condiciones de alta humedad relativa (Alderman & Beute, 1986). Se observó la presencia de viruela en casi todos los meses del año. La intensidad de la enfermedad fluctuó entre niveles bajos y altos indistintamente de la estación del año.

En los aislados estudiados de *C. lippiae*, se observó que sucesivos repiques produjeron micelio estéril. Esta situación ya había sido mencionada para *Cercospora zae-maydis* por Beckman & Payne (1983). De manera similar a lo observado por Kilpatrick & Johnson (1956), en los casos donde hubo esporulación, los conidios fueron abundantes en el borde de la colonia.

Al igual que en otras especies de *Cercospora*, en *C. lippiae* el nivel de esporulación varió de acuerdo al medio de cultivo utilizado. Kilpatrick & Johnson (1956) observaron abundante cantidad de conidios en medios confeccionados con zanahoria. Por su parte, Jones (1958) obtuvo esporulación de *C. kikuchii* a partir de un medio elaborado con tejido del hospedante. En *C. lippiae*, el agar hoja zanahoria y el agar hoja phyla favorecieron la esporulación. Contrariamente a lo observado por Beckman & Payne (1983) en *C. zae maydis*, el medio AP con ácido láctico favoreció la esporulación en los distintos aislados de *C. lippiae*.

El estudio de las especies de *Cercospora* en el laboratorio reviste una tarea muy laboriosa, dado las dificultades encontradas para lograr su esporulación e inoculación. Por este motivo, se descarta su uso como un agente micoherbicida.

De acuerdo a los experimentos de inoculación realizados, *C. lippiae* fue bastante inespecífica, el aislado obtenido de *P. nodiflora minor* produjo síntomas en las tres variedades, siendo recuperado de la variedad *minor* y de la variedad *reptans*. Esta falta de especificidad impediría su utilización como agente de control biológico clásico, siempre y cuando quede establecida la variedad *nodiflora* como especie nativa en Australia.

En cuanto a *Colletotrichum*, Hyde et al. (2009) plantean la dificultad inherente a la tarea de identificación de especies en este género. La alta plasticidad fenotípica

que presentan los aislamientos ha llevado a resultados controversiales e inciertos de identificación (Sutton, 1992)

En el presente estudio se determinaron en forma preliminar las especies de *Colletotrichum* aisladas de *Phyla*. De acuerdo a las características morfológicas estudiadas, se las identificó como *Colletotrichum truncatum* s.lat. (Damm et al., 2009), *Colletotrichum gloeosporioides*, sensu Weir et al. (2012) y una posible nueva especie. Los materiales se enviaron a una micóloga especialista del género (Ulrike Damm, Senckenberg Museum of Natural History Görlitz) para confirmar el status establecido.

En la mayor parte de los sitios la intensidad de ataque de la enfermedad causada por *Colletotrichum* spp. fue baja. En dos de estos sitios se encontró roya en la misma población de plantas. Al igual que en *Puccinia xanthii* (Morin et al., 1993), *P. lantanae* podría modificar la fisiología de las células del hospedante tornándolas susceptibles a *Colletotrichum* spp.

No se posee información acerca de la especificidad de los aislados de *Colletotrichum* spp. Debido a esto no pueden ser tenidos en cuenta como agentes de biocontrol clásico. Sin embargo, existen suficientes antecedentes para considerar *Colletotrichum* spp. como agentes de control biológico con un enfoque inundativo (Jensen, 1991). Sería importante realizar un relevamiento de los hongos que atacan *Phyla nodiflora* en Australia. Si se encontraran especies de *Colletotrichum* endémicas, deberían profundizarse los estudios en este sentido. Luego sería posible hacer comparaciones para seleccionar el aislamiento de Argentina o el de Australia, según su efectividad para desarrollarlo como bioherbicida.

## Capítulo III

# ESTUDIOS DE PATÓGENOS DE *Alternanthera philoxeroides*

### 1. Introducción

*Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. (Amaranthaceae), lagunilla, es una planta perenne que tolera un amplio rango de condiciones ambientales y se encuentra distribuida en distintos hábitats. Es nativa de la región húmeda pampeana y de la zona del río Paraná en Argentina. Se extiende a países vecinos, Paraguay, Uruguay abarcando las cuencas de Bolivia y Brazil. Se ha convertido en una maleza exótica en más de 30 países (Holm et al., 1997).

En la Argentina, la lagunilla posee tres formas taxonómicas: *A. philoxeroides* f. *philoxeroides*, *A. philoxeroides* f. *angustifolia* Suess. (Pedersen, 1999) y una intermedia provisionalmente denominada “Santa Fé” (Sosa et al., 2004). Existen pequeñas poblaciones de tetraploides fértiles y hexaploides fértiles, pero la mayoría son hexaploides estériles. Las formas fértiles producen semillas viables y plántulas en el campo (Sosa et al., 2008b). Estudios citogenéticos en Argentina confirman que estas tres formas y la especie cercanamente emparentada *A. aquatica* (D. Parodi) Chodat comparten al menos un tercio de sus cromosomas y por lo tanto forman un complejo de híbridos (E. Greizerstein, com. pers.). También se confirmó que el citotipo hexaploide que invadió Australia era un híbrido estéril que se propaga por clones y fragmentación. (Sosa et al., 2008b). Análisis genéticos sugieren la presencia de múltiples introducciones desde Argentina a Australia (D. Gopurenko, com. pers.).

En Australia, como en otros lugares, es una planta con estolones de hábito terrestre, semiterrestre y/o acuático. Como acuática crece enraizada cerca del borde del cuerpo del agua, en el sustrato debajo del agua o como redes de matas flotantes de tallos internamente huecos que desarrollan raíces. Estas matas pierden la conexión al sustrato y se vuelven independientes y móviles (Julien, 1995).

Las matas flotantes compiten con otras especies acuáticas, restringen la penetración de la luz, el flujo del agua, la flotación y causan condiciones anaeróbicas. Los fragmentos de estas matas pueden contaminar pasturas y cultivos (van Oosterhout, 2007). Esta maleza es palatable para el ganado pero produce fotosensibilidad resultando en lesiones en la piel, daño en el hígado y muerte (Bourke & Rayward, 2003). Conocida en Australia con el nombre vulgar de “Alligator weed” forma densos monocultivos que compiten y desplazan la vegetación nativa de la ribera. Zonas agrícolas con riego corren peligro de ser totalmente invadidas por lagunilla.

Esta planta resiste periodos de estrés hídrico durante el verano, también tolera inviernos fríos y hasta severas heladas que matan los tallos emergentes (Julien & Broadbent, 1980).

La remoción física puede erradicar infestaciones pequeñas, nuevas y aisladas. Sin embargo esto también puede dispersar fragmentos de la planta mediante la maquinaria y el movimiento del suelo contaminado que es transportado fuera del área de infección. Las infestaciones de lagunilla deberían recibir aplicaciones de herbicidas antes de ser controladas físicamente. Estudios muestran que metsulfuron-metil es el herbicida más efectivo en ambientes terrestres y acuáticos (van Oosterhout, 2007), aunque esta maleza en general no es afectada por

herbicidas. Muchos sólo queman la porción apical sin afectar viejos tallos y rizomas (Sainty et al., 1998).

En 1960 Vogt (USDA) realizó muestreos en Sudamérica con el fin de coleccionar enemigos naturales de *A. philoxeroides* (Vogt, 1973). Algunos de estos insectos fueron liberados en USA, el escarabajo *Agasicles hygrophila* Selman & Vogt en 1964, *Amynothrips andersoni* O'Neill en 1967 y la polilla *Arcola malloi* Pastrana en 1971. En los 70 el escarabajo y la polilla fueron liberados en Australia, hacia 1980 en Nueva Zelanda, y luego el escarabajo se liberó en Tailandia y China (Julien & Griffith, 1999). *Agasicles hygrophila* y *A. malloi* contribuyeron con el control de lagunilla acuática en USA (Buckingham, 2002), en Australia (Julien et al., 1979a) y China (Wang, 1989), pero este control sólo fue exitoso en regiones cálidas.

En Australia, el agente clave de control de la maleza fue *Agasicles*. Investigaciones en USA (Coulson, 1977) y en Australia (Julien et al., 1995) demuestran que “alligator weed” posee una mayor tolerancia climática que *Agasicles*. El control biológico de *A. philoxeroides* ha sido exitoso en zonas acuáticas con inviernos benignos pero no ha sucedido lo mismo en el ambiente terrestre (Sainty et al., 1998). Luego de la introducción de un insecto (*Disonycha argentinensis* Jacoby) que falló en establecerse en Australia se concluyó que esta maleza aún no ha sido controlada (Burgin et al., 2010).

A pesar de que no se han realizado viajes exploratorios sistemáticos en búsqueda de patógenos de lagunilla en Argentina, existe alguna información al respecto. Según Frezzi (1956), *Pythium debaryanum* R. Hesse y *P. irregulare* Buisman causarían podredumbre de raíces y muerte de plantas adultas de *Alternanthera* sp. en Tucumán. Además, *Wilsoniana bliti* (Biv.) Thines (roya blanca) se encontró

en *A. paronychioides* A. St.-Hil. en Buenos Aires y en *Alternanthera* sp. en Tucumán y Salta (Spegazzini, 1891; Spegazzini, 1898-99). Barreto & Torres (1999) hallaron dos patógenos en Brazil infectando lagunilla, *Alternaria alternantherae* Holcomb & Antonopoulos y *Cercospora alternantherae* Ellis & Langl.. *Alternaria alternantherae* también fue citada en Australia (Gilbert et al., 2005), USA (Holcomb, 1978) y China (Xiang et al., 2002). En Australia este hongo está siendo estudiado como un potencial micoherbicida (Gilbert et al., 2008). Otros hongos con el mismo potencial son investigados en China, por ejemplo *Colletotrichum* sp. (Tan & Gu, 1993) y *Fusarium* sp. (Tan et al., 2002). Una enfermedad causada por un virus fue citada ocasionando daño en *A. philoxeroides* en Florida (Hill et al., 1972).

Dos royas pertenecientes al género *Uredo* fueron citadas en *A. philoxeroides*, una proveniente de Bolivia, *Uredo pacensis* Lindq. (Lindquist, 1957), y otra de Guatemala *Uredo nitidula* Arthur (Arthur, 1920). Para Argentina, Lindquist (1982) cita a la roya macrocíclica autoica *Puccinia mogiphanis* Arthur sobre *Alternanthera* aff. *lanceolata* (Benth.) Schinz y *A. paniculata* Kunth, así como a la roya microcíclica *P. stuckertii* Speg. sobre *A. albida* (Moq.) Griseb. En Ecuador se registró la presencia de *Uredo alternantherae* H.S. Jacks. & Holw. en *A. paniculata* (Jackson, 1927) y en Perú en *A. elongata* (Willd.) Schinz (Laundon, 1965). Otras especies de roya han sido citadas en distintas especies de *Alternanthera* en Sudamérica (Viégas, 1961).

**Hipótesis específica:** Hongos patógenos de *A. philoxeroides* pueden ejercer un eficiente control biológico sobre su hospedante.

### Objetivos específicos

- Estudiar la distribución geográfica de las enfermedades en las poblaciones de plantas
- Describir los síntomas observados en el campo. En ocasiones donde sea posible asociar un hongo con un síntoma, estimar incidencia y/o severidad de la enfermedad
- Aislar, cultivar in vitro (si es posible) e identificar los hongos hallados.
- Probar la patogenicidad de aquellos hongos posibles candidatos de biocontrol en la especie blanco.

## **2. Materiales y Métodos**

El estudio de los enemigos naturales (patógenos e insectos) de *Alternanthera philoxeroides* (Amaranthaceae) en el ambiente nativo se llevó a cabo en el marco de un convenio entre la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca y la Fundación para el Estudio de Especies Invasivas (FUEDEI, antes South American Biological Control Laboratory, SABCL, Buenos Aires) con el Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization de Australia (CSIRO) para el desarrollo del proyecto “Estudio preliminar. Búsqueda y estudio de patógenos asociados con *Alternanthera philoxeroides*”

Los detalles de los viajes realizados (lugar, fecha, objetivos, participantes) se presentan en el Anexo 1 (Tabla 14).

La metodología aplicada para el estudio de los hongos encontrados en esta maleza fue la misma que la descrita en el Capítulo 2 para *P. nodiflora*.

### 3. Resultados

#### 3.1. Distribución de *Alternanthera philoxeroides*

Se encontró en Argentina y Bolivia. Esta planta se localizó en provincias del Noroeste argentino, tales como Salta, Tucumán y Santiago del Estero. Así como también en Chaco, Formosa, Misiones, Buenos Aires y Norte de Santa Fe (Lám. 30).



**Lámina 30.** Distribución geográfica de *Alternanthera philoxeroides*.

#### 3.2. Hongos encontrados en *Alternanthera philoxeroides*

Se registraron 16 patógenos, 15 hongos s.l. y un virus, sobre las plantas de lagunilla colectadas (Tabla 15).

Además de los hongos identificados como patógenos, se registraron síntomas y signos asociados con diversos hongos en poblaciones de lagunilla. En su mayoría se trataba de saprótrofos y necrótrofos, con una amplia dominancia de *Fusarium*

spp., seguido por *Alternaria* spp. y *Phomopsis* spp. Dados los objetivos de la investigación, no se intentó identificar a los hongos involucrados. En dos ocasiones se observaron síntomas de mosaico lo que sugiere la presencia de virus como patógenos de lagunilla.

Sobre la base de las observaciones en el campo y teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos, se seleccionaron *Uredo pacensis*, *Wilsoniana bliti* y *Alternaria* sp. para ser evaluados como posibles agentes de control biológico clásico, mientras que las especies de *Colletotrichum* fueron elegidas como posibles agentes de control inundativo.

**Tabla 15.** Hongos asociados con lagunilla en Argentina y Bolivia.

Hongo	Estado trófico	Síntomas	Distribución
<i>Uredo pacensis</i>	Biotrófico	Pústula en hojas	Bolivia
<i>Wilsoniana bliti</i>	Biotrófico	Soros en hojas	CHA, SAL
<i>Colletotrichum 1</i>	Necrotrófico	Mancha clara en hoja, lesión corchosa en tallo	BAI, MIS, CHA
<i>Colletotrichum 2</i>	Necrotrófico	Costras en hojas y tallos.	FOR, TUC
<i>Alternaria</i> sp. (patógena)	Necrotrófico	Manchas rojas, cancro en tallo.	MIS, BAI
<i>Phoma</i> sp.	Necrotrófico	Cancros, lesión en tallo	SAL, SDE, JUI
<i>Phomopsis</i> sp.	Necrotrófico	Antracnosis hoja, costra, lesión en tallo	BAI, FOR, TUC, CHA
<i>Fusarium</i> spp.	Necrotrófico	Lesiones en tallo, manchas en hoja.	BAI, CHA; FOR, JUI, MIS, SAL, SDE, TUC.
<i>Cladosporium</i> sp.	Necrotrófico	Ampolla en hoja	BAI, TUC
<i>Nigrospora</i> sp.	Necrotrófico	Mancha hoja y lesión tallo	TUC
<i>Curvularia</i> sp.	Necrotrófico	Mancha en hoja	TUC
<i>Alternaria</i> sp.	Necrotrófico	Mancha en hoja.	BAI, JUI
Virus	-	Mosaico, acortamiento entrenudos, deformación.	BAI
<i>Nectria</i> sp.		Mancha en hoja	BAI
<i>Gliocladium</i> sp.	Necrotrófico	Mancha en hoja	BAI
<i>Epicoccum</i> sp.	Necrotrófico	Mancha en hoja	BAI

### 3.2.1. Roya - *Uredo pacensis*

*Uredo pacensis* Lindq. (Identificación confirmada por CABI, N° IMI 396348) es una roya imperfecta del orden Pucciniales, phylum Basidiomycota.

#### A. Distribución

Se encontró en los sitios 301, 302, 303, altura entre 1.600 y 1.800 m sobre el nivel del mar, cercanos a Coroico, prov. Nor Yungas, dto. La Paz, Bolivia.

Hemos detectado esta roya en las tres poblaciones de *A. philoxeroides* que encontramos en agosto de 2007, en la región mencionada. La incidencia en todos estos lugares estuvo cercana al 100 %, con una muy elevada severidad (Lám. 31).



**Lámina 31.** Síntomas de infección producidos por *Uredo pacensis* en *Alternanthera philoxeroides*.

#### B. Descripción

Los primeros síntomas de infección fueron diminutas manchas foliares circulares cloróticas. Sobre ellas se formaban, en el envés de la lámina, los uredosoros color

canela de hasta 1 mm de diámetro, al comienzo cubiertos por la epidermis que luego se abría dejando expuestas las masas pulverulentas (Lám. 32). Uredosporas equinuladas, subglobosas a obovoides, 21,5-31 x 21,5-24,5  $\mu\text{m}$ , con 2 poros ecuatoriales, espesor de la membrana lateral 2-2,5  $\mu\text{m}$ , apical 2,5-5,5  $\mu\text{m}$  (Lám. 33). A medida que avanzaba la infección, los uredosoros se rodearon de un halo clorótico, dando lugar a una extensa clorosis difusa en áreas de la lámina con mayor densidad de soros. Dichas áreas luego se necrosaron.



**Láminas 32 a 33.** *Uredo pacensis*. 32. Uredosoros. 33. Uredosporas. Barra escala 33 = 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.2. Roya blanca - *Wilsoniana bliti*

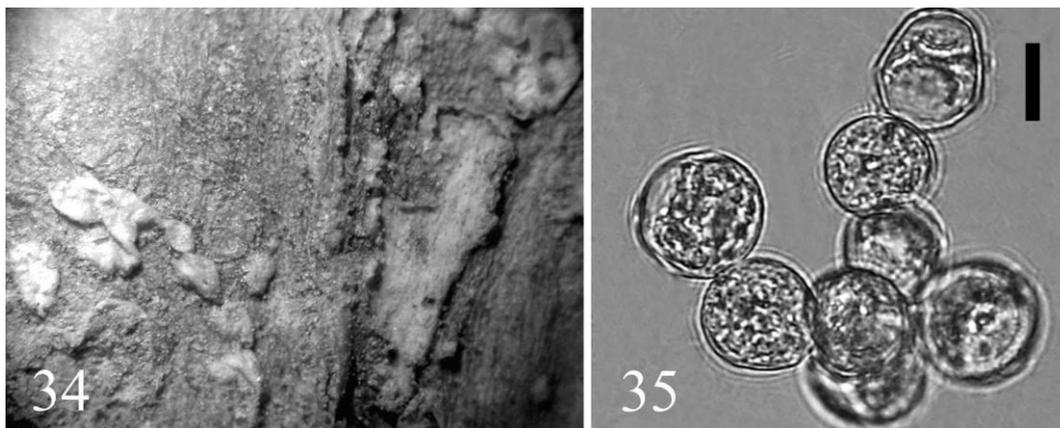
*Wilsoniana bliti* (Biv.) Thines (sinónimos *Albugo bliti*, *Cystopus bliti*), Fam. Albuginaceae, orden Albuginales, subclase Albuginomycetidae, clase Peronosporomycetes, pertenece al reino Straminipila o Chromista (Thines & Spring, 2005). Es un organismo biótrofo que causa la llamada roya blanca en diversas amarantáceas. Esta especie es cosmopolita.

#### A. Distribución

Se encontró en *Alternanthera philoxeroides* (sitio 180, al norte de Orán, Salta) y *A. aquatica* (sitio 163, Isla del Cerrito, Chaco). Se observó una alta incidencia de la enfermedad en el campo.

## B. Descripción

Se observaron soros blanquecinos, agrupados, a veces confluyentes, de 3 a 10 mm en hojas y tallos (Lám. 34). Esporangios hialinos, subglobosos a piriformes, 13-17,5 x 13-16  $\mu\text{m}$ , con leve engrosamiento de la pared en la zona ecuatorial (Lám. 35). No se observaron oosporas.



**Láminas 34 a 35.** *Wilsoniana bliti*. 34. Soros sobre hoja. 35. Esporangios. Barra escala 35 = 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.3. Mancha foliar y cancro del tallo – *Alternaria* sp.

#### A. Distribución

Sobre *Alternanthera philoxeroides* a 100mts de Ruinas de San Ignacio, Misiones (sitio 130) (ver Anexo 2, Tabla 16). Se observó una incidencia del 100 % y un muy elevado nivel de severidad. Síntomas muy similares se observaron en plantas de *A. philoxeroides* de Tandil, Buenos Aires (sitio 33), pero no se encontraron estructuras reproductivas sobre el material herborizado y en cámara húmeda sólo hubo crecimiento abundante de hongos saprófitos. No se logró aislar el hongo de ninguno de los dos sitios debido a la dominancia de los saprobios mencionados. Por lo tanto, no se pudo cumplir con los postulados de Koch.

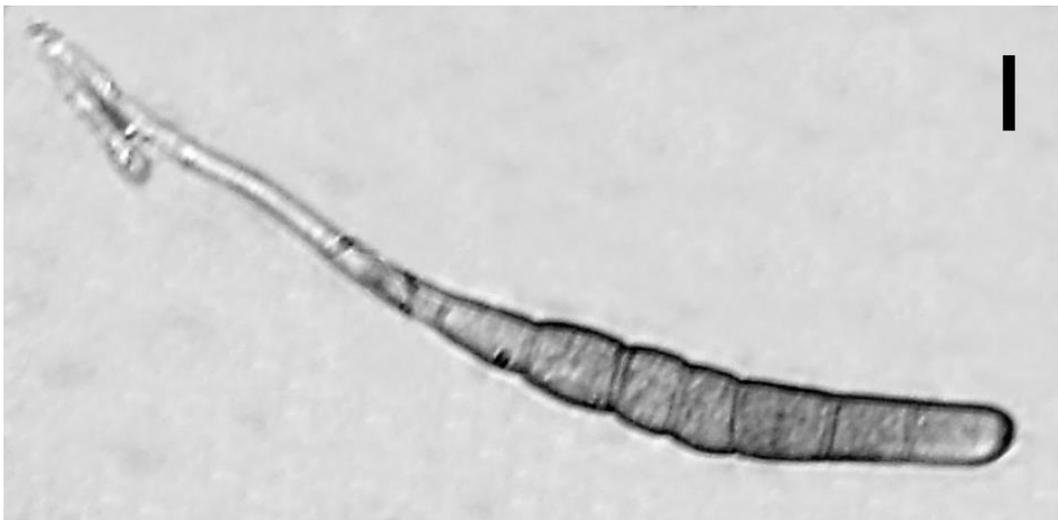
#### B. Descripción

Manchas foliares circulares, hasta 7 mm de diámetro, rojo-purpúreas, con centro claro necrótico (Lám. 36). Hojas densamente pobladas de lesiones, luego tornándose cloróticas y secándose. Manchas en el tallo alargadas, rojizas, con centro blancuzco. Éstas podían tomar forma de ampolla elevada, de tejido necrótico; las que luego formaban canchros y rajaduras en el tallo, especialmente en la parte basal (Lám. 37).



**Láminas 36 a 37.** *Alternaria* sp. 36. Detalle de mancha foliar. 37. Cancros en tallo.

Fue difícil encontrar estructuras reproductivas sobre el tejido afectado. Los conidios hallados eran estrechamente elipsoidales, con cicatriz oscura en la base, con 5-8 euseptos transversales, y ocasionalmente algún septo secundario oblicuo. El cuerpo del conidio, de color tostado claro, mide (55-)65-100(-125) x 9-12,5(-15,5)  $\mu\text{m}$ . El pico apical hialino, tan o algo más largo que el cuerpo y frecuentemente algo ensanchado en la parte apical (Lám.38).



**Lámina 38.** Conidio de *Alternaria* sp. Barra escala = 10  $\mu$ m.

#### **3.2.4. Antracnosis - *Colletotrichum* spp.**

En cinco sitios se colectaron plantas de *Alternanthera philoxeroides* con infección de *Colletotrichum* spp. Los síntomas observados no siempre fueron muy conspicuos y claros; no se encontraron acérvulos u otros signos inconfundibles de *Colletotrichum* sobre el material recolectado. Sin embargo, en todos los casos se obtuvieron aislados de *Colletotrichum* y la siguiente descripción morfológica se basa en las estructuras observadas *in vitro*.

Los aislados estudiados se pueden agrupar en base a la forma y tamaño de los conidios. El **primer grupo** (80, 93 y 428) tiene conidios rectos cortamente cilíndricos y el **segundo** (165, 175) tiene conidios falcados (Tabla 16). En forma tentativa, el primer grupo fue ubicado dentro del complejo *Colletotrichum orbiculare* y el segundo podría pertenecer al complejo *C. truncatum* s. lat. que incluye a *C. capsici* (Damm et al., 2009).

En la actualidad, diversos grupos de micólogos están estudiando la taxonomía del género *Colletotrichum* a nivel mundial (Hyde et al., 2009). Hasta que se aclare la situación taxonómica y nomenclatural, hemos desistido de adjudicar un nombre

definitivo a los taxones estudiados en *Alternanthera*. Hemos buscado la colaboración de la especialista para completar los estudios taxonómicos.

**Tabla 16.** Características de aislados de *Colletotrichum* obtenidos de *Alternanthera philoxeroides*

Sitio	Prov.	Conidios			Setas	Apresorios	Grupo
		Forma	Medidas	Tab.			
80	CHA	recto	11-16 x 3-5	ND	ND	5-6,5 x 5	1
93	BAI	recto	9-19 x 3-6	0?	34-85,5 x 3	6-9 x 3-6	1
428	MIS	recto	12,5-15,5 x 3-6	0?	46-80	6-11 x 3-6	1
165	FOR	falcado	15,5-24,5 x 3	1	76,5-153	9-15,5 x 6-7,5	2
175	TUC	falcado	12,5-24,5 x 3	1	86-173,5	8,5-14,5 x 3-7,5	2

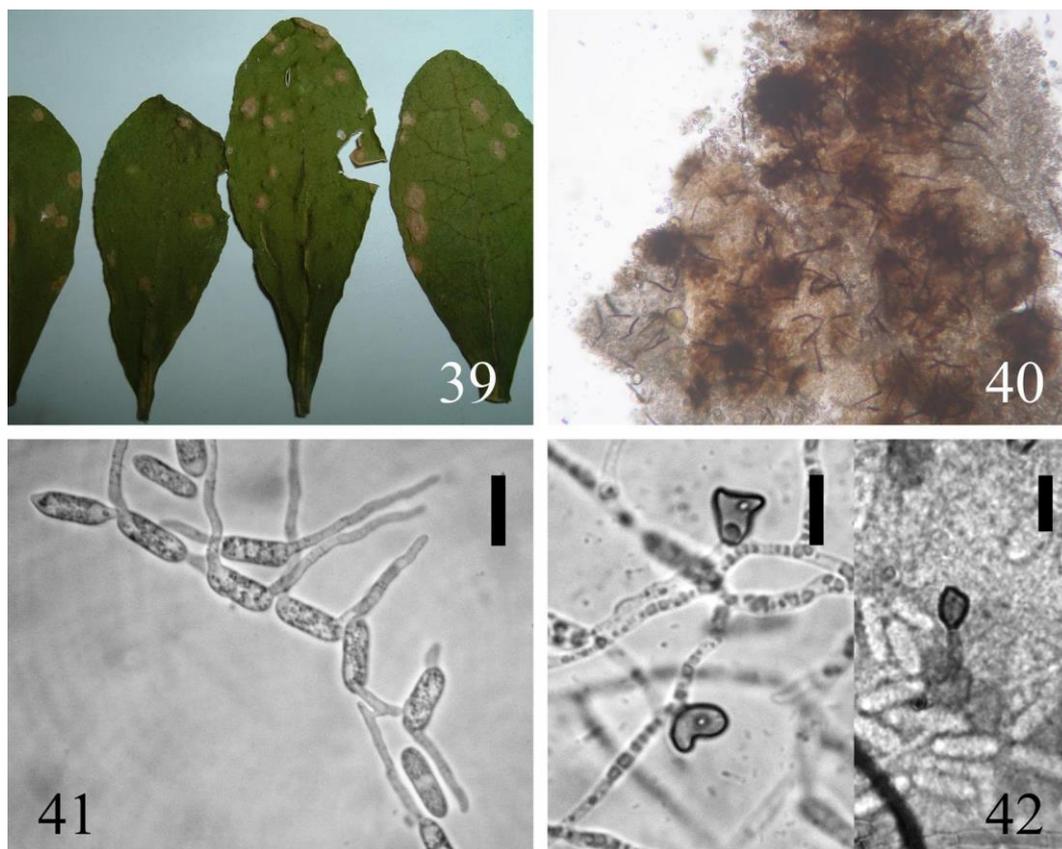
### **Grupo 1**

#### **A. Distribución**

La precedente descripción se refiere a la infección hallada sobre una población de plantas del sitio 93 (Monte, Buenos Aires). Las características culturales y morfológicas del hongo aislado son similares a los aislados de los sitios 80 (camino a Isla del Cerrito, Chaco) y 428 (San Ignacio, Misiones). La enfermedad se presentó con una alta incidencia en el sitio 93 y baja en sitios 80 y 428.

#### **B. Descripción**

Manchas foliares circulares, ovaladas a irregulares, grisáceas a pajizas, hasta 1 cm (Lám. 39). No se observaron acérvulos en hojas y tallos. En medio de cultivo desarrolló un micelio gris oscuro, con exudado rosado oscuro. Presencia de estructuras esclerociales y setas, 34-85,5  $\mu\text{m}$ , castaño-oscuro, con las células basales más claras (Lám. 40). Conidios rectos cilíndricos a elipsoidales, con los extremos redondeados, 9-19 x 3-6  $\mu\text{m}$ , gutulados (Lám. 41). Apresorios clavados, obovoides, “guante de box” y a veces irregulares, 6-9 x 3-6  $\mu\text{m}$  (Lám. 42).



**Láminas 39 a 42.** *Colletotrichum* grupo 1 sobre *Alternanthera philoxeroides*. 39. Manchas foliares. 40. Esclerocios. 41. Conidios. 42. Apresorios. Barra escala 41, 42 = 10  $\mu$ m.

### C. Inoculación

Los aislados 93 y 428 se inocularon en plantas de *A. philoxeroides* (orígenes San Javier, Hurlingham y Predelta) por medio del método Pipeta. Se desarrollaron manchas cloróticas y necróticas muy similares para los dos aislados y a partir de esas manchas se reaislaron los hongos inoculados.

## Grupo 2

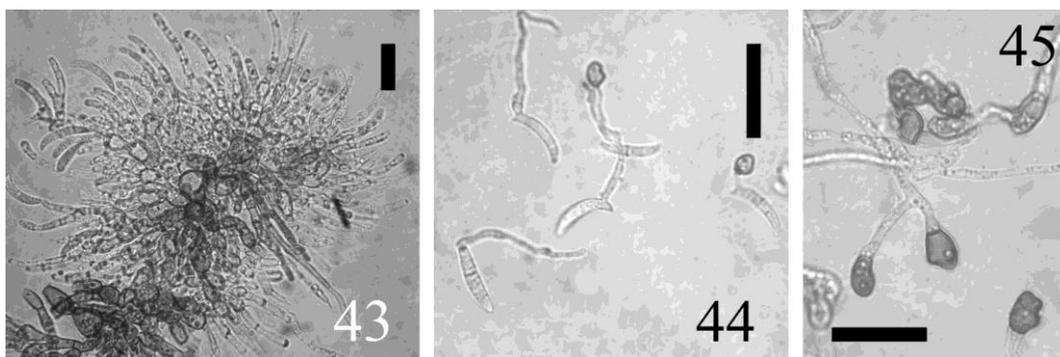
### A. Distribución

Se aisló un hongo con características culturales, morfológicas y morfométricas similares del sitio 165 (Herradura, Formosa) y 175 (Capital, Tucumán) (Tabla 16).

La enfermedad presentó alta incidencia en la población local de lagunilla de ambos sitios.

### B. Descripción

Manchas blanquecinas elevadas y costrosas en hojas y tallos acompañadas por áreas necróticas. El hongo aislado, en medio de cultivo desarrolló un micelio oscuro con formación inicial de esclerocios y estructuras acervulares (Lám. 43), con setas oscuras de 76,5-153  $\mu\text{m}$ ; conidios falcados, 15,5-24,5 x 3  $\mu\text{m}$ , gutulados, formando un septo transversal al germinar (Lám. 44). Apresorios de distintas formas, globosos, ovoides, clavados, lobados, guante de box e irregulares muy complejos, 9-15,5 x 6-7,5  $\mu\text{m}$  (Lám. 45).



**Láminas 43 a 45.** *Colletotrichum* grupo 2 sobre *Alternanthera philoxeroides*. 43. Acérvulo. 44. Conidios septados luego de la germinación. 45. Apresorios. Barra escala 43 a 45 = 20  $\mu\text{m}$ .

### C. Inoculación

Las pruebas de inoculación realizadas en plantas de *A. philoxeroides* (órigenes San Javier, Hurlingham y Predelta) con el aislado 165 resultaron en manchas elevadas acompañadas por clorosis y necrosis. El hongo inoculado se reaisló de las manchas.

#### 4. Discusión

Durante los monitoreos realizados en Argentina y Bolivia se encontraron diversos patógenos asociados con lagunilla (*Alternanthera philoxeroides*) algunos de los cuales se preseleccionaron como posibles candidatos para el control biológico. Entre ellos había dos biótrosos, la roya *Uredo pacensis* y la roya blanca *Wilsoniana bliti*, los que eventualmente se prestarían para el enfoque de control clásico. Los otros hongos preseleccionados incluyen a los hemibiótrosos *Alternaria* sp. y *Colletotrichum* spp.

La roya fue encontrada en un área geográfica muy limitada, circunscripta a los alrededores de la ciudad de Coroico en las yungas bolivianas, aunque es posible que el área de distribución sea más extensa. Es interesante destacar que ésta es la misma zona donde se encontró la roya por primera vez (Lindquist, 1957) y aparentemente la única donde hasta el presente ha sido registrada. En Argentina, en la formación de yungas del noroeste no se encontraron signos de la roya a pesar del muestreo realizado.

Este hongo hasta ahora sólo se observó en su estadio de uredos. Existen escasos antecedentes de control biológico utilizando royas imperfectas que sólo se presentan en su forma uredosórica (Morris et al., 1999, Pereira et al., 2007). La principal ventaja de las mismas, es que las uredosporas se diseminan con gran facilidad por medio del viento, en comparación con royas microcíclicas donde la diseminación de teleutosporas y/o basidiosporas es menos eficiente. Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que se trate de una roya perfecta, con telios y eventualmente otros estadios. En este caso surgiría la pregunta si es una roya autoica o heteroica, es decir, que cambia de hospedante para cumplir su ciclo completo. Si se pensara en *U. pacensis* como agente, primero deberían realizarse

estudios sobre el ciclo del hongo, en particular si es autoico o heteroico, sobre su especificidad así como su distribución y exigencias ambientales. Además, no hay datos de especificidad de la roya que es otro requisito *sine qua non* para un agente de biocontrol.

En relación a la roya blanca, *Wilsoniana bliti*, esta fue encontrada en dos sitios donde se presentó con un alto nivel de incidencia. No se conoce si este nivel de intensidad se traduce en un importante impacto sobre la población del hospedante. *Wilsoniana bliti* tiene un amplio rango de hospedantes dentro de la familia Amaranthaceae que entre otros incluye a algunos de los pseudocereales del género *Amaranthus* (Farr & Rossmann, 2014). Sin embargo, no se ha estudiado si la forma del hongo que infecta a *A. philoxeroides* es específica o si puede atacar a algunos de los pseudocereales u otras plantas que deben ser conservadas.

*Wilsoniana bliti* fue citada en Australia (NSW) en *Alternanthera* y *Amaranthus*, pero no en lagunilla; tampoco ha sido observada en ninguna *Alternanthera* durante los muestreos realizados en New South Wales durante el período 2002-2003 (R. Gilbert, com. pers.).

Hartmann & Watson (1980a) realizaron estudios con *Pustula tragopogonis* con el fin de utilizarlo como un potencial agente de control endémico de *Ambrosia artemisiifolia*, ya que este patógeno presenta un rango de hospedantes acotado (Hartmann & Watson, 1980b). Con el mismo objetivo, Delhey & Kiehr-Delhey (1987) estudiaron los patógenos de la maleza *Diploaxis tenuifolia* en Argentina, citando entre ellos la presencia de *Albugo candida*. Ninguna roya blanca ha sido aún utilizada como un agente de biocontrol clásico. Respecto a su desarrollo como micoherbicida, se reconoce que no son apropiados ya que no pueden ser cultivados en medios artificiales.

La mancha foliar y cancro del tallo de lagunilla encontrada en Misiones está estrechamente asociada con una *Alternaria* sp. cercana a *A. alternantherae* y *A. perpunctulata* (E.G.Simmons) D.P. Lawr., M.S. Park & B.M. Pryor (= *Nimbya perpunctulata* E. G. Simmons). La especie encontrada coincide muy bien en forma, tamaño, tabicamiento y color con la descripción original de *Alternaria perpunctulata*; sin embargo, los conidios son lisos y no muestran la ornamentación característica descrita por Simmons (2004). Cabe recalcar que la descripción original se refiere a conidios formados en medio de cultivo, mientras que los conidios estudiados por nosotros provenían de material desecado de plantas infectadas en el campo. Estos conidios son definitivamente más angostos (9-12,5(-15,5)  $\mu\text{m}$ ) que los de *Alternaria alternantherae* (18-20  $\mu\text{m}$ ) (Simmons, 2004). Futuros estudios deberán realizarse para establecer si el hongo encontrado aquí es una forma de *A. perpunctulata* o si se trata de una especie nueva. De cualquier manera, pertenece a la sección *Alternantherae* D.P. Lawr., Gannibal, Peever & B.M. Pryor del género *Alternaria*, junto con *A. alternantherae*, *A. perpunctulata* y algunas otras especies que infectan a miembros de la familia Amaranthaceae, y las que anteriormente habían sido acomodadas en el género *Nimbya* (Woudenberg et al., 2013).

Se observó que esta mancha foliar causaba un impacto muy fuerte en la población de lagunilla estudiada, tal como se señala para casos similares en USA, Australia, Brasil, China y otros lugares (Holcomb, 1978; Barreto & Torres, 1999; Gilbert et al., 2008). Estudios sobre el rango de hospedantes con diversos orígenes de *Alternaria* han demostrado que además de lagunilla y otras *Alternanthera* spp., estos hongos pueden infectar plantas ornamentales (celosia, gonfrena) y hortícolas (remolacha, espinaca) (Holcomb, 1978). Por lo tanto se excluye su empleo como

agentes de control biológico clásico (Barreto & Torres, 1999). Sin embargo, se recomienda su eventual uso como micoherbicida (Xiang et al., 2002).

Con respecto a los cinco aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos, estos fueron tentativamente adjudicados a *C. orbiculare* s.l. y a *C. truncatum* s.l. En tres de los cinco sitios la enfermedad se presentó con una incidencia elevada, sin embargo no se observó esporulación en las plantas sintomáticas. Hasta que no se conozca la identidad de los hongos estudiados no se puede determinar la especificidad de los mismos. Por lo tanto sería poco probable que se les considere como agentes de biocontrol clásico. Sin embargo, se ha demostrado que *Colletotrichum* spp. pueden ser empleadas exitosamente como micoherbicidas. Para el caso concreto de lagunilla, estudios al respecto han sido iniciados en China (Tan, 1993; Tan & Gu, 1993).

## Capítulo IV.

### CONCLUSIONES

Esta tesis es válida como aporte al conocimiento científico micológico básico de nuestro país. Se han obtenido datos de especies de plantas y hongos, sus relaciones, su distribución geográfica, su morfología, etc.

La situación taxonómica de *Phyla* es diferente en Argentina y en Australia. En Australia, *Phyla nodiflora* se considera introducida durante el siglo pasado y actualmente naturalizada (Munir, 1993) y *Phyla canescens* (“lippia”), una especie diferente, que se identifica como la maleza “target” de control. Mientras que en Argentina las tres variedades se agrupan bajo el nombre *P. nodiflora* (O’Leary y Múlgura, 2012). Estudios moleculares recientes indican que los tres subclados argentinos debieran agruparse en un único clado como *P. canescens sensu latu* (Fatemmi com. pers.). De acuerdo con este enfoque molecular todos los hongos habrían sido hallados en *P. canescens*, por lo que cualquiera de ellos podría utilizarse como agente de control biológico clásico. La taxonomía de *Phyla* en Australia pone un paréntesis en la selección de los candidatos de biocontrol, a la espera de más información filogenética que aclare el nivel de especificidad real de los enemigos naturales de esta maleza. La cepa R205r de *Puccinia lantanae* sería la primera opción a tener en cuenta debido a su alto nivel de especificidad, habilidad para dispersarse y al daño que produce. Respecto a *Cercospora lippiae*, se han realizado investigaciones con el fin de utilizar *Cercospora* spp. y géneros afines como ACB clásico (Hofmeister & Charudattan, 1987; Morin & Trueman, 1997; Morin et al., 2004), por lo que este patógeno es otro agente promisorio de control.

En relación a *Alternanthera philoxeroides*, los agentes liberados sólo controlan la forma acuática (Sainty et al., 1998). La roya *Uredo pacensis* es un candidato promisorio para efectuar el control de la forma terrestre de lagunilla y para ser aplicado en las márgenes de los cursos de agua.

## LITERATURA CITADA

Adams E. B. 1988. Fungi in classical biocontrol of weeds. En: (ed. Burge M. N.) Fungi in biological control systems. Manchester University Press, Manchester, UK, pp. 111-124.

Akobundu I.O. 1987. Weed Science in the Tropics Principles and Practices. John Wiley & Sons, Chichester. 522 pp.

Alderman S. C. & Beute M. K. 1986. Influence of temperature and moisture on germination and germ tube elongation of *Cercospora arachidicola*. *Phytopathology* 76, 715-719.

Alzugaray, C., Feldman, S. R. and Lewis, J. P. 2003. Dinámica del banco de semillas de un espartillar de *Spartina argentinensis*. *Ciencia e Investigación Agraria* 30, 197–209.

Anikster Y. 1986. Teliospore germination in some rust fungi. *Phytopathology* 76, 1026-1030.

Barreto R. W., Evans H. C. & Ellison C. A. 1995. The mycobiota of the weed *Lantana camara* in Brazil, with particular reference to biological control. *Mycological Research* 99 (7), 769-782.

Barreto R. W. & Evans H. C. 1997. Role of fungal biocontrol of weeds in ecosystem sustainability. En: (eds. Palm M. E. & Chapela I. H.) *Mycology in sustainable development: expanding concepts, vanishing borders*. pp. 183-210.

Barreto R.W. & Torres A.N.L. 1999. *Nimbya alternantherae* and *Cercospora alternantherae*: two new records of fungal pathogens on *Alternanthera philoxeroides* (alligatorweed) in Brazil. *Australasian Plant Pathology* 28, 103-107.

Barton J. 2004. How good are we at predicting the field host-range of fungal pathogens used for classical biological control of weeds? *Biological Control* 31, 99–122.

Beckman P. M. & Payne G. A. 1983. Cultural techniques and conditions influencing growth and sporulation of *Cercospora zeaе maydis* and lesion development in corn. *Phytopathology* 73, 286-289.

Berndt, R. 2002. Additions to the rust fungi of Argentina. *Mycologia* 94, 523-534.

Blumenthal D. M. 2006. Interactions between resource availability and enemy release in plant invasion. *Ecology Letters* 9, 887-895.

Bourdot G. W., Hurrell G. A., Saville D. J. & Leathwick D. M. 2006. Impacts of applied *Sclerotinia sclerotiorum* on the dynamics of a *Cirsium arvense* population. *Weed Research* 46 (1), 61-72.

Bourke C. A. & Rayward D. 2003. Photosensitisation in dairy cattle grazing alligator weed (*Alternanthera philoxeroides*) infested pastures. Australian Veterinary Journal 8, 361-362.

Brosten B. S. & Sands D. C. 1986. Field trials of *Sclerotinia sclerotiorum* to control Canada thistle. Weed Science 34 (3), 377-380.

Buckingham G.R. 2002. Alligatorweed. En: (eds. Van Driesche R., Blossey B., Hoddle M., Lyon S., Reardon R.) Biological Control of Invasive Plants in the Eastern United States. USDA Forest Service...pp.

Burgin S., Norris A. & Karlson D. 2010. *Alternanthera philoxeroides* in New South Wales, Australia: are we closer to control of alligator weed? Weed Technology 24, 121-126.

Cabrera A. L. 1971. Fitogeografía de la República Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, XIV (1-2), Buenos Aires. 42pp.

Charudattan R. 1982. Regulation of microbial weed control agents. En: (eds. Charudattan R. & Walker H. R.) Biological control of weeds with plant pathogens. John Wiley & Sons, New York, pp. 175-188.

Charudattan R. 2005. Ecological, practical and political inputs into selection of weed targets: what makes a good biological control target? Biological Control 35, 183-196.

Collantes, M. B., Stofella, S. L., Ginzo, H. D. and Kade, M. 1998. Productividad y composición botánica divergente de dos variantes florísticas de un pastizal natural de la Pampa Deprimida fertilizadas con N y P. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata 103, 45-59.

Coulson J. 1977. Biological control of alligatorweed, 1959-1972. A review and evaluation. USDA, ARS Technical Report No. 1547. 98 pp.

Cronk Q.C.B & Fuller J.L. 1995. Plant Invaders. Chapman & Hall, London. 241 pp.

Crous P. W. & Braun U. 2003. *Mycosphaerella* and its anamorphs: 1. Names published in *Cercospora* and *Passalora*. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Utrecht.

Culliney T. W. 2005. Benefits of classical biological control for managing invasive plants. Critical Reviews in Plant Sciences 24, 131-150.

Damm, U., J. H. C. Woudenberg, P. F. Cannon, & P. W. Crous. 2009. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. Fungal Diversity 39: 45-87.

Davis M. A., Grime J. P. & Thompson K. 2000. Fluctuating resources in plant communities: a general theory of invasibility. Journal of Ecology 88, 528-534.

de Jong M. D., Scheepens P. C. & Zadocks J. C. 1990. Risk analysis for biological control: a dutch case study in biocontrol of *Prunus serotina* by the fungus *Chondrostereum purpureum*. *Plant Disease* 74 (3), 189-194.

de Jong M. D. 2000. The BioChon story: deployment of *Chondrostereum purpureum* to suppress stump sprouting in hardwoods. *Mycologist* 14 (2), 58-62.

Delhey R. & Kiehr-Delhey M. 1987. Patógenos en malezas y especies autóctonas. I. Roya (*Puccinia cnici*) en cardo negro (*Cirsium vulgare*) y Roya blanca (*Albugo candida* var. *macrospora*) en flor amarilla (*Diplotaxis tenuifolia*). *Malezas* 15, 35-40.

Desprez-Loustau M. L. 1986. Physiologie in vitro des basidiospores de *Melampsora pinitorqua*. Conséquences pour la compréhension des infections. *European of Journal Forest Pathology* 16, 193-206.

Dhingra, O. D. & J. B. Sinclair. 1985. *Basic Plant Pathology Methods*. CRC Press, Florida, USA. 355 pp.

DiTomaso J. M. 2000. Invasive weeds in rangelands: species, impacts and management. *Weed Science* 48, 255-265.

Earl, J. 2003. The distribution and impacts of *Lippia (Phyla canescens)* in the Murray Darlin System. Agricultural Information and Monitoring Services. ABN: 73 918 506 894.

Eilenberg J., Hajek A. & Lomer C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46, 387-400.

Ellis M. B. 1976. *More dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew. 507 pp.

Ellison C. A., Evans H. C. & Ineson J. 2004. The significance of intraspecies pathogenicity in the selection of a rust pathotype for the classical biological control of *Mikania micrantha* (mile-a-minute weed) in southeast Asia. En: (eds Cullen JM, Briese DT, Kriticos DJ, Lonsdale W.M., Morin L. & Scott J.K.) *Proceedings of the XI International Symposium on Biological Control of Weeds* CSIRO Entomology, Canberra, Australia, pp. 102-107.

Ellison C. A., Evans H. C., Djeddour D. H. & Thomas S. E. 2008. Biology and host range of the rust fungus *Puccinia spegazzinii*: A new classical biological control agent for the invasive, alien weed *Mikania micrantha* in Asia. *Biological Control* 45, 133-145.

Evans H. C. & Ellison C. A. 1990. Classical biological control of weeds with micro-organisms: past, present, prospects. *Aspects of Applied Biology* 24, 39-49.

Evans H. C. 1992. Pathogen-weed relationships: the practice and problems of host range screening. En: (eds Delfosse E. S. & Scott R. R.) *Proceedings of the VIII*

International Symposium on Biological Control of Weeds. Lincoln University, Canterbury, New Zealand, pp. 539-551.

Evans H. C. 1995. Fungi as biocontrol agents of weeds: a tropical perspective. *Canadian Journal of Botany* 73, 58-64.

Evans H. C. 2000. Evaluating plant pathogens for biological control of weeds: an alternative view of pest risk assessment. *Australasian Plant Pathology* 29, 1-14.

Evans H. C., Frolich J. & Shamoun S. F. 2001a. Biological control of weeds. En: (eds. Pointing, S. B. & Hyde, K. D.) *Bio-Exploitation of Filamentous Fungi*. Fungal Diversity Research Series 6, 349-401.

Evans H. C., Greaves M. P. & Watson A. K. 2001b. Fungal biocontrol agents of weeds. En: (eds. Butt T. M., Jackson C. & Magan N.) *Fungi as biocontrol agents*. CAB International, pp. 169 -192.

Evans H. C. 2002a. Biological Control of Weeds. En: (eds. Esser K. & Bennett J. W.) *The Mycota XI*. Springer, Verlag Berlin Heidelberg, pp. 135-152.

Evans H. C. 2002b. Plant pathogens for biological control of weeds. En: (eds. Waller J. M., Lenné J. M. & Waller S. J.) *Plant Pathologist's Pocketbook*. CAB International, pp. 366-378.

Evans H. C. & Ellison C. A. 2005. The biology and taxonomy of rust fungi associated with the neotropical vine *Mikania micrantha*, a major invasive weed in Asia. *Mycologia* 97, 935-947.

Farlow W. G. 1883. VII Notes on some species in the third and eleventh centuries of Ellis's North American fungi. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences* 18, 65-85.

Farr D. F., Bills G. F., Chamuris G. P. & Rossman A. Y. 1989. *Fungi on plants and plant products in the United States*. APS Press, St. Paul.

Fontana, S. L. 2005. Coastal dune vegetation and pollen representation in south Buenos Aires Province, Argentina. *Journal of Biogeography* 32, 719-735.

Frank S. A. 1993. Coevolutionary genetics of plants and pathogens. *Evolutionary Ecology* 7, 45-75.

Frezzi M.J. 1956. Especies de *Pythium* fitopatógenas identificadas en la República Argentina. *Revista de Investigaciones Agrícolas* 10, 113-241.

Fukushi T. 1925. Studies on the apple rust caused by *Gymnosporangium yamadae* Miyabe. *Journal of the College of Agriculture, Hokkaido Imperial University, Sapporo, Japón*. 15 (5), 269-307.

Gilbert R.L., Auld B.A. & Hennecke B.R. 2005. Leaf and stem spot of *Alternanthera philoxeroides* (alligatorweed) in Australia caused by *Nimbya* sp. *Plant Pathology* 54, 585-585.

Gilbert R.L., Gurr G.M., Priest M.J. & Mitchell A. 2008. Towards a bioherbicide approach. En: (van Klinken, R.D., Oesten, V.A., Panetta, F.D., Scanlan, J.C., Eds.) 16th Australian Weeds Conference Proceedings. North Queensland, Australia, pp. 283.

Gold R. E. & Mendgen K. 1984. Cytology of teliospore germination and basidiospore formation in *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus*. *Protoplasma* 119, 150-155

Gold R. E. & Mendgen K. 1991. Rust basidiospore germlings and disease initiation. En: eds. Cole G.T. & Hoch H.C.) *The Fungal Spore and Disease initiation in plants and animals*. Plenum, New York, pp. 67-99.

Hajek A. 2004. *Natural Enemies: an introduction to biological control*. Cambridge University Press. 378 pp.

Hartmann H. & Watson, A. K. 1980a. Damage to common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) caused by the rust white fungus (*Albugo tragopogi*). *Weed Science* 28 (6), 632-635.

Hartmann H. & Watson, A. K. 1980b. Host range of *Albugo tragopogi* from common ragweed. *Canadian Journal of Plant Pathology* 2, 173-175.

Harris P. 1991. Classical biocontrol of weeds: its definitions, selection of effective agents, and administrative political problems. *The Canadian Entomologist* 123, 827-849.

Hasan S. 1972. Specificity and host specialization of *Puccinia chondrillina*. *Annals of Applied Biology* 72, 257-263.

Hasan S. 1981. A new strain of the rust fungus *Puccinia chondrillina* for biological control of skeleton weed in Australia. *Annals of Applied Biology* 99, 119-124.

Hasan S. 1991. The biology and host specificity of the onion weed rust, *Puccinia barbeyi*, a potentially useful agent for biological control in Australia. *Annals of Applied Biology* 118 (1), 19-25.

Hernández J. R. & Hennen J. F. 2002. Rust fungi (Uredinales) of northwest Argentina. *SIDA* 20, 313-338.

Hill H.R., Zettler F.W. & Freeman T.E. 1972. Plant pathogens with potential for biological control of aquatic weeds. En: *Proceedings of the Southern Weed Science Society 25th annual Meeting*, pp. 388.

- Hofmeister F. M. & Charudattan R. 1987. *Pseudocercospora nigricans*, a pathogen of sicklepod (*Cassia obtusifolia*) with biocontrol potential. *Plant Disease* 71, 44-46.
- Hoffman J. H. 1995. Biological control of weeds: the way forward, a South African perspective. En: Proceedings BCPC Symp.: Weeds in a changing world, Vol 64, pp. 77-89.
- Holcomb G.E. 1978. *Alternaria alternantherae* from alligator weed is also pathogenic on ornamental Amaranthaceae species. *Phytopathology* 68, 265-266.
- Holm L., Doll J., Holm E. & Pancho J. J.H. 1997. *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. Amaranthaceae, Amaranth family. *World Weeds: Natural Histories and distribution*. John Wiley & Sons, New York. 1137 pp.
- Hyde, K.D., Cai, L., McKenzie, E.H.C., Yang, Y.L., Zhang, J.Z. & Prihastuti, H. 2009. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity* 39: 1-17
- Jackson H.S. 1927. The rusts of South America based on the Holway Collections-II. *Mycologia* 19, 51-65.
- Jackson H. S. 1932. The rusts of South America based on the Holway Collections – VI. *Mycologia* 24, 62-186.
- Jensen K. I. N. 1991. The use of *Colletotrichum* species in biological weed control. En: Proceedings of the 38th annual meeting of THA Canadian pest management society Fredericton, NB, Canada, pp. 27-31.
- Jones J. P. 1958. Isolation of a sporulating strain of *Cercospora kikuchii* by selective subculturing. *Phytopathology* 48, 287-288.
- Julien M., Broadbent J. & Harley K. 1979a. The current status of biological control of *Alternanthera philoxeroides* (alligator weed) in Australia. En: Proceedings of the seventh Asian-Pacific Weed Science Society Conference, Sydney, Australia, pp.
- Julien M. H., Broadbent J. E. & Matthews N. C. 1979b. Effects of *Puccinia xanthii* on *Xanthium strumarium* (Compositae). *Entomophaga* 24, 29-34.
- Julien M. & Broadbent J. E. 1980. The Biology of Australian weeds: *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. *The Journal of the Australian Institute of Agriculture Science* 46, 150-155.
- Julien M. 1995. The biology of Australian weeds. *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. In: (eds. Groves R.H., Shepherd R.C.H., Richardson R.G.) *The Biology of Australian Weeds*, pp. 1-12.
- Julien M.H., Skarratt B. & Maywald G.F. 1995. Potential geographical distribution of alligator weed and its biological control by *Agasicles hygrophila*. *Journal of Aquatic Plant Management* 33, 55-60.

Julien M. H. & Griffiths M. W. 1999. Biological Control of Weeds. A world catalogue of agents and their target weeds, Fourth Edition. CABI International, Wallingford. 223pp.

Julien, M. H., Storrie, A., and McCosker, R. 2004. Lippia, *Phyla canescens*, an increasing threat to agriculture and the environment. 476–479. In: B. M. Sindel and S. B. Johnson (eds) 14th Australian Weeds Conference. Charles Sturt University, Wagga Wagga, Australia, 718 pp.

Keane R. M. & Crawley M. J. 2002. Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends in Ecology and Evolution* 17(4), 164-170.

Kennedy, K. 1992. A systematic study of the genus *Phyla* Lour. (Verbenaceae: Verbenoideae, Lantanae). Tesis Doctoral. The University of Texas at Austin.

Kilpatrick R. A. & Johnson H.W. 1956. Sporulation of *Cercospora* species on carrot leaf decoction agar. *Phytopathology* 46, 180.

Koutsidou C. 2000. Studies on *Puccinia lantanae*, a potential biological control agent for *Lantana camara*. MSc Thesis, Imperial College, 111pp.

Laundon G.F. 1965. Rust Fungi III: On Alangiaceae, Amaranthaceae and Amaryllidaceae. *Mycological Papers* 102, 21.

Leslie J. F. & Summerell B. A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell publishing. 387pp.

Lindquist J.C. 1957. Notas Uredinológicas IV: *Uredo pacensis*. *Revista de la Facultad de Agronomía (La Plata)* 33, 80.

Lindquist J. C. & da Costa Neto J. P. 1963. Uredinales de Río Grande do Sul (Brasil). *Revista de la Facultad de Agronomía (La Plata)* 39, 111-152.

Lindquist J.C. 1982. Royas de la República Argentina y zonas limítrofes. INTA, Buenos Aires, Argentina, 574 pp.

Louda S. M., Kendall D., Connor J. & Simberloff D. 1997. Ecological Effects of an Insect Introduced for the Biological Control of Weeds. *Science* 277, 1088-1090.

Louda S.M., Pemberton R.W., Johnson M.T. & Follett P.A. 2003. Nontarget effects—the achilles' heel of biological control? Retrospective analyses to reduce risk associated with biocontrol introductions. *Annual Review of Entomology* 48, 365–96.

Mack R. N., Simberloff D., Lonsdale W. M., Evans H., Clout M. & Bazzaz F. 2000. Biotic Invasions: Causes, Epidemiology, Global Consequences and Control. En: *Issues in Ecology*. Ecological Society of America, Washington, United States. 20 pp.

Marx, H.E., O'Leary, N., Yuan, Y.-W., Lu-Irving, P., Tank, D.C., Mulgura, M.E., Olmstead, R.G. 2010. A molecular phylogeny and classification of Verbenaceae. *American Journal of Botany* 97, 1647-1663.

Mc Fadyen R. E. C. 1998. Biological control of weeds. *Annual Review of Entomology* 43, 369-393.

Morin L., Brown J. F. & Auld B. A. 1992. Effects on environmental factors on teliospore germination, basidiospore formation and infection of *Xanthium occidentale* by *Puccinia xanthii*. *Phytopathology* 82 (12), 1443-1447.

Morin L., Auld B. A. & Brown J. F. 1993. Host range of *Puccinia xanthii* and postpenetration development on *Xanthium occidentale*. *Canadian Journal of Botany* 71, 959-965.

Morin L. 1996. Different countries, several potential bioherbicides, but always the same hurdle. En: (eds. Moran V.C. & Hoffmann J.H.) *Proceedings of the IX International Symposium on Biological Control of Weeds*. University of Cape Town, Cape Town, South Africa.

Morin L. & Trueman H. 1997. Pathogenicity and inoculum potential of two *Cercospora* spp. on the weed *Heliotropium europaeum*. En: *Conference Handbook: 11th Biennial Conference of the Australasian Plant Pathology Society*, pp. 49.

Morin L., Auld B., Evans H., Ellison C., Reeder R., Anderson F. & Pettit B. 2004. Argentinian fungi for Bathurst burr fail preliminary host-specificity tests. En: (eds Cullen J. M., Briese D. T., Kriticos D. J., Lonsdale W. M., Morin L., Scott J. K.) *Proceedings of the XI International Symposium on Biological Control of Weeds*. CSIRO Entomology, Canberra, Australia, pp. 386-388.

Morin L., Evans K. J. & Sheppard A. W. 2006. Selection of pathogen agents in weed biological control: critical issues and peculiarities in relation to arthropod agents. *Australian Journal of Entomology* 45, 349-365.

Morris M.J., Wood A.R. & den Breyen A. 1999. Plant pathogens and biological control of weeds in South Africa: a review of projects and progress during the last decade. *African Entomology Memoir* 1, 129-137.

Mortensen K. 1986. Biological control of weeds with plant pathogens. *Canadian Journal of Plant Pathology* 8, 229-231.

Múlgura de Romero, M.E., Rotman, A. D. and Atkins, S. 2003. Verbenaceae, tribu Lantaneae, En: (eds A. M. Anton and F. O. Zuloaga). *Flora Fanerogámica Argentina* 84, 1-46.

Müller-Schärer H. & Frantzen J. 2000. How to favour a rust fungus to reduce a weed population. En: (ed. Spencer N. R.) *Proceedings of the X International Symposium on the Biological Control of Weeds*. Montana State University, Bozeman, USA, pp. 596-597.

Mullin B. H., Anderson L. W. J., DiTomaso J. M., Eplee R. E. & Getsinger, K. D. 2000. Invasive plant species. Cast Issue Paper 13, 1-18.

Munir A. A. 1993. A taxonomic revision of the genus *Phyla* Lour. (Verbenaceae) in Australia. J. Adelaide Bot. Gard. 15 (2), 109-128.

Ono Y. 2002. Life cycle and nuclear behavior in three rust fungi (Uredinales). Mycoscience 43, 37-45.

O'Leary N. & Múlgura M. E. 2012. A taxonomic revision of the genus *Phyla* (Verbenaceae). Ann. Missouri Bot. Gard. 98 (4) 578-596.

Parker A., Holden A. N. G. & Tomley A. J. 1994. Host specificity testing and assessment of the pathogenicity of the rust, *Puccinia abrupta* var *partheniicola*, as a biological control of parthenium weed (*Parthenium hysterophorus*). Plant Pathology 43, 1-16.

Pedersen T.M. 1999. Amaranthaceae. En: (eds. Zuloaga F.O., Morrone O.) Catálogo de las plantas vasculares de la Argentina II. Missouri Botanical Garden, pp. 12-31.

Pereira O. L., Barreto R. W. & Waipara N. 2007. Pathogens from Brazil for classical biocontrol of *Tradescantia fluminensis*. En: (eds. Julien, M.H., Sforza R., Bon M.C., Evans H.C., Hatcher P. E., Hinz H.L. and Rector B.G.) Proceedings of the XII International Symposium on Biological Control of Weeds. CAB, International Wallingford, UK, pp. 384-389.

Radosevich S. R., Holt J. S. & Ghersa C. M. 2007. Ecology of Weeds and Invasive Plants. 3th Edition. John Wiley & Sons. 472 pp.

Randall J. M. 1997. Defining weeds of natural areas. En: (eds. Luken J. O. & Thieret J. W.) Assessment and Management of Plant Invasions. Springer-Verlag, New York, pp. 18-25.

Rentería B. J. L. & Ellison C. 2004. Potential biological control of *Lantana camara* in the Galapagos using the rust *Puccinia lantanae*. SIDA 21 (2), 1009-1017.

Ritchie B. J. 2002. Mycological media and methods. En: Plant Pathologist's Pocketbook. (eds. Waller J.M., Lenné J.M. & Waller S.J).CAB International, pp. 410-431.

Sabbatini, M. R., Irigoyen J. H. & Vernava, M. N. 2004. Capítulo 11: Estrategias para el manejo integrado de malezas: problemática, resistencia a herbicidas y aportes de la biotecnología. En: Biotecnología y mejoramiento vegetal. Buenos Aires, 343-354.

Sainty G., Mc Corkelle G. & Julien M. 1998. Control and spread of alligator weed *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. in Australia: lessons for other regions. Wetlands, Ecology and Management 5, 195-201.

- Schmiedeknecht M. 1984. Uredinales aus Kuba. Feddes Repertorium 94, 683-708.
- Schmitz D. C. & Simberloff D. 1997. Biological invasions: A growing threat. Issues in Science. and technology. 13, 33-40.
- Sheley R. L., Kedzie-Webb S. & Maxwell B. D. 2003. Integrated weed management on rangeland. En: (eds. Sheley R. L. & Petroff J. K.) Biology and management of noxious rangeland weeds, pp. 57-68.
- Simmons, E. G. 2004. Novel dematiaceous hyphomycetes. Studies in Mycology 50, 109-118.
- Smith D. 2002. Culturing, preservation and maintenance of fungi. En: Plant Pathologist`s Pocketbook. (eds. Waller J.M., Lenné J.M. & Waller S.J.). CAB International, pp. 384-409
- Sosa A.J., Julien M. & Cordo H.A. 2004. New research on *Alternanthera philoxeroides* (alligator weed) in its South American native range. En: (eds. Cullen J.M., Briese D.T., Kriticos D.J., Lonsdale W.M., Morin L. & Scott J.K.) Proceedings of the XI International Symposium on Biological Control of weeds. CSIRO Entomology, Canberra, Australia, pp. 180-185.
- Sosa, A.J, M.G. Traversa, R. Delhey, M. Kiehr, M.V. Cardo and M.H. Julien. 2008a. Biological control of lippia (*Phyla canescens*): surveys for the plant and its natural enemies in Argentina. En: (eds Julien, M.H., Sforza, R., Bon, M.C., Evans, H.C., Hatcher, P.E., Hinz, H.L. & Rector, B.G.). Proceedings of the XII International Symposium on Biological Control of Weeds. CABI International Wallingford, UK. La Grand Mote, France, pp. 211 - 215
- Sosa A.J., Greizerstein E., Cardo M.V., Telensnicki M.C. & Julien M.H. 2008b. The evolutionary history of an invasive species: alligator weed, *Alternanthera philoxeroides*. En: (eds. Julien M., Sforza M.H., Bon R., Evans H.C., Hatcher P.E., Hinz H.L. & Rector B.G.) Proceedings of the XII International Symposium on Biological Control of Weeds. CABI International Wallingford, UK La Grand Mote, France, pp. 435-442.
- Spegazzini C. 1891. *Phycomycetae argentinae*. Revista Argentina de Historia Natural 1, 28-38.
- Spegazzini C. 1898-9. Fungi argentini novi v. critici. Anales del Museo Nacional de Buenos Aires 6, Ser. 2ª, tomo III, pp. 81-288.
- Spegazzini C. 1909. Mycetes argentinenses. (Series IV). Anales del Museo Nacional de Buenos Aires 19, Ser. III, tomo XII, pp. 257-458.
- Spegazzini, C. 1911. Mycetes argentinenses. (Series V). Anales del Museo Nacional de Buenos Aires 20, Ser. III, tomo XIII, 329-467
- Spegazzini C. 1923. Fungi paraguayenses. Anales del Museo Nacional de Historia Natural de Buenos Aires 31, 355-450

Spegazzini C. 1925. Uredíneas argentinas nuevas o críticas. *Revista Argentina de Botánica* 1 (2/3), 93-145

Stewart C.A., Emberson R.M. & Syrett P. 1996. Temperature effects on the alligator weed flea-beetle, *Agasicles hygrophila* (Coleoptera: Chrysomelidae): implications for biological control in New Zealand. En: (eds. Moran V.C. & Hoffmann J.H.) *Proceedings of the IX International Symposium on Biological Control of Weeds*. University of Cape Town, Stellenbosch, South Africa, pp. 393-398.

Stokes K.E. & Cunningham S.A. 2006. Predictors of recruitment for willows invading riparian environments in south-east Australia: implications for weed management. *Journal of Applied Ecology* 43, 909–921.

Sutton B. C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. En: (eds. Bailey J. A. & Jeger M. J.) *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 1-26.

Tan W.Z. 1993. A species of *Colletotrichum* attacking alligatorweed (*Alternanthera philoxeroides*). En: *Proceedings of Annual Symposium of the Chinese Society for Mycology*, Beijing, China, pp. 87-89.

Tan W.Z. & Gu C.Y. 1993. Biological characteristics of *Colletotrichum* sp. from *Alternanthera philoxeroides*. *Journal of Yunnan Agricultural University* 15, 249-251.

Tan W.Z., Li Q.J. & Qing L. 2002. Biological control of alligatorweed (*Alternanthera philoxeroides*) with a *Fusarium* sp. *BioControl* 47, 463-479.

TeBeest D. O., Yang X. B. & Cisar C. R. 1992. The status of biological control of weeds with fungal pathogens. *Annual Review Phytopathology* 30, 637-657.

Templeton G. E., TeBeest D. O. & Smith R. J. 1979. Biological weed control with mycoherbicides. *Annual Review of Phytopathology* 17, 301-310.

Templeton G. E. 1992. Regulatory encouragement of biological weed control with plant pathogens. En: (eds. Charudattan R. & Browning H. W.) *Regulations and Guidelines: Critical issues in Biological control*. Institute of Food & Agricultural Sciences University of Florida, Gainesville, pp. 61-63.

Thines, M., & O. Spring. 2005. A revision of *Albugo* (Chromista, Peronosporomycetes). *Mycotaxon* 92, 443-458.

Thomas M. B., Casula P. & Wilby A. 2004. Biological control and indirect effects. *Trends in Ecology and Evolution* 19 (2), 61.

Tu M., Hurd C. & Randall J. M. 2001. *Weed Control Methods handbook: tools and techniques for use in natural areas*. The Nature Conservancy. 219 pp.

van Oosterhout E. 2007. Alligator weed, control manual: Eradication and suppression of alligator weed (*Alternanthera philoxeroides*) in Australia. NSW Department of Primary Industries. 90 pp.

Viégas A. P. 1961. Índice de fungos da América do Sul. Instituto Agronomico, Campinas, Brazil. 921 pp.

Vogt G.B. 1973. Exploration for natural enemies of alligator weed and related plants in South America. Biological control of alligator weed. Aquatic Plant Control Program. U.S. Army Engineers, Vicksburg, Mississippi, pp. B3-B66.

Waller, J. M. 2002. Detection and isolation of fungal and bacterial pathogens. En: (eds. Waller J.M., Lenné J.M. & Waller S.J.) Plant Pathologist's Pocketbook. CAB International, pp. 208-215

Wang R. 1989. Biological control of weeds in China: a status report. En: Proceedings of the Seventh International Symposium on Biological Control of Weeds. Rome, Italy, pp. 689-693.

Watson A.K. 1991. The classical approach with plants pathogens. En: (ed. TeBeest D.O.) Microbial Control of Weeds. Chapman & Hall Inc., New York, pp. 3-23.

Weir B. S., Johnston P. R. & Damm U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. Studies in Mycology 73, 115-180

Whapshere A. J. 1989. A testing sequence for reducing rejection of potential biological control agents for weeds. Annals of Applied Biology 114, 515-526.

Williamson M. 1996. Biological Invasions. Chapman & Hall, London. 256pp.

Woudenberg, J. H. C., J.Z. Groenewald, M. Binder & P.W. Crous. 2013. *Alternaria* redefined. Studies in Mycology 75, 171-212.

Xiang M.M., Zeng Y.S., Liu R. & Qin X. 2002. Herbicidal activity of metabolite produced by *Nimbya alternantherae*, a leaf spot pathogen of *Alternanthera philoxeroides*. Chinese Journal of Biological Control 18, 87-89.

## ANEXO 1

**Tabla 1:** Viajes realizados para recolectar *Phyla nodiflora* .

Número de viaje	Provincias	Fecha	Participantes	Objetivos
1	Buenos Aires	16-17 Nov. 2005	Sosa, Cardo y Traversa	Colección de muestras
2	Buenos Aires, Córdoba, San Luis, La Rioja, Catamarca, Salta, Jujuy, Santiago del Estero y Santa Fé.	7-14 Dic. 2005	Sosa, Cardo y Traversa	Muestreos sistemáticos a intervalos de 100-180km. Observación de lugares que por sus características topográficas sugerían la presencia de la planta.
3	Río Negro, Neuquén y Mendoza	2-7 Feb. 2006	Sosa, Cardo y Traversa	Igual que anterior
4	Entre Ríos, Corrientes, Misiones, Chaco y Formosa	26 May-1 Jun 2006	Sosa, Cardo y Traversa	Igual que anterior
5	Jujuy y Salta	27-30 Ago 2006	Sosa, Cardo y Traversa	Muestreo zona Río Zora (cita de roya). Distribución Pn en lugares con menor disturbio.
6	Santiago del Estero, Salta y Jujuy	31 Oct - 5 Nov 2006	Sosa, Telesnicki y Traversa	Búsqueda de EN específicos.
7	Buenos Aires	27-28 Dic 2006	Sosa, Cardo y Traversa	Colección de muestras donde se encontró Pn.
8	Córdoba y Santiago del Estero	20-22 En 2007	Sosa, Telesnicki y Traversa	Observación de lugares que por sus características topográficas sugerían la presencia de la planta.
9	Jujuy, Salta, Tucumán, Santiago del Estero y Buenos Aires	9-15 Feb 2007	Sosa, Traversa y Julien	Observación de lugares que por sus características topográficas sugerían la presencia de la

				planta. Búsqueda de EN específicos.
10	Jujuy y Salta	20-22 Jun 2007	Sosa, Cardo y Traversa	Igual que anterior
11	Santiago del Estero, Tucumán, Jujuy, Salta y Córdoba	23-29 En 2008	Sosa, Telesnicki y Traversa	Igual que anterior
12	Buenos Aires, Rio Negro	5-6 Mar 2008	Sosa, Telesnicki y Traversa	Colección de material para estudios genéticos
13	Santiago del Estero, Salta, Formosa y Chaco	22-28 Jul 2008	Sosa, Telesnicki y Traversa	Muestreos sistemáticos a intervalos de 100-180km en Formosa. Búsqueda de EN específicos.
14	Buenos Aires costa	4-5 Oct 2008	Sosa, Telesnicki y Traversa	Colección de muestras donde se encontró Pn.
15	Rio Negro, La Pampa, San Luis.	18-20 En 2009	Sosa, Traversa y Julien	Búsqueda de EN específicos. Colección de muestras donde se encontró Pn.
16	Chaco, Formosa, Salta y Entre Ríos	20-24 Feb 2009	Sosa, Telesnicki y Traversa	Colección de muestras donde se encontró Pn.
17	Santiago del Estero, Tucumán y Salta.	29 Mar-1 Abr 2009	Sosa, Traversa, Rodriguez	Búsqueda de EN específicos.
18	Entre Ríos, Formosa, Salta y Santiago del Estero	10-14 Nov 2009	Sosa y Traversa	Colección muestras de DNA
19	Formosa, Chaco, Corrientes, Misiones y Entre Ríos	16-22 Feb 2010	Sosa, Traversa y Julien	Búsqueda de EN específicos.
20	Santiago del Estero y Formosa	20-23 Jul 2010	Sosa, Traversa	Muestreos sistemáticos a intervalos de 100-180km en Formosa. Búsqueda de EN específicos.
21	Formosa, Salta, Tucumán y Santiago del Estero.	10-15 En 2011	Sosa, Traversa y Krug	Explorar la zona de Burruyacu (Tucumán) (cita de roya). Búsqueda de EN específicos.

**Tabla 14:** Viajes realizados para recolectar *Alternanthera philoxeroides* n.v. "Lagunilla"

Número de viaje	Provincias	Fecha
1	Entre Ríos, Corrientes, Misiones, Chaco, Formosa, Santa Fe	19-27 En 2005
2	Tucumán, Santiago del Estero, Salta, Jujuy	21-28 Feb 2005
3	Buenos Aires (Tandil)	17-21 Mar 2005
4	Tucumán, Santiago del Estero, Salta, Jujuy	7-13 Abr 2005
5	Bolivia*	19-28 Ago 2007
6	Santa Fé, Formosa, Misiones, Entre Ríos	15-21 Feb 2010

\*Se obtuvo un permiso especial del gobierno de dicho país.

### Medios de cultivo empleados

**Agar papa dextrosado (APD):** papas peladas y cortadas 200 g, agar-agar 13 g, Dextrosa 20 g, agua destilada 1000 ml.

Hervir las papas en 500 ml de agua destilada durante una hora. En el agua restante y en caliente solubilizar el agar. Filtrar las papas hervidas en una malla densa, previa decantación, mezclar el líquido resultante con el agar disuelto, agregando dextrosa. Completar el volumen a 1 litro. Dispensar en tubos de acuerdo a las siguientes cantidades: 10 ml para cultivos en cajas y 5 ml para repiques en tubos inclinados. Colocar los tapones de algodón y esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 minutos (Dhingra & Sinclair, 1985).

**Agar agua (AA):** Agar-agar 13 g, agua destilada 1000 ml. Disolver el agar en el agua y esterilizar en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

**Agar avena-zanahoria** (Dhingra & Sinclair, 1985): 12,5 g avena molida gruesa, 4 g agar, 12,5 ml de jugo de hoja zanahoria, 237,5 ml de agua destilada. Lavar las

hojas de zanahoria, picarlas con procesadora y luego usar mortero. Se filtra con gasa estéril y se obtiene el jugo. Hervir avena por 5 minutos en agua y filtrar con gasa. Agregar el jugo de la hoja al filtrado de avena. Agregar 4g de agar y completar el volumen a 250ml. Colocar en erlenmeyer esterilizados. Ponerlos a baño María durante una hora a fuego mínimo.

**Agar zanahoria decocción** (Dhingra & Sinclair, 1985): Picar 75 g de hojas de zanahorias con procesadora y mezclar con 125 ml de agua destilada. Calentar durante una hora a baño María. Disolver 3 g de agar en 125 ml de agua hasta que quede homogéneo. Agregar al filtrado de zanahoria y llevar a 250 ml. Esterilizar hirviendo una hora a baño María.

**V8** 200ml V8, 3g carbonato de calcio, 12 g agar, 800ml de agua destilada. Se esteriliza en autoclave.

**Agar hoja zanahoria** 225 g hojas zanahoria, 750ml agua destilada, 11,25 g agar.

**Agar hoja phyla** 225g hojas Phyla, 750 ml AD, 11,25 g agar.

En V8, agar hoja zanahoria y agar hoja phyla hervir las hojas por una hora en agua destilada, según la proporción necesaria. Filtrar, extraer el jugo y mezclar con agar-agar. Agregar agua destilada hasta completar el volumen. Esterilizar en autoclave.

**Antibióticos:** Para obtener la solución madre se disolvió 1 g de estreptomicina, en 100 ml de agua destilada. Luego, se incorporaron 20 ml de la solución madre en 1 L de APD (Nelson et al., 1983).



**ANEXO 2****Tabla 16. Distribución geográfica de *Phyla nodiflora* y *Alternanthera philoxeroides*.*****Phyla nodiflora***

<b>Nº de Sitio</b>	<b>FECHA</b>	<b>LUGAR</b>	<b>COORDENADAS</b>	<b>Taxón</b>
1	16/11/2005	Barrio Patagonia. Bahía Blanca	S 38,70-O 62,26	Pnm
2	17/11/2005	Departamento de Agronomía. Estacionamiento. Bahía Blanca	S 38,69-O 62,25	Pnm
3	19/12/2005	Departamento de Agronomía. Laboratorio. Bahía Blanca		Pnm
4 (345)	05/02/2006	Barrio Patagonia. Bahía Blanca		Pnm
10	12/02/2007	Metán. Salta.	S 25.50-O 64.98	Pnn
11	21/03/2006	Rt 11. Entre General Conesa y San Clemente del Tuyú. Km 284.		Pnm
11	05/10/2008	Rt 11. Entre General Conesa y San Clemente del Tuyú. Km 284.		NE
18	09/02/2007	Termas Río Hondo. Río Hondo, Santiago del Estero	S27.51-O64.89	Pnm
18	23/01/2008	Termas Río Hondo. Río Hondo, Santiago del Estero	S27.51-O64.89	Pnm
53	26/05/2006	Rotonda entrada a Goya, Corrientes.	S 29,14 - O 59,24	Pnm
81	28/05/2006	4 km N Rt 16, camino a "Isla del Cerrito", Chaco.	S 27,43 - O 58,85	NE
92	14/02/2007	Rt 30. 23 km N de Tandil. Buenos Aires	S37,12 - O59,04	Pnm
92	17/11/2005	Rt. 30, 23 Km N Tandil.	S 37,12 -O 59,04	Pnm
92	04/03/2006	Rt. 30, 23 Km N Tandil.	S 37,12 -O 59,04	Pnm
128	01/06/2006	Parque Nacional Predelta, Entre Ríos.	S 32,08 - O 60,59	Pnm
144	07/12/2005	Rt 7. Junin. Buenos Aires.	S 34.60 - O 60.96	Pnm
180	13/12/2005	Rt 50. 33km N Orán. Salta.	S 22.87 - O 64.36	Pnr
180	26/01/2008	Orán. Salta.	S22.87-O64.36	Pnr
180	24/07/2008	Orán. Salta.	S 22.87-O 64.36	Pnr
180	30/03/2009	Orán. Salta.	S 22.87-O 64.36	Pnr
186	07/12/2005	Rt 7 km 161 Silveyra. Buenos Aires.	S 34.46 - O 60.04	Pnm
187	07/12/2005	Ruta 7, 7 Km. al E de Iriarte, Buenos Aires.	S34.45-O 61.87	Pnm
188	07/12/2005	Rt 7. km 499. Córdoba.	S 34.13 - O 63.40	NE
189	07/12/2005	Rt 7, 7 km E Villa Mercedes. San Luis.	S 33.6 - O 65.3	NE
190	08/12/2005	Dique Paso de las Carretas.. Entrada Club de Pesca. San Luis	S 33.3 - O 65.88	Pnm

190	22/01/2007	Dique Paso de las Carretas. Entrada Club de Pesca. San Luis.	S 33.3 - O 65.88	Pnm
190	20/01/2009	Dique Paso de las Carretas - Entrada Club de Pesca. San Luis	S 33.3 - O 65.88	Pnm
191	08/12/2005	6km S Dique San Felipe. San Luis.	S 32.85 - O 65.47	Pnm
192	08/12/2005	Rt 2, 11km al S de la unión con Rt 20. San Luis.	S 32.29 - O 65.69	Pnm
193	08/12/2005	Posada Los sauces, Nono. Córdoba.	S 31.8 - O 65.0	NE
194	09/12/2005	Rt 38 km 202, Córdoba.	S 30.62 - O 65.47	NE
195	09/12/2005	Rt 38 km 373, 3 km S Rio Ampiza. La Rioja.	S 29.7 - O 66.8	NE
196	09/12/2005	Rt 38 km 1223, La Rioja.	S 28.44 - O 66.87	NE
197	10/12/2005	Rt 40. 10 km N El Eje. Catamarca.	S 27.22 - O 66.82	NE
198	10/12/2005	Rt 40. Alrededores de Cafayate. Salta.	S 26.06 - O 65.95	ND
199	10/12/2005	Rt 40. 9 km E of Alemania. Salta.	S 25.58 - O 65.57	Pnr
200	11/12/2005	Quebrada San Lorenzo. Salta.	S 24.72 - O 65.50	NE
201	11/12/2005	Rt 9. Volcán. Quebrada Humahuaca. Jujuy.	S 23.92 - O 65.46	Pnm
201	10/02/2007	Rt 9. Volcán. Quebrada Humahuaca. Jujuy.	S 23.92 - O 65.46	Pnm
201	25/01/2008	Rt 9. Volcán. Quebrada Humahuaca. Jujuy.	S 23.92 - O 65.46	Pnm
202	11/12/2005	Rt 9. km 319. 4 km S Posta Hornillos. Jujuy.	S 23.68 - O 65.44	NE
203	12/12/2005	Unión Rt 1 y Rt 34. Jujuy.	S 24.27 - O 64.85	NE
204	12/12/2005	Rt 1, km 16, Jujuy.	S 24.00 - O 64.55	Pnr
204	11/02/2007	Rt. 1, km 16, Jujuy	S 24.00 - O 64.55	Pnr
204	22/06/2007	Rt 1 km 16. Jujuy.	S 24.00 - O 64.55	Pnr
205	12/12/2005	Rt 34.11 km S Pichanal. Salta.	S 23.4 - O 64.3	Pnr
205	20/06/2007	Rt 34.11km S Pichanal. Salta.	S 23.4 - O 64.3	Pnr
205	26/01/2008	Rt 34.11km S Pichanal. Salta.	S 23.4 - O 64.3	Pnr
205	23/07/2008	Rt 34.11km S Pichanal. Salta.	S 23.4 - O 64.3	Pnr
205	30/03/2009	Rt 34.11km S Pichanal. Salta.	S 23.4 - O 64.3	Pnr
205	13/11/2009	Rt 34.11km S Pichanal. Salta.	S 23.4 - O 64.3	Pnr
205	22/07/2010	Rt 34.11km S Pichanal. Salta.	S 23.4 - O 64.3	Pnr
205	13/01/2011	Rt 34.11km S Pichanal. Salta.	S 23.4 - O 64.3	Pnr
205	27/08/11	Rt 34.11km S Pichanal. Salta.	S 23.4 - O 64.3	Pnr
206	13/12/2005	Rt 5, km 201. Salta.	S 23.93 - O 64.04	NE
207	13/12/2005	Rt 20. 5 km Rt 5. Entrada Parque Nacional El Rey. Salta.	S 24.99 - O 64.59	Pnm

208	13/12/2005	Rt 5 y Rt 20. 50 km Las Lajitas. Entrada PN El Rey. Salta.	S 25.03 - O 64.58	Pnm
209	13/12/2005	Rt 5 30 km SO gps 208, Salta.	S 24.91 - O 64.42	Pnm
210	14/12/2005	Rt 16. km 529. Salta.	S 25.50 - O 63.60	NE
211	14/12/2005	Rt 16. Monte Quemado. Santiago del Estero.	S 25.82 - O 62.82	Pnm
211	31/10/2006	Rt 16. Monte Quemado. Santiago del Estero.	S 25.82 - O 62.82	Pnm
212	14/12/2005	Rt 14. 2 km NO Pampa de los Guanacos. Santiago del Estero.	S 26.22 - O 61.86	Pnm
213	14/12/2005	Rt 6. km 70.12 km NE de Otumpa. Santiago del Estero.	S 27.22 - O 62.10	NE
214	14/12/2005	Rt ex 94. 3 km NE Vilelas. Santiago del Estero.	S 27.93 - O 65.59	NE
215	14/12/2005	Rt 19. 2 km E Rt 34. Santa Fé.	S 31.55 - O 61.44	NE
216	09/02/2007	Rt 34.Lugones, Santiago del Estero	S 28.31- O 63.36	Pnr
217	15/02/2007	San Miguel del Monte. Alrededores de laguna. Buenos Aires.	S 35.45- O 58.79	Pnm
218	02/02/2006	Rt 3 km 892, Buenos Aires.	S 40.17- O 62.65	NE
219	02/02/2006	Rt 3 km 1059, Rio Negro	S 40.71- O 64.07	NE
220	02/02/2006	Rt 2 56 km N San Antonio Oeste, Rio Negro.	S 40.26 -O 65.11	Pnm
221	03/02/2006	Santuario Ceferino.Chimpay. Rio Negro.	S 39.17- O 66,13	Pnm
221	18/01/2009	Santuario Ceferino.Chimpay. Rio Negro.	S 39.17- O 66,13	Pnm
222	03/02/2006	Balneario General Roca. Rio Negro.	S 39,09- O 67,57	Pnm
222	19/01/2009	Balneario General Roca. Rio Negro.	S 39,09-O 67,57	Pnm
223	03/02/2006	Rt 237. km 1355. Picún Leufú. Neuquén.	S 39,55 - O 69,31	NE
224	04/02/2006	Rt. 65, Camping Villa Traful, margen sur Lago Traful, Neuquén	S 40,66 - O 71,35	NE
225	04/02/2006	Rt. 234, Junín de los Andes, Neuquén	S 39,93 - O 71,06	NE
226	05/02/2006	Rt 40. 34 km S Chosmalal. Neuquén	S 37,61 - O 70,16	NE
227	05/02/2006	Rt 40. 20 km N Barrancas. Mendoza.	S 36,64 - O 69,83	NE
228	05/02/2006	Rt. 40, cruce Río Atuel, El Sosneado, Mendoza	S 35,08 - O 69,59	NE
229	06/02/2006	Tunuyán. Mendoza.	S 33,6 - O 69,01	NE
230	07/02/2006	San Martin. Mendoza.	S 33,12 - O 68,53	NE
231	07/02/2006	Rt. 7 (y 49), km 844, Alto Pencoso, San Luis	S 33,43- O 66,94	NE
232	04/03/2006	Paseo de la Cascada (Sierras). Tandil.	S 37,36 -O 59,1	NE
233	04/03/2006	Rt 226. 50 km S Tandil	S 37,58- O 58,74	Pnm
234	04/03/2006	4 km S Rt 88. Entrada balneario Costa Bonita. Necochea.	S38.54-O58.64	Pnm
235	05/03/2006	Rt 3 km 520 25 km S Tres Arroyos.	S38.52-O60.51	Pnm

235	27/12/2006	Rt 3 km 520, 25 km S Tres Arroyos.	S38.52-O60.51	Pnm
236	05/03/2006	40 km S Tres Arroyos. Copetonas	S 38, 71- O 60,45	Pnm
236	27/12/2006	40 km S Tres Arroyos. Copetonas	S 38, 71- O 60,45	Pnm
237	05/03/2006	Rt 78. Entrada playa Monte Hermoso.	S 38,98 -O61,28	Pnm
243	26/05/2006	Rt 12, 1 km S Esquina, Corrientes.	S 30,05- O 59,53	NE
244	26/05/2006	Rt 27, 18 km S Bellavista, Corrientes.	S 29,02 - O 59,17	NE
245	26/05/2006	Rt 118 km 29, Corrientes.	S 28,34 - O 58,43	NE
246	26/05/2006	RT 118, 37 km SO Loreto, Corrientes.	S 27,97 - O 57,58	NE
247	26/05/2006	Rt 12, km 1240. Corrientes.	S 27,63 - O 56,83	NE
248	27/05/2006	Rt 14, km 787, 2km NE Centinela, Misiones.	S 27,77 - O 55,81	NE
249	28/05/2006	Rt 118, 4km NE from Loreto, Km 172. Misiones.	S 27,75 - O 57,25	NE
250	28/05/2006	Rt 5, 5km E San Luis del Palmar, Corrientes.	S 27,55 - O 58,52	NE
251	28/05/2006	Rt 11, Monumento Margarita Belén Chaco.	S 27,12 - O 58,97	Pnm
252	28/05/2006	Camping Chuqui Cué, Herradura, Formosa.	S 26,48 - O 58,28	Pnm
253	28/05/2006	Cerca Camping Chuqui Cué, Herradura, Formosa.	S 26,49 - O 58,29	Pnm
254	29/05/2006	Camino a Mariano Boedo. 26 km de ciudad de Formosa. Formosa.	S 26,02 - O 58,39	NE
255	29/05/2006	Rt 81, km 1302. Formosa.	S 25,58 - O 59,23	NE
256	29/05/2006	3 km S Ibarreta Rt 27, Formosa.	S 25,23 - O 59,87	Pnm
257	29/05/2006	Rt 27, casi cruce Rt 95. Formosa.	S 25,34 - O 59,94	Pnm
258	29/05/2006	Rt 5, 2 km S Rio Bermejo. Chaco	S 25,62 - O 60,08	Pnm
259	30/05/2006	1 km S Rt 16, 49 km O de Makallé, Chaco.	S 27,07 - O 59,71	Pnm
260	31/05/2006	Cruce Rt 127 y Rt 14, Cuatro Bocas, Corrientes.	S 30,07 - O 58,00	NE
261	31/05/2006	Rt 127 km 248, Entre Ríos.	S 30,60 - O 58,47	NE
262	31/05/2006	km 146, Rt 127, Sauce de Luna, Entre Ríos.	S 31,24 - O 59,21	Pnm
263	01/06/2006	Parque Urquiza. Barranca Rio Paraná, Entre Ríos.	S 31,71 - O 60,53	NE
264	01/06/2006	Entrada del Parque Nacional Predelta, Entre Ríos	S 32.11-O 60.63	Pnr y Pnm
264	24/02/2009	Entrada del Parque Nacional Predelta, Entre Ríos	S 32.11-O 60.63	Pnr y Pnm
264	10/11/2009	Entrada del Parque Nacional Predelta, Entre Ríos	S 32,11 - O 60,63	Pnr y Pnm
264	22/02/2010	Entrada Parque Nacional Predelta, Entre Ríos	S 32,11 - O 60,63	Pnr y Pnm
264	10/01/2011	Entrada del Parque Nacional Predelta, Entre Ríos	S 32,11 - O 60,63	
265	01/06/2006	Rt 11, Rincón de Nogoyá, Arroyo Nogoyá, Entre Ríos.		NE

268	30/08/2006	Pista de aterrizaje, PN El Rey	S 24,728-O 64,64	Pnm
270	09/02/2007	Cruce Rt. 18 y Rt. 34, Forres, Santiago del Estero	S 27.87- O 63.97	Pnm
271	20/01/2007	Rt. 1, pocos km NO Robles, Sgo. del Estero	S27,99-O 64,017	Pnm
271	13/02/2007	Rt. 1, pocos km NO Robles, Sgo. del Estero	S27,99-O64,017	Pnm
271	28/01/2008	Rt. 1, pocos km NO Robles, Santiago del Estero	S27,99-O64,017	Pnm
271	22/07/2008	Rt. 1, pocos km NO Robles, Santiago del Estero	S27,99-O 64,017	Pnm
272	24/07/2008	Rt. 50, 200 mts S Río Pescado, Salta	S 22.97-O64.37	Pnr
276	01/11/2006	Rt 5. General Pizarro. Salta	S 24.23-O 63.98	Pnr
277	02/11/2006	PN El rey. Salta	S 24.72-O 64.19	Pnr
278	03/11/2006	Rio Popayan. El Rey. Salta	S 24.72-O 64.19	Pnr
279	03/11/2006	Camino a la entrada a Pozo Verde. El Rey. Salta.	S 24.72-O 64.64	Pnr
280	05/11/2006	PN Copo. Santiago del Estero.	S 25.91-O 61.71	NE
282	27/12/2006	Sauce Grande	S 38,59-O 61,89	Pnm
283	28/12/2006	Rt 11 km 423, Entrada playa Mar Azul.	S 37,33-O 57,06	Pnm
284	28/12/2006	Rt 11 10 km S Nueva Atlantis Km. 361	S 36,85- O 56,69	Pnm
285	28/12/2006	San Clemente del Tuyú	S 36,34-O 56,74	Pnm
287	11/01/2011	Rt 3. 24km SW de Pirané. Formosa.	S 25,92- O 59,26	Pnm
289	09/02/2007	Rt 34. Pintos. Santiago del Estero.	S 33,92-O 64,44	Pnm
291	10/02/2007	Rt 9. 5 km Norte Volcan. Jujuy.	S23,87-O65,45	Pnm
292	28/08/2006	7 km N Gral. San Martin. PN Calilegua. Jujuy.	S 23.75-O 64.85	Pnr
292	01/11/2006	7 km N Gral. San Martin. PN Calilegua. Jujuy. Lagunita	S 23.75-O 64.85	Pnr
292	11/02/2007	7 km N Gral. San Martin. PN Calilegua. Jujuy.	S 23.75-O 64.85	Pnr
292	20/06/2007	7 km N Gral. San Martin. PN Calilegua. Jujuy.	S 23.75-O 64.85	Pnr
292	27/01/2008	7 km N Gral. San Martin. PN Calilegua. Jujuy.	S 23.75-O 64.85	Pnr
293	12/02/2007	Rt 9. Pocos km de Rosario de la Frontera. Salta.	S25,74- O64,94	Pnm
294	12/02/2007	Cruce Rt 336 y 304. 1 km S de Burreyacu. Tucuman.	S26,51 O64,75	Pnn y Pnm
294	29/03/2009	Cruce Rt. 36 y Rt. 304, 1 Km. S Burreyacu, Tucumán	S 26,51 O 64,75	Pnn y Pnm
294	21/07/2010	Cruce Rt. 36 y Rt. 304, 1 Km. S Burreyacu, Tucumán	S 26.51- O 64.75	Pnn y Pnm
295	27/08/2006	Burreyacu. Tucuman.	S 26.46-O 64,74	Pnn
295	12/02/2007	Burreyacu, camino a "El puestito". Tucuman.	S26,46 O64,74	Pnn
295	29/03/2009	Burreyacu, camino a "El puestito". Tucuman .	S 26,46 O 64,74	Pnn

295	21/07/2010	Burruyacu, camino a "El puestito". Tucumán.	S 26.46- O 64.74	Pnn
295	14/01/2011	Burruyacu, camino a "El puestito". Tucumán.	S26,46 O64,74	Pnn
297	14/02/2007	Rt 226. 1 km E Bolivar. Buenos Aires.	S36,25- O61,09	Pnm
298	20/06/2007	Rt 34, 20 km N San Pedro, curva via del tren. Jujuy.	S 24.10- O 64.82	Lippia alba
299	21/06/2007	Rt 34, Coronel Cornejo, Salta.	S 22.74 - O 63.82	Pnr
300	21/06/2007	Dique Itiyuro. 3 km S Salvador Mazza. Salta.	S 22.10- O 63.73	Pnr
336	23/01/2008	Rt. 9, aprox. 50 Km. S de Termas de Río Hondo, Santiago del Estero	S 27.70- O 64.47	Pnm
338	26/01/2008	Rt. 9, Volcán, adentro del pueblo, Jujuy.	S 23.91- O 65.46	Pnn
339	26/01/2008	Rt. 29 cerca de Lozano, Jujuy	S 24.05-O 65.41	Pnm
340	28/01/2008	Rt. 9 Km 1115,5, 3 Km N Santa María, Santiago del Estero	S 27.94- O 64.22	Pnm
342	28/01/2008	Rt. 9 Km. 903, 32 km. S de Ojo de Agua, Córdoba	S 29.71-O 63.72	Pnm
343	29/01/2008	Miramar, Córdoba	S 30.91-O 62.67	Pnm
344	29/01/2008	Rt. 19, 1500 m del cruce con Rt. 34, Santa Fé	S 31.53- O 61.54	Pnm
348	24/07/2008	Rt 81, 10km SE Hickman. Salta.	S 23.22-O 63.47	NE
350	24/07/2008	Rt 81, Km 1682, 60 km NO Guillermo Juarez Formosa.	S 23.69 O 62.30	Pnn
350	22/02/2009	Rt 81, Km 1682, 60 km NO Guillermo Juarez Formosa.	S 23.69- O62.30	Pnn
350	12/11/2009	Rt 81, Km 1682, 60 km NO Guillermo Juarez Formosa.	S 23.69- O 62.30	Pnn
350	17/02/2010	Rt 81, Km 1682. 60 km NO Guillermo Juarez. Formosa	S 23,69- O 62,30	Pnn
350	22/07/2010	Rt 81, Km 1682,60 km NO Guillermo Juarez Formosa.	S 23,95- O 62,30	Pnn
350	12/01/2011	Rt 81, Km 1682, 60 km NO Guillermo Juarez Formosa.	S 23,69-O 62,30	Pnn
351	25/07/2008	Rt 3. Pirané. 200m Sociedad Rural. Formosa	S 25.76- O 59.11	Pnm
351	23/02/2009	Rt 3. Pirané. 200m Sociedad Rural. Formosa.	S 25,76 -O 59,11	Pnm
351	11/01/2011	Rt 3. 200 mts Sociedad Rural de Pirane, Formosa.	S 25,76-O 59,11	Pnm
352	25/07/2008	Rt 3. 3km N Villa Dos Trece. Formosa.	S 26.16-O 59.34	Pnm
352	11/01/2011	Rt 3, 3 km N from Villa Dos Trece, Formosa.	S 26,16- O 59,34	Pnm
353	11/01/2011	Gral San Martin. Chaco.		NE
354	25/07/2008	Rt 90. 2km S Eduvigia, Chaco.	S 26.84-O 59.05	Pnm
354	11/01/2011	Rt 90, 2 km S Eduvigia, Chaco, Argentina	S 26,84- O 59,05	Pnm
355	26/07/2008	Rt 11 km 1044, 500 m S empalme Rt 90, 2 km S Margarita Belén, Chaco.	S 27.09-O 58.96	Pnm
357	27/07/2008	Rt 11 Km 945. 2 km S Basail. Chaco.	S 27,89- O59.27	Pnm

370	18/01/2009	30 km O Rio Colorado Rt 22. Rio Negro.	S 39,05-O 64,43	Pnm
371	18/01/2009	Choele Choele. Rio Negro.	S 39,29-O 65,66	Pnm
372	18/01/2009	Rt 22. Entrada Choele Choele. Al lado del ACA. Rio Negro	S 39,28-O 65,66	Pnm
373	19/01/2009	Rt 107. 2 Km Sur del cruce con Rt 143. La Pampa.	S 37,33-O 66,48	Pnm
374	19/01/2009	Rt 143. 26 km N Limay Mahuida. La Pampa.	S 36,96-O 66,72	Pnm
375	20/01/2009	14 km de General Alvear. Mendoza	S 34,86-O 67,78	Pnm
376	20/01/2009	Rt 146. Rio límite entre San Luis y Mendoza. San Luis.	S 34,08-O 66,7	Pnm
379	20/02/2009	PN Chaco. Rt 7. 4 km N Palmar, Chaco.	S 26,78-O 59,71	Pnr
381	20/02/2009	Rt 7. Entrada Presidencia de la Plaza. Chaco.	S 26,98-O 59,85	Pnm
382	21/02/2009	Rt 95, Perin Formosa	S 25,53-O 60,01	Pnn
383	21/02/2009	Rt 95, 1 km NE de Perin Formosa	S 25,49- O 59,98	Pnn
387	23/02/2009	57 km de Resistencia. Isla del Cerrito. Chaco.	S27,41-O 58,84	Pnr
388	23/02/2009	Camino a Isla del Cerrito, Chaco	S27,32- O 58,77	Pnm
390	29/03/2009	Rt 34 Km 766, 40Km NO La Banda, Santiago del Estero	S 27.39-O 64.31	Pnm
391	29/03/2009	3 km N Rio Urueña, 17 km Rt 34. Salta.	S 26.21-O 64.63	Pnr
401	31/03/2009	2 km N Arroyo. Cabeza de Buey. Km 1550. Rt 34. Salta.	S 24.77-O 65.03	Pnn
403	31/03/2009	4 km N Trancas Rt 9, Tucuman.	S 26.22-O 65.24	Pnm
404	01/04/2009	40 km SE Simoca. Rt 157. Tucuman.	S 27.67- O 65.23	Pnm
405	01/04/2009	Rt 6, 6 km SO Frías, Santiago del Estero.	S 28.61- O65.10	Pnm
405	14/11/2009	Rt 6, 6 km SO Frías, Santiago del Estero.	S 28,61- O65.10	Pnm
405	20/07/2010	Rt 6, 6 km SO Frías, Santiago del Estero.	S 28.61- O65.10	Pnm
405	15/01/2011	Rt 6, 6 km SO Frías, Santiago del Estero.	S 28,61- O65.10	Pnm
406	01/04/2009	1 km O Choya. Santiago del Estero.	S 28.50- O 64.86	Pnm
406	15/01/2011	1 km O Choya. Santiago del Estero.	S 28,50-O 64,86	Pnm
407	01/04/2009	Rt. 9, Monte Redondo, "casa de Juana", Santiago del Estero	S 28.63-O 64.09	Pnm
416	12/11/2009	2 km Las Lomitas, Formosa.	S 24.69- O 60.61	Pnn y Pnr
416	12/01/2011	2 km Las Lomitas, Formosa.	S 24,69-O 60,61	Pnn y Pnr
417	13/11/2009	11 km NE Santiago del Estero. Rt 34. Santiago del Estero	S 27.74- O 64,18	Pnr
423	12/01/2011	Rt 81 Juan Bazán, Formosa.	S 24,54 -O 60,81	Pnr
425	20/07/2010	Rio Namby, brazo del río Saladillo. Loreto. Santiago del Estero.	S 28.33-O 64.19	Pnm
425	15/01/2011	Rio Namby, brazo del río Saladillo. Loreto. Santiago del Estero.	S 28,33-O 64,19	Pnm

426	17/02/2010	Camino Lag Yema. Rt 37. Formosa.	S 24,26-O 61,25	Pnm
426	12/01/2011	Pueblo Laguna Yema. Camino a Laguna Yema. Formosa.	S 24,26-O 61,25	Pnm
427	17/02/2010	Rt 88. Cerca de Las Lomitas. Formosa.	S 24,69-O 60,58	Pnm
439	22/07/2010	10 km Oeste Capital Page. Rt 81 13 km Oeste 350. km 1695.Salta.		Pnn
440	23/07/2010	Rt 37. Al oeste Laguna Yema, complejo hídrico R-TeucoLaguna Yema.Formosa	S 24,32-O 61,29	Pnn
440	12/01/2011	Camino Lag Yema. Rt 37. Formosa.	S 24,32-O 61,29	Pnn
441	23/07/2010	Rt 37. Al oeste Laguna Yema, complejo hídrico R-TeucoLaguna Yema.Formosa Rt 28. 17km SO Las Lomitas. Camino entre Las Lomitas y el Bañado rio Pilcomayo.	S 24,42- O 61,33	Pnn y Pnr
442	23/07/2010	Formosa	S 24,58- O 60,49	Pnn
443	23/07/2010	Rt 28. Camino entre Las Lomitas y el Bañado rio Pilcomayo. Formosa	S 24,43- O 60,36	Pnn
444	23/07/2010	Rt 28. Camino entre Las Lomitas y el Bañado rio Pilcomayo. Formosa	S 24,50- O 60,42	Pnn
455	14/01/2011	Burruyacu Tucumán.	S 26,47-O 64,741	Pnn
456	14/01/2011	5 km N Rt 34 y de Pozo Hondo. Rt 130. Santiago del Estero.	S 27,12- O 64,52	Pnm
457	14/01/2011	Km 764 Rt 34. Santiago del Estero.	S 27,407- O 64,30	Pnm
458	15/01/2011	Km 51 Rt 64. Santiago del Estero.	S 28,02-O 64,60	Pnm
459	15/01/2011	km 89 Rt 64 Santiago del Estero.	S 28,16-O 64,94	Pnm
460	16/01/2011	Santiago del Estero.	S 28,57- O65,11	Pnm, Pnr, Pnn
s/nº	28/08/2006	Rt 34. 5 km N Puesto Gendarmería. Río Zora. Salta.		NE
s/nº	29/08/2006	Las Lajitas. Salta.		NE
s/nº	29/08/2006	PN El rey. Salta.		NE
s/nº	21/01/2007	Rt 14. Camino a Copina. Córdoba.	S28,52-O 64,13	NE
s/nº	24/07/2008	7 km SE Pluma de Pato, Km 1763. Salta.	S 23.39-O 63.04	NE
s/nº	25/07/2008	Rt 81, km 1458, 9km del Hotel Portal Oeste, Las Lomitas. Formosa.		NE
s/nº	25/07/2008	Rt 81, 5 km SE Ibarreta Km 1372. Formosa		Pnr
s/nº	25/07/2008	Rt 81. 3 km SE Fontana. km 1323. Formosa.		NE
s/nº	25/07/2008	Rt 90. 2km S San Martín. Formosa.	S 26,56- O 59.32	NE
s/nº	27/07/2008	Rt 11 km 994. 6km S Resistencia. Chaco.	S 27.50- O 59.09	NE
s/nº	28/07/2008	Rt 11 Km 895. 3 Km N Las Toscas. Santa Fé.	S 28.31- O59.26	NE
s/nº	28/07/2008	Rt 11 Km 845.15 Km N Las Garzas. Santa Fé.	S 28.72- O 59.44	NE
s/nº	29/03/2009	Rt 34. km 766. 40 km NE La Banda. Santiago del Estero province.		NE

s/nº	04/10/2008	40 km S Tres Arroyos. Copetonas	NE
s/nº	04/10/2008	Tres Arroyos	NE
s/nº	05/10/2008	Mar del Plata	NE
s/nº	05/10/2008	Laguna de los Padres	NE
s/nº	05/10/2008	Sierra de los Padres.	NE
s/nº	05/10/2008	Cerca gps 284	NE
s/nº	07/05/2009	Ensenada	Pnm
s/nº	22/03/2010	Hurlingham	Pnm

NE: no se encontraron plantas de Phyla

### *Alternanthera philoxeroides*

GPS	Fecha	Lugar	Coordenadas
		<b>Noroeste</b>	
8	22/02/05,8/04/05	Salta capital, provincia de Salta	S24,77-O 65,43
9	22/02/05,8/04/05	Salta capital, provincia de Salta	S 24,77-O 65,43
12	23/02/05,9/04/05	Tafí viejo, Tucumán	S 26,74-O 65,27
18	24/02/05,9/04/05	Dique Río Hondo, Santiago del Estero	S 27,50-O 64,89
26	24/02/05,10/04/05		
140	25/02/05,10/04/05	Rt 338, Lules, Tucumán.	S 26,91-O 65,32
141	25/02/05,10/04/05	Rt 324, camino a Tafí del Valle, Tucumán	S 27,10-O 65,51

142	25/02/05,11/04/05	Rt 68, Camino desde San Lorenzo (Salta) a Jujuy	S 24,70-O 65,46
173	26/02/05,11/04/05	Rt 68, 20 km SO de Salta Capital	S 24,93- O 65,48
175	27/02/05,11/04/05	Rt 9, afueras de ciudad Tucumán	S 26,86-O 65,16
180	22/02/05,8/04/05	Rt 50. 33km N Orán. Salta	S 22,87-O 64,36
337	23/01/2008	Sitio al lado de Proimmi (CONICET), Tucumán.	S 26.81- O 65.24
392	30/03/2009	Rt 9 Km 1642. Salta.	S 24.54-O 65.37
<b>Buenos Aires</b>			
33	19/03/05	Rt. 226, 26 Km N Tandil,	S 37,16-O 59,42
34	19/03/05	Rotonda entrada Azul	S 36,85-O 59,90
92	19/03/05	Rt. 30, 23 Km N Tandil.	S 37,12 -O 59,04
93	20/03/05	Rt. 3 Km 108, Monte	S 35,41-O 58,8
126	20/03/05	Rt. 3 cerca de Cañuelas	S 35-O 58,74
160	20/03/05	Rt. 7, cerca San Andres de Giles	S 34,53-O 59,26
177	20/03/05	Rt 3 8 km Sur Cañuelas	S 35,12-O 58,73
<b>Noreste</b>			
80	22/01/05	Cerca de YPF, camino a Isla del Cerrito, Chaco	S 27,44-O 58,89
130	23/01/05	100 mts ruinas San Ignacio, Misiones.	S 27,25 -O 55,53
163	24/01/05	Isla del Cerrito, Chaco	S 27,42-O 58,82
164	25/01/05	Herradura, Rio Paraguay, Formosa	S 26,51-O 58,28
165	25/01/05	Rt. 11, 50 m N entrada Herradura, Formosa	S 26,39-O 58,34
105	16/02/10	Vera Santa Fé	S 29,46-O 60,19
130	19/02/10	100 mts ruinas San Ignacio, Misiones.	S 27,25 -O 55,53
428	20/02/10	San Ignacio, Misiones	S 27,25-O 55,53
<b>Bolivia</b>			
301	21/08/07	Coroico, Dto de la Paz, camino a Uchumachi.	S 16,19-O 67,72
302	21/08/07	Coroico, camino a Cascadas	S 16,22-O 67,68
303	21/08/07	Camino al Rio Coroico, Coroico.	S 16,185- O 67,73
304	25/08/07	Puerto Tiquina. Lago Titicaca.	S 16,21- O 68,84

S/Nº	26/08/07	Provincia Ichilo, 2km SO Buena Vista. Depto. Sta Cruz de la Sierra.	S 17,46-O 63,66
305	27/08/07	Prov. Cordillera, Abapó. Sta Cruz de la Sierra.	S 18,90-O 63,38
306	27/08/07	Prov. Cordillera, Rio Seco. Sta Cruz de la Sierra.	S 18,64-O 63,29