

**CATASTRO Y PATOGENICIDAD DE HONGOS PARA EL CONTROL
BIOLÓGICO DEL JACINTO DE AGUA *EICHHORNIA CRASSIPES*
(MART.) SOLMS Y SU INTERACCIÓN CON *NEOCHETINA*
EICHHORNIAE (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)**

Por

Dianne I. Ortiz Rivera

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

MAESTRO EN CIENCIAS

EN

PROTECCIÓN DE CULTIVOS

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2008

Aprobado por:

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

Fecha

Juan G. Pérez Bolívar, Ph.D.
Miembro Comité Graduado

Fecha

Edwin Abreu, M.S.
Miembro Comité Graduado

Fecha

Nelson Semidey Laracuenta, Ph.D.
Presidente Comité Graduado

Fecha

Duane A. Kolterman, Ph.D.
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Arístides Armstrong, M.S.
Director de Departamento

Fecha

ABSTRACT

Fungal pathogens and insects have been used for years as a successful strategy in the control of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). A survey was conducted to identify and evaluate fungal isolates as potential biological control agents of water hyacinth in Puerto Rico during 2002 to 2003. One hundred fifty four fungal isolates were identified from water hyacinth leaves; some species such as *Alternaria* sp. and *Myrothecium roridum* have been previously reported as pathogens. Pathogenicity tests conducted *in vitro* with *Alternaria* sp., *M. roridum* and *Glomerella cingulata* (teleomorph of *Colletotrichum gloesporioides*) isolates confirmed their pathogenicity to water hyacinth leaves showing significant tissue damage. Disease incidence and severity were evidenced by leaf necrosis caused by all pathogens evaluated. To evaluate insect (weevil) *Neochetina eichhorniae* potential to disseminate fungal diseases, combinations of each fungal isolate were tested on whole plants during two experiments under greenhouse conditions. Greenhouse tests confirmed that all three isolates can be disseminated by *N. eichhorniae*. Higher fungal disease incidence and severity was obtained with individual pathogens rather than pathogen and insects combinations. The *Alternaria* sp. isolate, evaluated during this study, was found to be the best candidate for biological control of water hyacinth, both *in vitro* and under greenhouse conditions. Combined weevil and fungal pathogen could be a good control for water hyacinth weed. Future studies focused on the assessment of the pathogenicity of fungal pathogens of water hyacinth and their relationship with *N. eichhorniae* are needed.

RESUMEN

El control biológico mediante la utilización de hongos patógenos e insectos ha sido una de las estrategias más utilizada en el control del jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*). Se realizó un catastro de hongos para identificar y evaluar hongos con potencial para el control del jacinto de agua, en Puerto Rico durante 2002 y 2003. Un total de 154 colonias de hongos se aislaron de plantas de jacinto de agua incluyendo especies de *Alternaria* sp. y *Myrothecium roridum* que han sido reportados como patógenos de esta planta. Se realizaron pruebas de patogenicidad *in vitro* con los aislados de *Alternaria* sp., *M. roridum* y *Glomerella cingulata* (estado teleomorfo de *Colletotrichum gloeosporioides*) y se confirmando su patogenicidad causando daños significativos en las hojas. Todos los hongos evaluados desarrollaron lesiones necróticas foliares que evidenciaron la incidencia y severidad de la enfermedad. Para evaluar el potencial del picudo *Neochetina eichhorniae* en la diseminación de las enfermedades fúngicas, se realizaron ensayos de la combinación de los tres patógenos en dos experimentos bajo condiciones de invernadero. Los experimentos de invernadero confirmaron que *N. eichhorniae* puede diseminar de forma parcial los tres hongos patógenos en estudio. Se obtuvo mayor incidencia y severidad de la enfermedad mediante la inoculación individual de los hongos en comparación con combinación de hongos e insectos. El aislado de *Alternaria* sp. evaluado en este estudio fue el mejor candidato para el control del jacinto de agua *in vitro* y bajo condiciones de invernadero. La combinación del picudo *N. eichhorniae* con los hongos patógenos puede ser una alternativa de control viable para obtener un buen control de

esta maleza. Se recomienda realizar estudios que evalúen la patogenicidad de hongos patógenos del jacinto de agua y su interacción con especies del picudo *Neochetina*.

DEDICATORIA

Al único Dios verdadero, aquel que me regaló la vida y las fuerzas para poder ser quien hoy soy. A Ti porque cuando sentí temor me enseñaste que de ti proviene el conocimiento y la ciencia y tú das sabiduría a aquel que sabe pedir.

A toda mi familia, mis padres y mis hermanos: Nancy, Dulcilio, Jenny, Adria, Adaliz, Zulma, Emmanuel, José y a todos mis sobrinos, los Amo con todo mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas aquellas personas que de alguna manera hicieron posible esta investigación.

En especial al Dr. Nelson Semidey Laracuente, por brindarme la oportunidad de realizar esta investigación, por ser más que un consejero, mi amigo y mi apoyo. Gracias por confiar en mí y brindarme su cariño y comprensión. Sin su apoyo hubiera sido imposible.

A la Dra. Lydia I. Rivera Vargas por todo su apoyo, ayuda y confianza. Por las sugerencias y correcciones de la tesis.

Al Biol. Edwin Abreu por brindar de sus conocimientos y sugerencias durante la investigación. Por facilitarme el uso de materiales y poner a mi disposición el Programa de Control Biológico de la Estación Experimental Agrícola de Isabela.

Al Dr. Juan G. Pérez Bolívar por su colaboración y por formar parte del comité graduado.

A mi amigo y Agro. Carlos J. Castillo Navarro por su ayuda en la recolección de muestras y la realización de los experimentos de campo.

A mi amiga y Agro. Lilliam Cardona por su ayuda en la redacción de la tesis, por su apoyo y por darme ánimo en los peores momentos.

A mis compañeros y amigos Rosimar, Yazmín, Daniel, Josué y Luis por darme sugerencias y palabras de aliento cuando los necesité.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	8
REVISIÓN DE LITERATURA	9
MATERIALES Y MÉTODOS	17
1. Catastro e identificación de patógenos.....	17
2. Pruebas de patogenicidad <i>in vitro</i>	18
3. Diseminación de hongos patógenos por <i>Neochetina eichhorniae</i> bajo condiciones de invernadero.....	19
Experimento 1.....	19
Experimento 2.....	21
4. Análisis Estadístico.....	21
RESULTADOS	22
1. Catastro e identificación de patógenos.....	22
2. Pruebas de patogenicidad <i>in vitro</i>	27
3. Diseminación de hongos patógenos por <i>Neochetina eichhorniae</i> bajo condiciones de invernadero	32
Experimento 1.....	32
Experimento 2.....	34
DISCUSIÓN	39
1. Catastro e identificación de patógenos.....	39
2. Pruebas de patogenicidad <i>in vitro</i>	42
3. Diseminación de hongos patógenos por <i>Neochetina eichhorniae</i> bajo condiciones de invernadero	45
Experimento 1.....	45
Experimento 2.....	46
CONCLUSIÓN	50
RECOMENDACIONES	51
LITERATURA CITADA	52

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Número y porcentaje de colonias aisladas del jacinto de agua (<i>E. crassipes</i>) en cuatro localidades de Puerto Rico.....	23
Cuadro 2. Diversidad de hongos presentes en plantas de jacinto de agua en cuatro localidades de Puerto Rico.....	24
Cuadro 3. Incidencia y severidad de la enfermedad causada por hongos patógenos en hojas de jacinto de agua <i>in vitro</i>	30
Cuadro 4. Incidencia y severidad de la enfermedad daño causada por hongos patógenos inoculados por aspersion y con <i>Neochetina eichhorniae</i> en invernadero (Exp. 1).....	33
Cuadro 5. Incidencia y severidad de la enfermedad causada por hongos patógenos inoculados por aspersion sin y con <i>Neochetina eichhorniae</i> en invernadero (Exp. 2).....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hojas y flor de jacinto de agua (<i>Eichhornia crassipes</i>).....	2
Figura 2. A) Daño en hojas de jacinto de agua (<i>Eichhornia crassipes</i>) causado por <i>Neochetina eichhorniae</i> y B) Adulto de <i>N. eichhorniae</i>	5
Figura 3. Estructuras reproductivas y cultivos puros de hongos patógenos aislados de plantas de jacinto de agua. A) Conidias de <i>Alternaria</i> sp.; B) Crecimiento de <i>Alternaria</i> sp. en PDA ac.; C) Peritecio y ascas de <i>Glomerella cingulata</i> ; D) Peritecios de <i>G. cingulata</i> sobre el tejido foliar; E) Conidias de <i>Myrothecium roridum</i> y F) Crecimiento de <i>M. roridum</i> en PDA ac.....	26
Figura 4. Pruebas de patogenicidad <i>in vitro</i> en hojas de jacinto de agua. A) Lesiones causadas por <i>Alternaria</i> sp.; B) Lesiones causadas por <i>Glomerella cingulata</i> ; C) Lesiones cuasadas por <i>M. roridum</i> y D) Control.....	28
Figura 5. Severidad de la enfermedad causada por: A) <i>Alternaria</i> sp. 14 y 28 DDI; B) <i>Glomerella cingulata</i> a los 14 y 28 DDI y C) <i>Myrothecium roridum</i> 14 y 28 DDI en un ensayo <i>in vitro</i>	31
Figura 6. Severidad de la enfermedad en plantas de jacinto de agua: A) Asperjadas con <i>Glomerella cingulata</i> y B) inoculadas con <i>Neochetina eichhorniae</i> y <i>Glomerella cingulata</i> en invernadero 14 y 21 DDI.....	35
Figura 7. Lesiones causadas por la aspersion de <i>Myrothecium roridum</i> con <i>Neochetina</i> en hojas de jacinto de agua; A) experimento 1 y B) experimento 2.....	38

INTRODUCCIÓN

El jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*) es una planta acuática flotante que tiene raíces plumosas, largas y ramificadas. Sus hojas son redondas-reniformes y están arregladas en grupos de 6 a 10 hojas (Fig. 1) (Lugo y Semidey, 2002). La flor es azul-púrpura y da origen al fruto, que es una cápsula que puede contener alrededor de 50 semillas (Barrett, 1980). Esta se reproduce asexualmente mediante la formación de estolones, y también por semillas, las cuales pueden permanecer viables, en sedimento, de 15 a 20 años (Gopal, 1987).

El jacinto de agua se considera una de las malezas más nocivas en el mundo entero, debido a los problemas que causan su rápido y vigoroso crecimiento (Holm *et al.*, 1977). Su crecimiento es favorecido por las temperaturas altas y un alto contenido de nutrientes. Estas condiciones provocan que la planta se duplique cada 12 a 15 días mediante la reproducción asexual (Penfound y Earl, 1948). Básicamente estas características han favorecido una infestación excesiva en el sur de los Estados Unidos, México, Panamá, África, Asia y la India, ocasionando pérdidas millonarias (Holm *et al.*, 1977).

Las grandes infestaciones de esta maleza provocan problemas económicos, ecológicos y de salud. Entre los problemas económicos se mencionan, la disminución en el flujo de agua en ríos y canales utilizados para riego y, las pérdidas de producción en los campos dedicados a diferentes cultivos, especialmente al cultivo del arroz (Gopal, 1987). Otro problema es la limitación de las actividades de pesca, navegación y natación.

Como problema ecológico, la acumulación excesiva de estas plantas, reduce el



Figura 1. Hojas y flor de jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*).

oxígeno en el agua lo que provoca la muerte de poblaciones de peces y otros animales acuáticos (Gopal, 1987). Entre otras consecuencias se encuentran la competencia que ocurre entre el jacinto y las plantas nativas, por espacio, luz y nutrientes. Dentro de los problemas de salud, el jacinto de agua ayuda a la formación de hábitat favorable para el desarrollo de vectores de enfermedades tales como: malaria, schistosomiasis (biliarzia), filariasis, dengue, paludismo y fiebre amarilla entre otras (Harley, 1990; Hernández y Pérez, 1995).

Algunos estudios han demostrado que debido a la capacidad reproductiva, facilidad de dispersión, requerimientos nutricionales y resistencia a condiciones adversas, el jacinto de agua no puede erradicarse, sino sólo controlarse (Gutiérrez et al., 1994; Harley, 1990). Los métodos más utilizados para el manejo y control de esta maleza son el mecánico, el químico y el biológico. El control mecánico y el control químico son prácticas que se consideran muy costosas e inapropiadas debido a posibles efectos adversos sobre otras especies y la reducción en la calidad del agua. La remoción manual es un método ambientalmente seguro, útil para reducir pequeñas infestaciones y para el mantenimiento de canales. Sin embargo, existe una probabilidad alta de que ocurra una re-infestación a partir de fragmentos de plantas y semillas que queden en el agua. Por otro lado, el uso de los herbicidas tiene la limitación de que contamina el agua potable, la que se utiliza para riego y aquella que es suministrada a los animales de fincas. Además, éstos representan un riesgo para la salud humana y la vida silvestre (Medal y Norambuena, 2002; Potter et al., 1990). Debido a los inconvenientes que tienen el uso de productos químicos, es importante desarrollar un programa de control enfocado en el uso de enemigos naturales de esta

maleza (Charudattan, 1996). Debido al riesgo que reporta el control químico se le ha dado énfasis al control biológico ya que representa una alternativa potencial y libre de riesgo para el humano y el ambiente.

El control biológico de malezas se basa en utilizar insectos y microorganismos patógenos (bacterias y hongos) para reducir el vigor y la capacidad reproductiva de las malezas (De Loach, 1997). Estudios reportan una variedad de hongos patógenos con potencial para controlar el jacinto de agua, entre los cuales se mencionan: *Alternaria eichhorniae*, *Acremonium zonatum*, *Cercospora piaropi*, *Cercospora rodmanii* y *Myrothecium roridum* (Charudattan, 2001; Gopal, 1987). Estos patógenos han demostrado su capacidad para disminuir la biomasa del jacinto de agua y causar una reducción substancial en su población (Charudattan et al., 1985). Hasta el momento una o más especies de estos agentes se utilizan en más de 21 países del mundo (Harley, 1990).

Además de los patógenos, en EE.UU. y otros países se han utilizado con éxito los insectos *Neochetina eichhorniae* y *N. bruchi* (Coleoptera: *Curculionidae*) para reducir la infestación del jacinto de agua (Charudattan, 1996; Charudattan, 2002). Estos insectos se consideran especies idóneas para el control biológico, debido a su alto grado de especificidad (Fig. 2). Las especies de *Neochetina* se alimentan de las hojas y pecíolos del jacinto de agua y no atacan otras plantas de importancia económica.

Los insectos pueden controlar las malezas alimentándose de las flores, fruto, follaje, tallos y raíces o transmitiendo organismos fitopatógenos (Daniel et al., 1973). Stakman y Harrar (1957), mencionan que los insectos contribuyen directamente a la



Figura 2. A) Daño en hojas de jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*) causado por *Neochetina eichhorniae* y B) Adulto de *N. eichhorniae*

diseminación de esporas de hongos. Las esporas pueden ser transportadas dentro y fuera del cuerpo del insecto. Estas se encuentran en el tracto digestivo, la excreta, los pelos, el aparato bucal y las patas de los insectos (Galbraith, 1987b). Además, los hongos penetran en la planta a través de las heridas causadas por los insectos (Charudattan et al. 1978).

Existen pocos estudios que evalúen la interacción de hongos con el insecto *Neochetina*. Sin embargo algunos investigadores sugieren que el uso combinado de dos agentes biológicos puede causar un daño mayor en las plantas y facilitar la infección por patógenos (Phiri et al., 2001).

En Puerto Rico el jacinto de agua se encuentra comúnmente presente en lagos, quebradas, canales y caños. El uso de herbicidas a base de glifosato, diquat, 2,4-D y la remoción manual son prácticas que se realizan para tratar de controlar esta planta, pero existe la necesidad de evaluar otro tipo de control.

Algunos estudios se han realizado otros estudios para determinar la presencia de microorganismos afectando esta maleza en Puerto Rico. Por ejemplo, para 1990, se realizó un catastro de bacterias presentes en la superficie del jacinto de agua en tres áreas del Río Hondo de Añasco. Este estudio informó cinco géneros de bacterias Gram positivas: *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* y nueve géneros de bacterias Gram negativas: *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Vibrio*, *Xenorhabdus* y *Yersinia* (Arbelo, 1990). Actualmente, se evalúan experimentos en distintos lagos y ríos de Puerto Rico, donde las especies de *Neochetina* han sido liberadas en un intento por controlar la maleza (Abreu, com. pers.).

Al presente, se desconoce el impacto que los hongos patógenos puedan tener sobre el jacinto de agua en Puerto Rico. Por lo tanto, la investigación propuesta estuvo dirigida a la identificación y evaluación de hongos patógenos con potencial para el control del jacinto de agua y su interacción con *N. eichhorniae*.

OBJETIVOS

1. Realizar un catastro en áreas infestadas con el jacinto de agua para identificar, seleccionar y evaluar hongos patógenos con potencial para su control.
2. Evaluar la aspersión de hongos patógenos en combinación con *Neochetina eichhorniae* como un método para diseminar su infección en el jacinto de agua.

REVISIÓN DE LITERATURA

El jacinto de agua (*E. crassipes* (Mart.) Solms) es una planta acuática y perenne perteneciente a la familia Pontederiaceae. Esta planta tiene la capacidad de reproducirse rápidamente, lo cual le permite duplicarse a los 12 o 15 días (Penfound y Earl, 1948). En climas tropicales, su ciclo se reduce duplicando su población cada siete días con una productividad anual que fluctúa entre 930 y 2,900 toneladas por acre (Lareo, 1981). Su rápida reproducción ha provocado grandes infestaciones en los cuerpos de agua de Asia, África, Estados Unidos, India, y otros países causando pérdidas económicas que exceden los 100 millones de dólares (Holm et al., 1977). Por ejemplo, en EE UU, se estima que el manejo de las malezas, en general, implica un gasto económico de más de 15 billones de dólares anuales (Bridges, 1994). Actualmente los costos anuales para el manejo del jacinto de agua están en un rango de \$500,000 en California y se han reportado pérdidas de \$43 millones de dólares en el estado de la Florida en el intento por controlar el jacinto y la lechuga de agua, *Pistia stratiotes* (Schmitz et al., 1993; Mullin et al., 2000).

El manejo del jacinto de agua se hace a través de la combinación de prácticas culturales y químicas. El control químico es una táctica de supresión de malezas muy importante cuando ocurre infestación o cuando los niveles endémicos de las poblaciones sobrepasan los niveles de daño económico (Chokar y Balyan, 1999). Algunos herbicidas como el 2,4-D, dalapon, diquat, glifosato, sulfato de cobre, entre otros, se han utilizado por años para controlar el jacinto de agua y otras malezas acuáticas (Singh y Muller, 1979). Los herbicidas se utilizan por su rápida acción y la facilidad de aplicación y manejo, sin embargo pueden causar problemas ambientales

tales como: la contaminación del suelo y agua (Zimdahl y Clark, 1982). Además existe una preocupación por el uso indiscriminado de herbicidas ya que causan la reducción en la biodiversidad ecológica y la contaminación por la exposición directa o indirecta a residuos de estos componentes. También causan efectos adversos a la salud humana y a la vida silvestre en los lugares de aplicación y en los ecosistemas distantes (Abdalla y Lobby, 1987; Hoar et al., 1986; Potter et al., 1990). Otro aspecto del uso de herbicidas es que puede ocurrir una re-infestación en los sitios tratados, a través de la germinación de semillas y plantas que escapen de la aplicación las cuales pueden desarrollarse más rápido aprovechando la ausencia de los enemigos naturales. El uso de estos químicos causa un efecto adverso sobre los enemigos naturales de las malezas y/o aquellos agentes seleccionados para el control biológico. Por ejemplo, en África del Sur, el control del jacinto de agua depende de aplicaciones de herbicidas, y esta práctica suele ser antagonista para el control biológico por varias razones. Las altas aplicaciones de herbicidas, especialmente aquellos que contienen altos niveles de surfactantes, causan la muerte de los enemigos naturales de esta planta. Un ejemplo lo es el picudo *N. eichhorniae*, el cuál se utiliza como control biológico del jacinto de agua. Este insecto es resistente a las altas aplicaciones de herbicidas. Sin embargo, los herbicidas que contienen diquat como ingrediente activo, resultan tóxico para este insecto (Ueckermann y Hill, 2000).

La utilización de químicos puede provocar el desarrollo de resistencia en muchas malezas (Holt, 1994). La resistencia es la habilidad de un biotipo de sobrevivir a la aplicación de un herbicida al cual la especie es normalmente susceptible (Le Baron, 1987). El primer caso de resistencia a un herbicida (triazina) se reportó en la

maleza *Senecia vulgaris* en el 1970 (Ryan, 1970). Durante los últimos años se han reportado numerosos casos de resistencia en malezas. Por ejemplo, en Estados Unidos, Canadá, Europa, Israel y Japón se han reportado 55 especies de plantas (40 de hoja ancha y 15 gramíneas) resistentes a las triazinas y 11 especies resistentes al paraquat (Holt y Lebaron, 1990).

El control mecánico también se ha utilizado para tratar de minimizar los efectos de esta planta, pero sólo resulta útil en reducir pequeñas infestaciones y/o para el mantenimiento de canales. Este método resulta muy costoso y al igual que el control químico, existe una probabilidad de que ocurra una re-infestación a partir de fragmentos de plantas y semillas que persisten en el agua. Por esta razón es que surge la necesidad de desarrollar otros métodos y estrategias alternas que ayuden al control y manejo de las malezas.

Una alternativa viable y que ha sido estudiado por años, es el control biológico (TeBeest, 1991; Rosskopf et al., 1999). El control biológico de malezas es la utilización planificada de insectos, microorganismos patógenos que puedan reducir el vigor y la capacidad reproductiva de estas plantas (DeLoach, 1997). Algunas de las ventajas de este método es que no contamina el ambiente y puede ser altamente específico contra la planta que se quiere controlar. En el aspecto económico, al iniciar un nuevo proyecto se requiere una inversión relativamente alta, sin embargo, a mediano y largo plazo, la relación beneficio-costos llega a ser altamente exitosa (Chippendale, 1995; Cullen y Whitten, 1995).

Los primeros trabajos realizados en el control de malezas acuáticas se reportaron en el año 1962 en Argentina. Este estudio se inició con la búsqueda de

agentes potenciales para controlar la yerba caimán *Alternanthera philoxeroides* (Amaranthaceae) y el jacinto de agua. La yerba caimán se comenzó a controlar con el la pulga de la yerba caimán, *Agasicles hygrophila* Selman y Vogt (Coleoptera: Chrysomelidae), que fue liberado en el norte de la Florida en 1965. Tres años después de la liberación de este escarabajo, se suspendieron las aplicaciones de herbicidas ya que se observó un excelente control de esta maleza (Medal y Norambuena, 2002). Este hallazgo provocó que otros investigadores se dieran a la tarea de buscar más agentes con potencial para el control de malezas.

Desde la década del 70, se han realizado numerosas investigaciones que reportan una gran cantidad de hongos afectando las plantas de jacinto en distintas partes del mundo. Por ejemplo, en 1970 se describió por primera vez al hongo *A. eichhorniae* y se relacionó con el daño al jacinto de agua y su potencial en biocontrol (Raj y Ponnappa, 1970). La utilización de hongos patógenos para el control de malezas es relativamente un concepto nuevo, comparado con el uso de insectos, sin embargo se presenta como una alternativa potencial de control (Charudattan, 1986). El uso de patógenos ofrece una especificidad en control, seguridad al ambiente, evita el desarrollo de biotipos por la resistencia a herbicidas y su elaboración es menos costosa en comparación con la de los químicos (Charudattan, 1990).

Algunos investigadores han identificado varios hongos, ascomicetos y deuteromicetos atacando el jacinto de agua. Entre estos se mencionan: *Alternaria eichhorniae* Nag Raj y Ponnappa, *Alternaria alternata* (Fr.), *Acremonium zonatum* (Saw.) Gams, *Cercospora piaropi* Tharp, *Cercospora rodmanii* Conway, *Myrothecium roridum* Tode ex Fr., *Rhizoctonia solani* Kühn, y *Uredo eichhorniae* Gonz Frag. y Cif.

(Charudattan et al. 1985). Estos hongos han demostrado su capacidad para disminuir la biomasa del jacinto de agua, y en algunas ocasiones han causado una disminución substancial en la población de esta planta.

En 1975, se aislaron 13 hongos de plantas de jacinto de agua y se encontró que *A. eichhorniae*, *M. roridum* y *R. solani* fueron patogénicos al jacinto (Rakvidhyasastra y Visarathnonth, 1975). Freeman (1977), encontró que *A. zonatum*, *Bipolaris stenospila* Drechs., *C. rodmanii*, *Rhizoctonia* spp. y *U. eichhorniae* fueron patogénicos al jacinto de agua.

Otro estudio realizado en Egipto en el 1980, evaluó la capacidad de infección de algunos hongos del filo Ascomicetos contra el jacinto de agua. Se encontró que *Alternaria grisea* Szilvinyi fué altamente virulento al jacinto de agua mientras que, *A. alternata*, *Alternaria humicola* Oudem., *Cladosporium cladosporoides* (Fresen) de Vries y *Cladosporium herbarum* (Pers) Link ex Fr., fueron poco virulentos, induciendo pequeñas lesiones foliares de color marrón y amarillas (Mansour et al., 1980). En Sudan, se encontró *Phoma sorghina* (Sacc.) Boerema, Dornbosch y Van Kesteren causando lesiones foliares en el jacinto de agua, desde siete a 10 días después de la inoculación (Abdel-Rahim, 1984). También se estudió el efecto de varios hongos y bacterias en plantas de jacinto de agua y se encontraron que los siguientes fueron patogénicos: *A. zonatum*, *Drechslera specifera* (Bain) v. Arx, *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc., *P. sorghina* y *Bacillus* sp. (Abdel-Rahim y Tawfig, 1984). Galbraith (1987^a) aisló 33 especies de hongos de plantas de jacinto de agua y entre estos se identificó los patógenos: *C. piaropi*, *A. zonatum* y *Fusarium* sp. Éste también observó una mayor diversidad de hongos en plantas atacadas por *N. eichhorniae* y *S. albiguttalis*.

Investigadores en Egipto reportaron el género *Alternaria* como uno con potencial para el control biológico del jacinto de agua (Elwakil et al., 1989; Shabana et al., 1995). Shabana y colaboradores (2001a) encontraron que *A. alternata* era capaz de causar daños severos hasta llegar a suprimir la maleza. También los aislados identificadas como *A. eichhorniae* y *A. alternata* se evaluaron entre sí, confirmando que *A. eichhorniae* fue la especie más virulenta.

Barreto y Evans (1996) aislaron 70 hongos y bacterias de plantas de jacinto de agua, y sólo 15 de estos aislados resultaron altamente virulentos a la planta. En otros estudios los patógenos *A. zonatum*, *A. eichhorniae*, *C. piaropi* y *C. rodmanii* demostraron ser altamente efectivos controlando el jacinto de agua bajo condiciones experimentales (Martyn y Freeman, 1978; Charudattan et al., 1985; Shabana et al., 1995).

Además de los hongos patógenos se han estudiado insectos con alto potencial para controlar el jacinto de agua. Los insectos que han resultado más exitosos en el control biológico del jacinto de agua son: *Neochetina bruchi* Hustache, y *N. eichhorniae* Warner, *Niphograpta albiguttalis* (Warren) y *O. terebrantis* (Harley, 1990; Julien, 1992; Julien, 2000). Estos insectos son coleópteros pertenecientes a la familia Curculionidae. Los picudos son nativos de Argentina, y fueron liberados en Florida en el año 1972 y 1974, respectivamente. El adulto de *Neochetina eichhorniae* es de color gris con un moteado de color brown oscuro y tiene 3.2 mm de longitud (Center, 1994).

El uso de estas especies se ha convertido en la estrategia más utilizada para reducir la infestación de esta planta en el sur de los Estados Unidos, África y otros países (Charudattan, 1996; Charudattan, 2002; Limon, 1984). Por ejemplo, en el Lago Victoria

en Kenya, luego de cuatro años de haber introducido especies de *Neochetina*, se redujo un 75% del volumen de la población del jacinto de agua (Center et al., 2002). Otros resultados similares se obtuvieron en los lagos del Río Sepic en Nueva Guinea y México, donde tres años después de la introducción de *Neochetina*, se redujo un 62% del jacinto de agua (7,724 cuerdas) (Julien y Orapa, 1999; Center et al., 2002). En la Florida, el efecto combinado de estos insectos causó una reducción en el crecimiento del jacinto de agua. Las plantas atacadas por los insectos durante su crecimiento, mostraron ser más susceptibles a las bajas temperaturas en el invierno y a las infecciones de hongos (Center et al., 1997).

Otro grupo de agentes de control que se están estudiando lo componen especies de insectos recientemente liberadas: *Eccritotarsus catarinensis*, *Xubida infusellus*, *Cornops aquaticum*, *Bellura densa* y *Thrypticus* spp. (Charudattan, 2001). En Australia en el 1981 se liberó *X. infusellus* sin ningún éxito, sin embargo, en 1996 se volvió a introducir en esta región y en Papua Nueva Guinea, donde persistió por algunos años pero sin aparente impacto sobre las plantas de jacinto de agua (Julien y Stanley, 1999). *Bellura densa* fue rechazado como control biológico porque se encontró que causaba daños a la yautía, *Colocasia esculenta* (L.) Schott. (Center y Hill, 1999). Actualmente en África se realizan estudios con *C. aquaticum* para determinar su rango de hospederos (Oberholzer y Hill 2001). Varias especies de *Thrypticus* han sido estudiadas en Argentina para evaluar su posible impacto en esta maleza (Cordo, 1999). Este género no se había estudiado dado a su amplio rango hospedero, pero en estudios recientes realizados en Argentina se encontraron algunas especies con alto grado de especificidad al jacinto de agua.

Existen pocas investigaciones diseñadas con el propósito de estudiar la posible interacción entre especies de *Neochetina* y las enfermedades causadas por patógenos. Sin embargo, algunos investigadores sugieren que el uso combinado de dos agentes biológicos puede causar un daño mayor en las plantas de jacinto de agua. Además el uso de insectos puede facilitar la infección causada por patógenos (Phiri et al., 2001). Freeman (1978), sugiere que para obtener un buen control del jacinto de agua, se puede utilizar *C. rodmanii* sólo, o en combinación con otros patógenos y/o insectos. Charudattan et al. (1978) realizaron un catastro de hongos y bacterias en plantas de jacinto de agua contaminadas con *N. eichhorniae* y *O. terebrantis*. Sin embargo, no encontraron relación entre los microorganismos aislados en las plantas infectadas y las no infectadas con *N. eichhorniae* y *O. terebrantis*. Entre los géneros de hongos aislados encontraron: *Acremonium zonatum*, *Cercospora*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Periconia*, *Pestalotia*, *Trichoderma*, *Curvularia* y *Macrophoma*. *Acremonium zonatum* fue el patógeno más virulento. Además encontraron que la combinación de *N. eichhorniae* y *O. terebrantis* con *A. zonatum*, resultó en un excelente biocontrol de la maleza.

MATERIALES Y MÉTODOS

La identificación de los patógenos y las pruebas de patogenicidad in vitro se realizaron en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Protección de Cultivos del Recinto Universitario de Mayagüez (RUM), ubicado en el Edificio Piñero. Los experimentos de invernadero se realizaron en la finca del mismo Recinto.

1. Catastro e identificación de patógenos

Durante el periodo de septiembre de 2002 hasta agosto de 2003 se realizaron tres muestreos en las siguientes localidades de Puerto Rico: Lago Dos Bocas (Utuado), Lago Guayabal (Villalba), Lago Carraízo (Trujillo Alto) y el Caño Majagual (Mayagüez). Las muestras en el Lago Carraízo y el Caño Majagual se realizaron entre septiembre y diciembre de 2002, y en Utuado y Villalba entre febrero y marzo de 2003. Además entre junio y agosto de 2003 se realizó un muestreo en cada localidad.

En cada muestreo se recogieron diez plantas de jacinto con lesiones necróticas características de enfermedades causadas por hongos. Las plantas se recogieron en bolsas plásticas dentro de una nevera portátil con hielo y fueron transportadas al laboratorio. Las muestras se identificaron por localidad y se documentó la morfología de las lesiones mediante fotografías y descripciones. De cada muestra se realizaron cinco cortes, del margen de las lesiones, de aproximadamente 2 mm. Las secciones de tejidos se desinfectaron superficialmente utilizando alcohol etílico al 70%, hipoclorito de sodio al 0.05% y finalmente con agua destilada estéril (todos los tratamientos por un minuto cada uno). Éstos se transfirieron al medio de cultivo de agar de papa y dextrosa acidulado (PDA ac) y/o agar de agua (WA). Los platos petri se incubaron a 28°C. Luego de tres a cinco días de incubación se documentó la presencia y/o

ausencia de hongos y se purificaron las colonias transfiriéndolas a nuevos platos petri, conteniendo los medios de cultivo correspondientes. Los diferentes aislados fueron identificados según su morfología, utilizando descripciones macroscópicas, microscópicas y claves taxonómicas (Barnett y Hunter, 1998; Hanlin, 1997).

2. Pruebas de patogenicidad *in vitro*

Se realizaron pruebas de patogenicidad en hojas sanas de jacinto de agua con el propósito de evaluar y confirmar el potencial patogénico de los aislados de *Alternaria* sp., *G. cingulata* y *M. roridum*. Las hojas fueron colectadas de plantas de jacinto de agua, crecidas en piscinas bajo condiciones de invernadero. Estas se mantuvieron con una solución de abono 20-20-20, aplicado cada dos semanas. Se seleccionaron 10 placas del cultivo puro de cada uno de estos aislados y con una espátula estéril se removió el micelio y las conidias transfiriéndolos a frascos conteniendo 50 ml de agua destilada estéril. Para lograr una suspensión de las conidias se añadieron dos gotas de Tween 20 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en cada frasco. La concentración de conidias se ajustó a 10^6 conidias/ml utilizando un hemacitómetro (Shabana *et al.*, 2001b).

Se desinfectaron superficialmente ocho hojas de jacinto de agua según descrito anteriormente. Los peciolos de las hojas se colocaron en tubos de ensayo con agua destilada estéril. Se colocó parafina para evitar la pérdida de agua. Las hojas se colocaron sobre placas petri (150 x 15 mm), dentro de una caja plástica (85 x 40cm) tapada. Se evaluaron cuatro tratamientos, cada uno con ocho replicaciones. Cada tratamiento se evaluó de forma individual para determinar la patogenicidad de cada

aislado. Las hojas se inocularon con 1.5 ml de la suspensión de conidias, utilizando un atomizador manual. El control consistió de agua destilada estéril.

La incidencia de enfermedad fue evaluada de acuerdo al porcentaje de hojas con lesiones durante cuatro semanas correspondientes a los 7, 14, 21 y 28 días después de la inoculación (DDI). La severidad de la enfermedad se determinó evaluando el desarrollo de lesiones por hoja, causado por cada patógeno. Se promedió el total de lesiones por cada hoja individual para determinar la severidad de daño por hoja (Walker, 2000; Freeman y Charudattan, 1984). Para comprobar la patogenicidad de los aislados se realizaron aislaciones de los tejidos infectados, siguiendo el procedimiento antes descrito, hasta completar los postulados de Koch.

3. Diseminación de hongos patógenos por *Neochetina eichhorniae* bajo condiciones de invernadero.

Se realizó un experimento para evaluar la dispersión de *Alternaria* sp., *M. roridum* y *G. cingulata* por *N. eichhorniae*. Luego se realizó un segundo experimento, para evaluar la combinación de los hongos con *N. eichhorniae* bajo condiciones de invernadero.

Experimento I

El primer experimento se inició el 14 de julio de 2005 utilizando plantas jóvenes de jacinto de agua crecidas bajo condiciones de invernadero. Estas se desinfectaron de forma similar al ensayo *in vitro* y se colocaron en envases plásticos (30 x 40 cm.) con capacidad para 2.5 galones de agua. Cada envase comprendía una parcela experimental que contenía tres plantas de jacinto de agua con 6 a 8 hojas y una altura promedio de 15 cm.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con ocho tratamientos y cuatro réplicas. Los tratamientos fueron: T1: *Alternaria* sp. (A); T2: *G. cingulata* (Gc); T3: *M. roridum* (Mr); T4: *N. eichhorniae* + *Alternaria* sp.; T5: *N. eichhorniae* + *G. cingulata*; T6: *N. eichhorniae* + *M. roridum*; T7: *N. eichhorniae* solo y T8: Control Absoluto.

Se utilizaron un total de 60 adultos de *N. eichhorniae*, colectados de viveros del Programa de Control Biológico de Malezas de la Subestación Experimental de Isabela dirigido por el Profesor Edwin Abreu. Estos se mantuvieron en bandejas plásticas con tapas y se alimentaron con hojas jóvenes de plantas de jacinto de agua. Los picudos fueron desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio al 0.25%, por un minuto y enjuagados con agua destilada estéril. Los insectos se colocaron en placas petri conteniendo el cultivo de cada hongo, por 30 min. para permitir que el insecto se impregnara del micelio y las conidias de los patógenos bajo evaluación (Charudattan et al. 1978) Luego de 30 minutos, se colocaron cinco insectos por bandeja tratada. La preparación e inoculación de los hongos se realizó de forma similar al ensayo *in vitro*, asperjando 5 ml de la suspensión de conidias para cada aislado. El tratamiento inoculado con *N. eichhorniae* solo, consistió de insectos que caminaron sobre una placa de PDA, por 30 min. El tratamiento de control absoluto se asperjó con agua destilada estéril. Los envases plásticos se cubrieron con un mosquitero para evitar la salida del insecto.

La incidencia de enfermedad fue evaluada según el porcentaje de hojas con lesiones de hongos, durante las siguientes cuatro semanas (7, 14, 21 y 28 DDI). El porcentaje de hojas con daño se determinó basado en el número de hojas infestadas por el número total de hojas presentes (total de hojas con lesiones/total de hojas x

100). La severidad de la enfermedad se determinó basada en el promedio del total de lesiones por cada hoja individual, según descrito anteriormente.

Experimento II

El segundo experimento se realizó para comparar la combinación de los hongos patógenos con y sin el picudo *N. eichhorniae*. Las aspersiones correspondientes a tratamientos de hongos sin *Neochetina* se asperjaron con la suspensión de conidias de forma similar al primer experimento. Los tratamientos inoculados con *Neochetina* se asperjaron primero con una suspensión de conidias de los hongos bajo evaluación seguido de la liberación de los insectos. Se tomaron datos de incidencia de enfermedad y severidad de daño según fue descrito anteriormente.

4. Análisis Estadístico.

Los datos de las pruebas de patogenicidad *in vitro* se analizaron mediante pruebas no paramétricas. Los datos de las pruebas en invernadero se analizaron mediante análisis de varianza según el programa Infostat versión 2.0 (DiRienzo et al., 2002) y la prueba de diferencias mínimas significativas (DMS) a la probabilidad de 5% ($P = 0.05$).

RESULTADOS

1. Catastro e identificación de patógenos

Se obtuvieron un total de 154 aislados de hongos asociados a plantas de jacinto de agua de cuatro localidades muestreadas (Cuadro 1). Del total de hongos, se identificaron 73 aislados y los 81 restantes, fueron clasificados como desconocidos, ya que no produjeron estructuras de reproducción que facilitaran su identificación. Las plantas colectadas en el Lago Carraízo en Trujillo Alto, mostraron el mayor número de hongos aislados (64%), mientras que el Lago Guayabal en Villalba presentó el menor número de hongos (25%).

Se aislaron 16 géneros de hongos diferentes, basado en sus descripciones microscópicas y aspectos morfológicos (Cuadro 2). La mayoría de los hongos identificados son patógenos de plantas y son principalmente Ascomycetes. El género más frecuente en plantas colectadas en las cuatro localidades fue *Curvularia*, representado por un 12.3% del total. Este se encontró asociado a lesiones foliares, necróticas que no representaban daño severo en las plantas. Las colonias de *Curvularia* spp. crecidas en medio de PDA ac. mostraron micelio marrón oscuro, y se identificaron por sus conidióforos simples con conidias oscuras y una célula terminal hialina.

Otro género relativamente frecuente fue *Colletotrichum*, que predominó en las localidades de los Lagos Carraízo, Guayabal y el Caño Majagual. Este fue aislado con una frecuencia de 11.0%. De este género se identificaron tres especies: *C. gloesporioides* (5.2%), *C. graminicola* (1.3%) y *Colletotrichum* spp. (4.5%). Se observaron ambas fases de su ciclo de vida, su estado anamorfo (*Colletotrichum*

Cuadro 1. Número y porcentaje de colonias aisladas del jacinto de agua *E. crassipes* en cuatro localidades de Puerto Rico.

Localidad	Colonias aisladas		
	Identificadas (%)	Desconocidos (%)	Total (%)
¹ Lago Carraízo	28 (44)	36 (56)	64 (42)
¹ Caño Majagual	22 (56)	17 (44)	39 (25)
² Lago Dos Bocas	11 (42)	15 (58)	26 (17)
² Lago Guayabal	12 (48)	13 (52)	25 (16)
Total	73 (47)	81 (53)	154 (100)

¹ Muestreos realizados entre septiembre y diciembre de 2002.

² Muestreos realizados entre febrero y marzo de 2003.

Cuadro 2. Diversidad de hongos presentes en plantas de jacinto de agua en cuatro localidades de Puerto Rico.

Género	Aislados	(%)	¹Localidad
<i>Alternaria</i> sp.	4	2.6	C
<i>Aspergillus</i> sp.	1	0.6	D
<i>Cladosporium</i> sp.	1	0.6	A
<i>Colletotrichum</i> spp.	7	4.5	ACD
<i>C. gloesporioides</i> / <i>Glomerella cingulata</i>	8	5.2	ACD
<i>C. graminicola</i>	2	1.3	D
<i>Curvularia</i> spp.	19	12.3	ABCD
<i>Fusarium oxysporum</i>	2	1.3	BD
<i>Fusarium solani</i>	1	0.6	B
<i>Lepthosphaerulina crassiasca</i>	3	2.0	A
<i>Mucor/Rhizopus</i>	3	2.0	AC
<i>Myrothecium roridum</i>	2	1.3	D
<i>Nectria</i> spp.	2	1.3	A
<i>Nigrospora</i> spp.	9	6.0	ABD
<i>Penicillium</i> sp.	1	0.6	B
<i>Pestalotia</i> sp.	1	0.6	A
<i>Phomopsis</i> spp.	2	1.3	B
<i>Verticillium</i> spp.	5	3.2	ACD
Desconocidos ²	81	52.6	ABCD
Total	154	100	

¹ Estaciones de muestreo: A= Lago Carraízo, B= Lago Dos Bocas, C= Lago Guayabal y D= Caño Majagual.

² Colonias que no produjeron estructuras reproductivas para su identificación.

gloesporioides) y su estado telomorfo (*Glomerella cingulata*).

Nigrospora fue aislado con una frecuencia de 6.0%, encontrándose en tres localidades, exceptuando el Lago Guayabal en Villalba. Este género, caracterizado por ser un saprófito, se observó con frecuencia en plantas que mostraban varios tipos de síntomas y se encontró asociado a dos o más patógenos. Se identificó por sus conidióforos simples y cortos con conidias oscuras unicelulares. *Nigrospora* desarrolló un micelio crema mostrando manchas negras en la parte posterior de la placa.

Las lesiones que causaron *Alternaria* sp., *G. cingulata* y *M. roridum* mostraron ser más severas en comparación con los otros hongos, aunque no fueron aislados con mucha frecuencia. *Alternaria* sp. presentó lesiones foliares necróticas, de formas irregulares, formando halo clorótico. Sus conidias muriformes, formadas en cadenas o solitarias, fueron de color marrón pálido, arregladas en un conidióforo oscuro, mayormente simple. Las conidias fueron ovoides y multicelulares, con septos transversales y oblicuos (Fig. 3-A). Su crecimiento en PDA ac. mostró un micelio abundante gris oscuro (Fig. 3-B).

El género de *Colletotrichum* se observó causando daño foliar, representado por lesiones necróticas circulares de color marrón oscuro. En la fase asexual se observó un micelio poco algodonoso de color blanco, con un exudado de color anaranjado donde se encontraron las conidias hialinas de formas cilíndricas. La fase sexual, *G. cingulata*, se caracterizó por la formación de peritecios de color marrón oscuros y ascosporas truncadas y elipsoidales, hialinas. La Figura 3-C muestra un peritecio de *G. cingulata* con ascas clavadas conteniendo las ascosporas. La Figura 3-D presenta los peritecios sobre el tejido foliar del jacinto de agua.

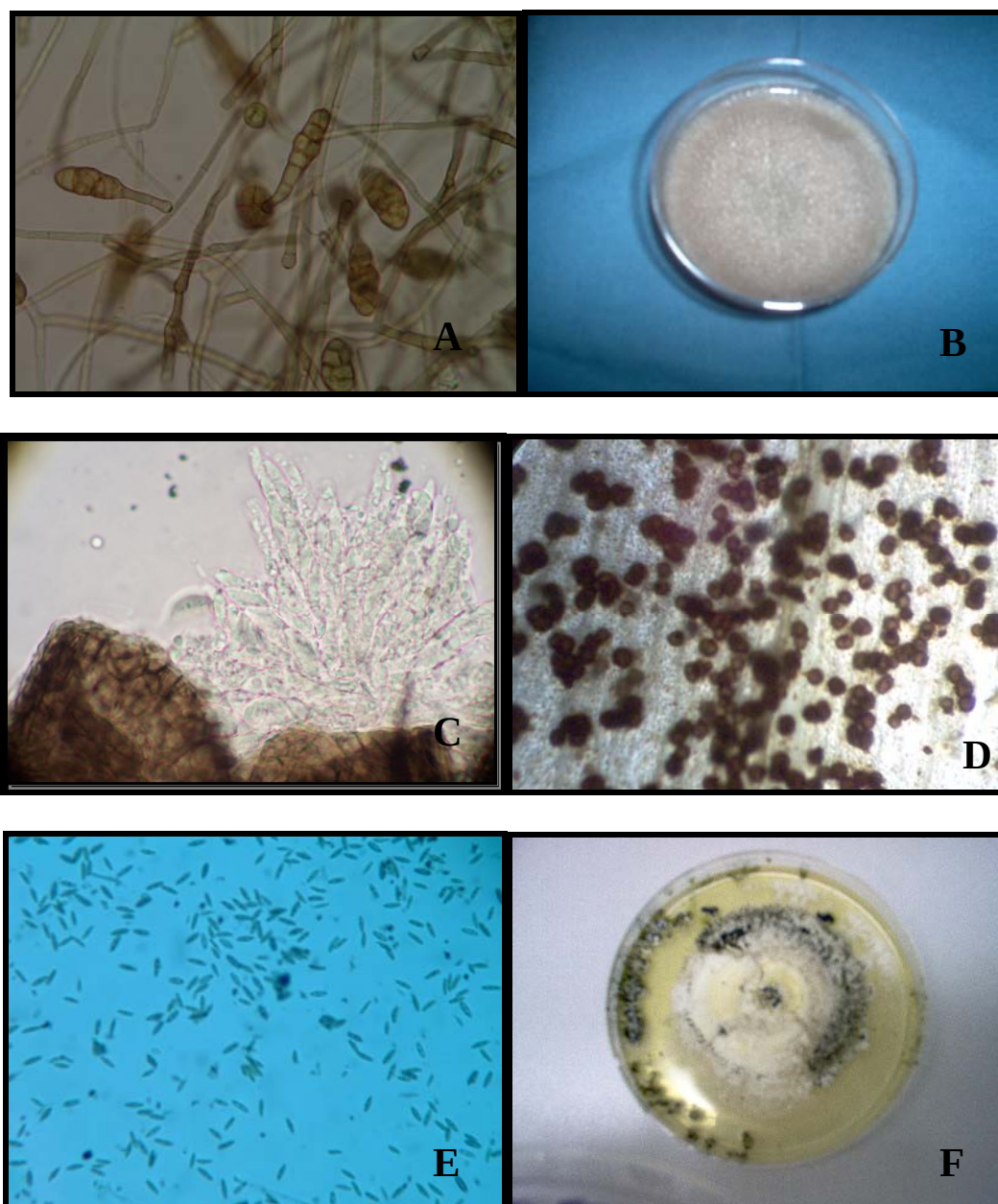


Figura 3. Estructuras reproductivas y cultivos puros de hongos patógenos aislados de plantas de jacinto de agua. A) Conidias de *Alternaria* sp.; B) Crecimiento de *Alternaria* sp. en PDA ac. C) Peritecio y ascas de *Glomerella cingulata*; D) Peritecios de *G. cingulata* sobre el tejido foliar; E) Conidias de *Myrothecium roridum* y F) Crecimiento de *Myrothecium roridum* en PDA ac.

Myrothecium roridum mostró lesiones necróticas marrón oscuro y de forma oblongada. Las conidias pequeñas, pigmentadas, unicelulares y ovoides, se observaron arregladas en la parte terminal de un esporodoquio subhialino (Fig. 3-E). En PDA ac. produjo un micelio blanco con un exudado negro donde se observó abundante esporulación (Fig. 3-F). Los géneros de hongos restantes fueron aislados con porcentajes relativamente bajos (≤ 4.0). Estos en su mayoría correspondieron a géneros saprófitos, parasíticos y/o patógenos débiles. Además estos hongos no presentaron daños severos en comparación con los mencionados anteriormente.

2. Pruebas de patogenicidad *in vitro*

Basado en la información de la literatura y los hallazgos del catastro, se seleccionaron los siguientes hongos patógenos con potencial para el control del jacinto de agua: *Alternaria* sp., *M. roridum* y *G. cingulata*.

Las pruebas de patogenicidad *in vitro* confirmaron que *Alternaria* sp., *M. roridum* y *G. cingulata* causaron lesiones foliares en plantas sanas de jacinto de agua, lo cual confirmó la patogenicidad de los tres aislados. *Alternaria* sp. causó las lesiones de mayor tamaño en las hojas evaluadas. Este aislado produjo lesiones foliares necróticas de forma irregular con un halo clorótico, de 2 a 4 mm de longitud (Fig. 4-A). La aparición de síntomas para *Alternaria* sp. ocurrió nueve días después de la inoculación (DDI). Las hojas inoculadas con *G. cingulata* presentaron lesiones necróticas de 0.5 a 1.5 mm de longitud luego de tres DDI (Fig.4-B). *Myrothecium roridum* produjo lesiones necróticas de 1.5 a 2 mm de longitud, de forma circular y con márgenes marrón oscuro. Además, *M. roridum* presentó lesiones rodeadas de un

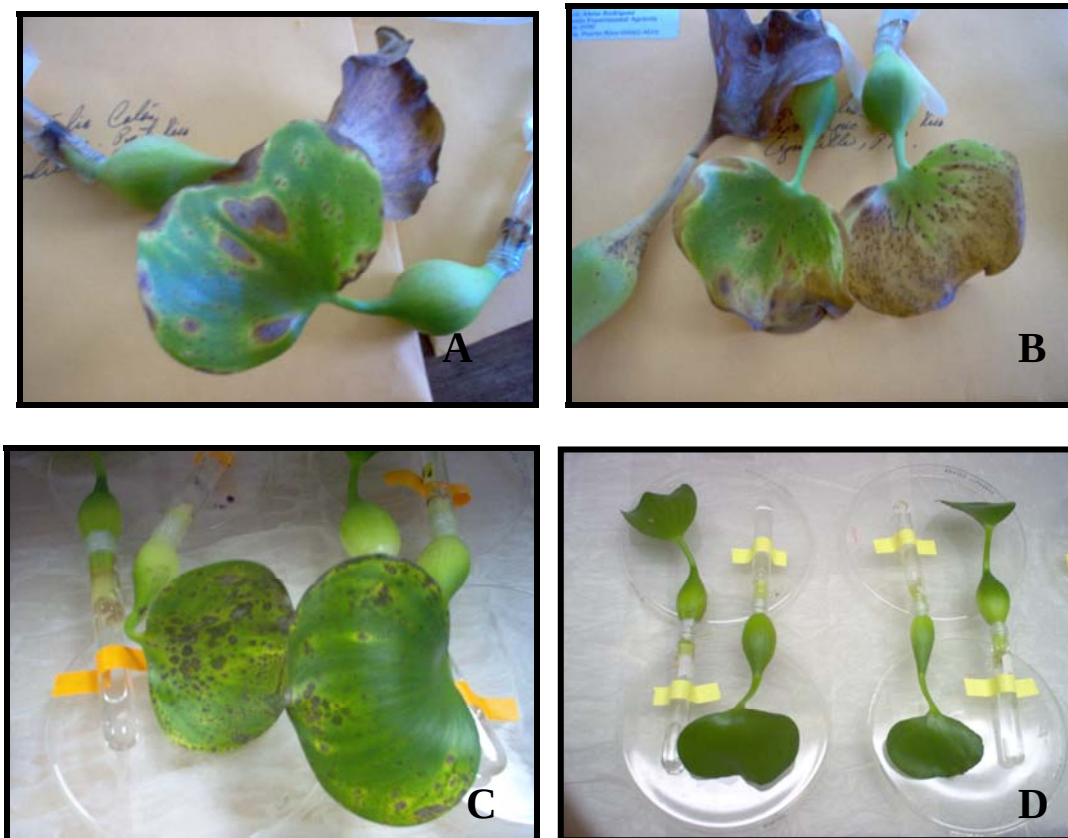


Figura 4. Pruebas de patogenicidad *in vitro* en hojas de jacinto de agua.
A) Lesiones causadas por *Alternaria* sp.; B) Lesiones causadas por *G. cingulata*; C) Lesiones causadas por *M. roridum* y D) Control.

micelio algodonoso blanco con un exudado oscuro que contenía las conidias (Fig. 4-C). Los síntomas se desarrollaron cinco DDI. En la evaluación de los tres patógenos, en algunos casos se observó marchitez en las hojas debido a la pérdida de agua y esto dificultó la recolección de datos. Las hojas del control mostraron síntomas de marchitez y se observaron algunas lesiones foliares rodeadas por micelio blanco a los 28 DDI (Fig. 4-D).

El Cuadro 3 presenta la incidencia y la severidad de la enfermedad causada por *Alternaria* sp., *G. cingulata* y *M. roridum*, a los 14 y 28 DDI. Se observó un aumento en la incidencia de la enfermedad en todos los tratamientos hasta alcanzar más del 80% de incidencia. La incidencia de enfermedad causada por *G. cingulata* fue mayor a la de *M. roridum* y *Alternaria* sp. a los 14 y 28 DDI.

La severidad de la enfermedad aumentó de forma progresiva para los diferentes tiempos de incubación (Cuadro 3). La severidad de la enfermedad fue mayor para *M. roridum* seguido de *G. cingulata* 14 DDI. Sin embargo, a los 28 DDI ambos tratamientos obtuvieron igual severidad de la enfermedad, alcanzando un 100%. La severidad de la enfermedad fue menor en plantas inoculadas con *Alternaria* sp. (42%) en comparación a los otros dos patógenos (Fig. 5-A, B y C).

Cuadro 3. Incidencia y severidad de la enfermedad causada por hongos patógenos en hojas de jacinto de agua *in vitro*.

Hongos	Incidencia de la enfermedad ¹		Severidad de la enfermedad ³	
	14 DDI ²	28 DDI	14 DDI	28 DDI
<i>Alternaria</i> sp.	82	88	13	42
<i>Glomerella cingulata</i>	94	94	28	100
<i>Myrothecium roridum</i>	82	88	65	100
Control	0	19	1	4
(P=0.05) ⁴	0.14	0.14	0.01	0.03

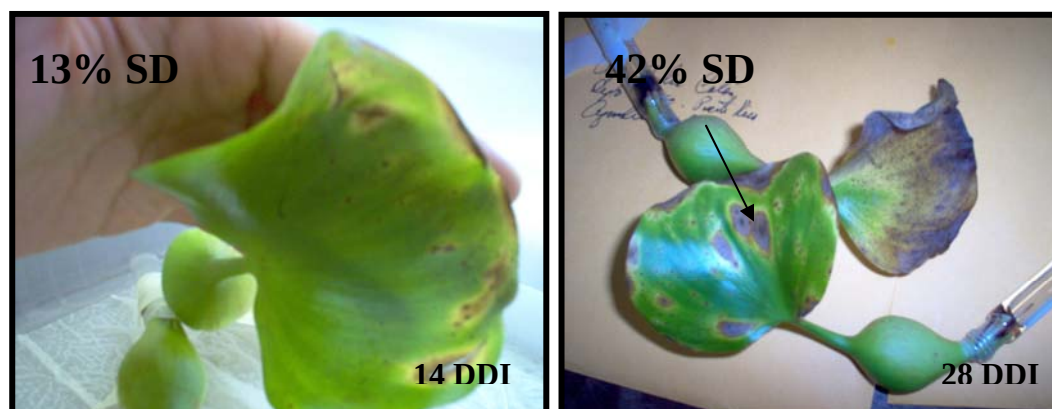
¹ Basado en el porcentaje de hojas con lesiones.

² DDI= Días después de la inoculación de los hongos.

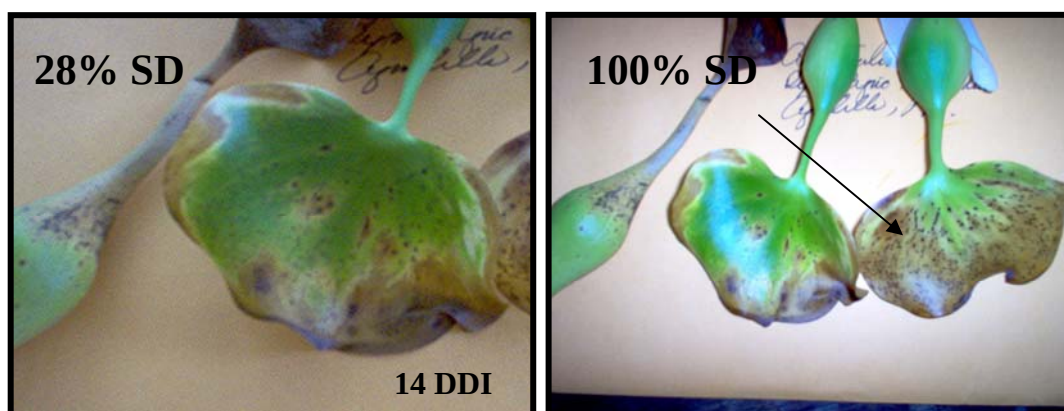
³ Basado en el promedio de lesiones por hoja.

⁴ Diferencias significativas mediante análisis no paramétrico.

A



B



C

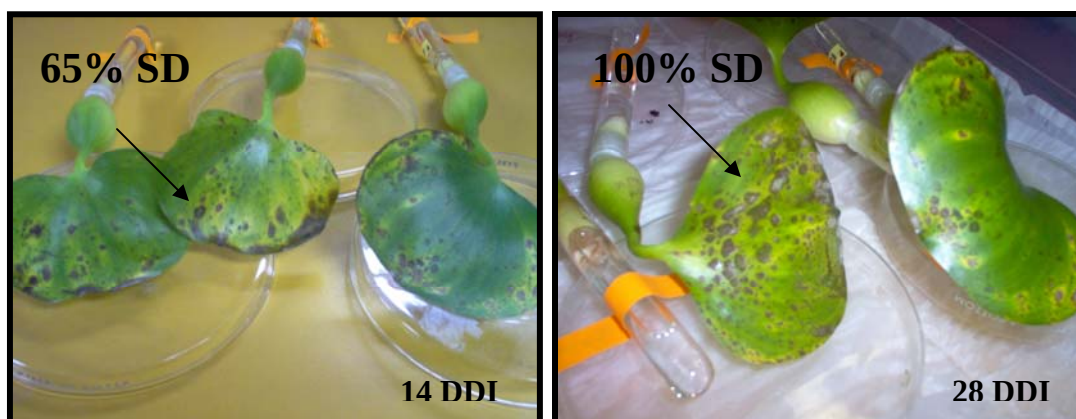


Figura 5. Severidad de la enfermedad a los 14 y 28 DDI, causada por: A) *Alternaria* sp.; B) *G. cingulata* y C) *M. roridum* en un ensayo *in vitro*.

3. Diseminación de hongos patógenos por *Neochetina eichhorniae* bajo condiciones de invernadero.

Experimento I

Se observó una tendencia de mayor incidencia de enfermedad con la aspersión de hongos solos en comparación con la inoculación de *Neochetina* (Cuadro 4). La inoculación de *G. cingulata* mediante aspersión resultó en mejor incidencia de la enfermedad que la inoculación de cualquiera de los tres patógenos con *Neochetina* a los 14 DDI. No hubo diferencias significativas en la incidencia de enfermedad entre los tres patógenos inoculados con cualquiera de los dos métodos, a los 14 y 28 DDI. Sin embargo, se observaron diferencias en relación al control con la aspersión de los tres patógenos, a los 14 y 28 DDI. La aspersión de *M. roridum* resultó en una mayor incidencia de la enfermedad que la inoculación de los tres patógenos y la inoculación con *Neochetina*, luego de 28 DDI. *Alternaria* sp. y *G. cingulata* no tuvieron diferencias en incidencia de enfermedad a los 28 DDI. Los tratamientos inoculados con *Neochetina* no fueron significativamente diferentes del control tratado con *Neochetina* durante los 14 y 28 DDI.

No se observaron diferencias significativas en la severidad de la enfermedad entre los tres patógenos a cualquiera de los dos tiempos de inoculación (Cuadro 5). La aspersión de *G. cingulata* y *M. roridum* mostraron diferencias significativas en relación al control para ambos tiempos de inoculación. La severidad de la enfermedad causada por la aspersión de *G. cingulata*, fue mayor que el daño causado por la inoculación de los tres patógenos con *Neochetina* a los 14 DDI (Fig. 6-A y B). Sin embargo a los 28 DDI, la severidad de la enfermedad fue mayor con la aspersión de *M. roridum* que con cualquiera de los tres hongos en combinación con *Neochetina*. Los tratamientos

Cuadro 4. Incidencia y severidad de la enfermedad causada por hongos patógenos inoculados por aspersión y con *Neochetina eichhorniae* en invernadero (Exp 1).

Tratamientos	Incidencia de la enfermedad ¹				Severidad de la enfermedad ²			
	14 DDI ³		28 DDI		14 DDI		28 DDI	
	Aspersión	Con Ne ⁵	Aspersión	Con Ne	Aspersión	Con Ne	Aspersión	Con Ne
<i>Alternaria</i> sp.	6.3 abc ⁴	0.0 c	10.2 ab	5.9 bc	2.8 abc	0.0 c	7.3 abc	5.5 bc
<i>G. cingulata</i>	10.7 a	3.3 bc	10.4 ab	6.2 bc	5.0 a	2.0 abc	9.0 ab	5.0 bc
<i>M. roridum</i>	6.8 ab	2.6 bc	12.0 a	5.9 bc	4.0 ab	1.5 bc	11.3 a	4.8 bc
Control	0.0 c	0.0 c	5.0 c	2.9 c	0.0 c	0.0 c	3.8 c	3.0 c

¹ Valores representan el porcentaje de hojas con lesiones de hongos (Hojas con daño/ Total de hojas x 100).

² Basado en el promedio de lesiones por hoja.

³ DDI= días después de la inoculación de los hongos.

⁴ Promedios en y entre columnas con letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de DMS.

⁵ *N. eichhorniae* se colocó sobre una placa con cada hongo por 30 min

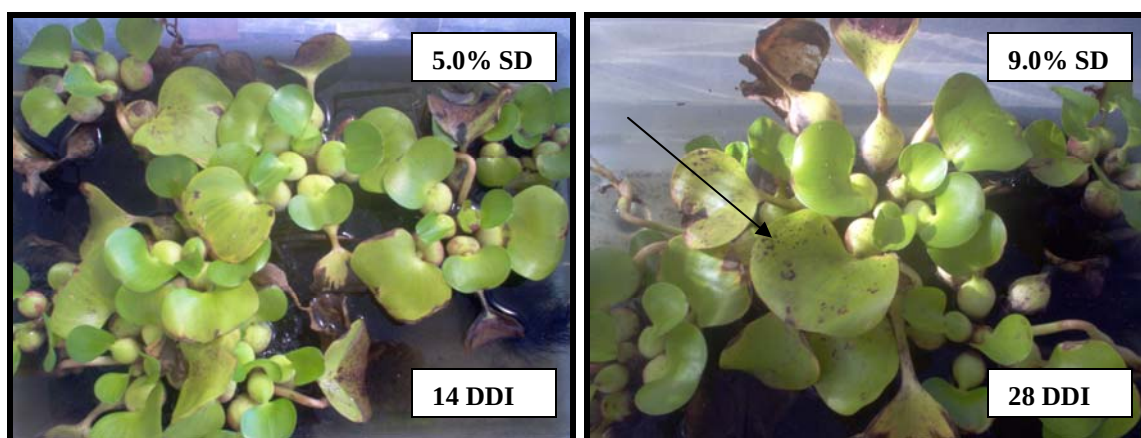
inoculados con *Neochetina* no mostraron diferencias significativas en relación al control.

Experimento II

El cuadro 5 muestra la incidencia y severidad de la enfermedad causada por los tres patógenos inoculados por aspersión sin y con *Neochetina*. Se observó una tendencia de mayor incidencia de enfermedad en la aspersión de los hongos sin *Neochetina*. *Glomerella cingulata* causó mayor incidencia de la enfermedad cuando se asperjó solo, que combinado con *Neochetina* a los 14 DDI. La incidencia de la enfermedad para los tres patógenos sin *Neochetina* mostró diferencias significativas en relación al control. La inoculación de *M. roridum* fue similar a la inoculación con *Neochetina* a los 14 DDI. A esta misma fecha, *M. roridum* con *Neochetina* mostró diferencias significativas en relación al control. A los 28 DDI la incidencia de la enfermedad fue mayor para la aspersión de *G. cingulata* que la combinación con *Neochetina*. Los tres patógenos sin *Neochetina* no mostraron diferencias entre sí, pero se observaron diferencias con respecto al control. *Myrothecium roridum* y *Alternaria* sp. no mostraron diferencias en incidencia de enfermedad para ambos métodos de inoculación durante esta fecha. La incidencia de la enfermedad para todos los tratamientos fue mayor que el control no tratado y el control con *Neochetina* a los 28 DDI.

No se observaron diferencias significativas en la severidad de la enfermedad para cualquiera de los tres hongos asperjados sin *Neochetina*.

A



B

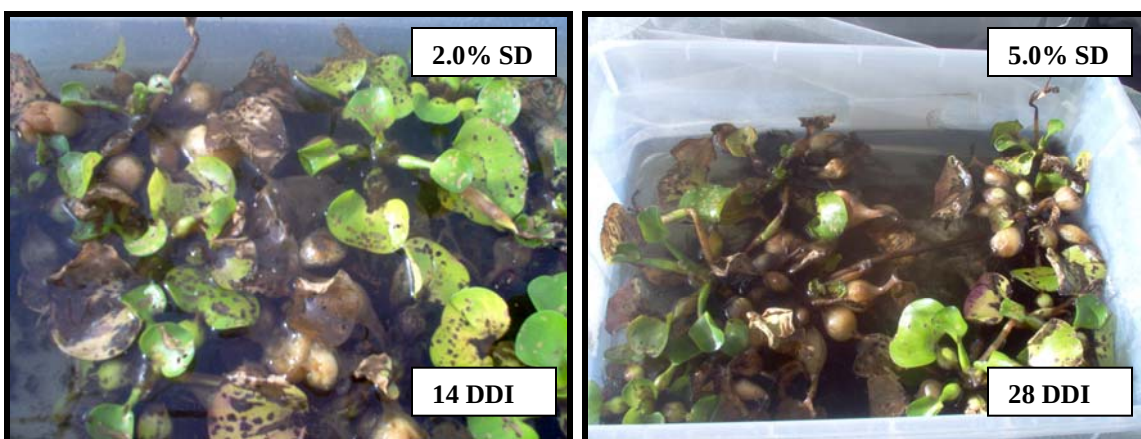


Figura 6. Severidad de la enfermedad en plantas de jacinto de agua a los 14 y 28 DDI: A) Asperjadas con *G. cingulata* y B) inoculadas con *Neochetina* y *G. cingulata* en invernadero 14 y 28 DDI.

Cuadro 5. Incidencia y severidad de la enfermedad causada por hongos patógenos inoculados por aspersión sin y con *Neochetina eichhorniae* en invernadero (Exp. 2).

Tratamientos	Incidencia de la enfermedad ¹				Severidad de la enfermedad ²			
	14 DDI ³		28 DDI		14 DDI		28 DDI	
	Sin Ne	Con Ne ⁵	Sin Ne	Con Ne	Sin Ne	Con Ne	Sin Ne	Con Ne
<i>Alternaria</i> sp.	24.2 ab ⁴	19.0 bc	29.4 bc	18.7 bc	13.3 abc	13.0 bc	30.5 bc	17.0 bc
<i>G. cingulata</i>	32.3 a	18.6 bc	44.3 a	22.2 bc	31.0 a	12.6 bc	61.0 a	21.3 bc
<i>M. roridum</i>	31.0 a	32.1 a	37.7 ab	31.1 abc	27.8 ab	29.3 ab	58.8 a	40.3 ab
Control	7.7 c	7.4 c	8.5 d	8.3 d	5.3 c	5.6 c	8.3 c	8.0 c

¹ Valores representan el porcentaje de hojas con lesiones de hongos (Hojas con daño/ Total de hojas x 100).

² Basado en el promedio de lesiones por hoja.

³ DDI= días después de la inoculación de los hongos.

⁴ Promedios en y entre columnas con letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a la prueba de DMS.

⁵ *N. eichhorniae* se liberó luego de realizar una aspersión de los hongos.

Sin embargo, la severidad de la enfermedad fue significativamente mayor en los tratamientos de aspersión de *G. cingulata* solo en comparación a tratamientos con *Neochetina* a los 14 y 28 DDI. Los tres patógenos asperjados solos, no mostraron diferencias entre sí a los 14 DDI. Sin embargo, *G. cingulata* y *M. roridum* mostraron diferencias significativas con *Alternaria* sp., a los 28 DDI. La severidad de la enfermedad para *M. roridum* con *Neochetina* fue significativamente diferente del control a cualquiera de los dos tiempos de inoculación. Se observó mayor número y desarrollo de lesiones para los tratamientos con *Neochetina* en el segundo experimento (Fig. 7).

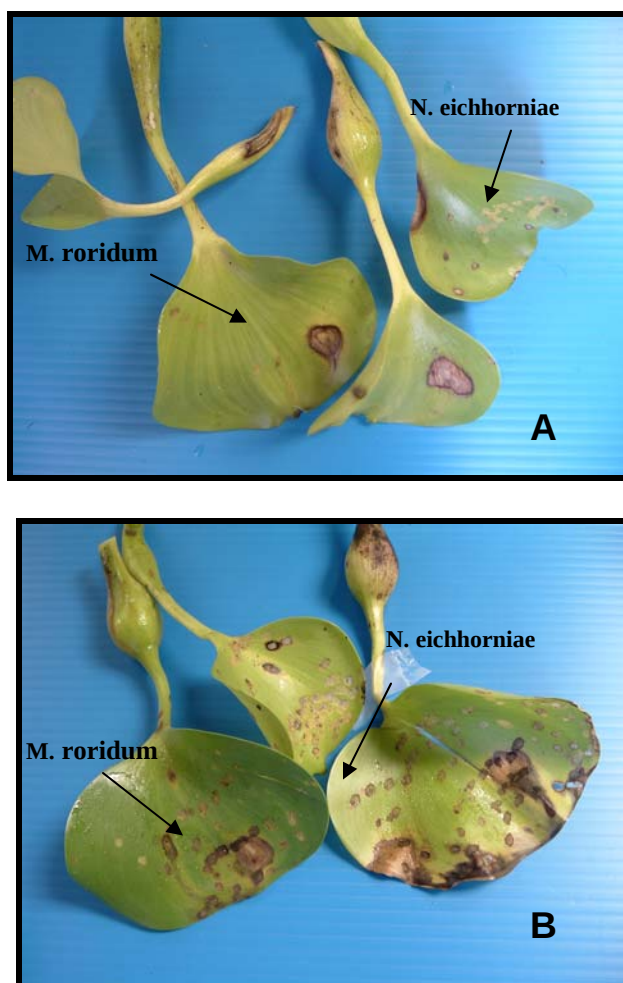


Figura 7. Lesiones causadas por la aspersion de *Myrothecium roridum* con *Neochetina* en hojas de jacinto de agua; A) experimento 1 y B) experimento 2.

DISCUSIÓN

1. Catastro e identificación de patógenos

Se aislaron e identificaron 16 géneros de hongos asociados al follaje del jacinto de agua en su ambiente natural en cuatro lagos de Puerto Rico. Los hongos identificados en este estudio, no han sido reportados en Puerto Rico para esta planta. Sin embargo, se han aislado hongos del jacinto de agua en otras regiones del mundo como: USA, Australia, Egipto, India, Malasia y África del Sur (Elwakil et al., 1989; Shabana et al., 1995; El Morsy, 2004; Bardur-ud-Din, 1978; Aneja y Singh, 1989).

El Lago Carraízo y el Caño Majagual mostraron la mayor cantidad de hongos aislados lo cual podría estar relacionado a la época en que se realizaron los muestreos. Los muestreos en estas dos localidades se realizaron en los meses más lluviosos (septiembre y diciembre), mientras que en el Lago Dos Bocas y el Lago de Villalba los muestreos se realizaron durante el verano (febrero y marzo), la época mas seca. La humedad en las distintas localidades podría tener alguna relación con la cantidad de hongos presentes en las plantas de jacinto de agua. Se recomienda realizar los muestreos durante la misma época para cada localidad.

A pesar de que no se evaluó la patogenicidad de todos los hongos encontrados en este estudio, en su mayoría son hongos fitopatógenos pertenecientes a los Ascomycetos. Se identificaron *Curvularia* spp. *Colletotrichum* spp. y *Nigrospora* spp. con alta frecuencia. Los aislados de *Curvularia* y *Nigrospora* se encontraron en su mayoría, asociados a diferentes lesiones en una misma planta, y a tejidos afectados por ácaros y picudos. Charudattan et al. (1978) observaron especies de *Curvularia* en plantas de jacinto de agua, sin embargo no lo mencionaron como un patógeno con

potencial para controlar esta maleza. Varias especies de *Curvularia*, se han reportado con mucha frecuencia, causando lesiones foliares necróticas, aunque se considera un patógeno débil (Schwartz y Mohan, 1995). *Nigrospora* spp. es considerado principalmente un saprófito o patógeno débil. En muchas ocasiones se encuentra asociado a otros patógenos y a lesiones de insectos. Charudattan *et al.* (1978), encontraron *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) Mason, y *Nigrospora oryzae* (Berk. & Br.) Petch en plantas afectadas por el ácaro, *Orthogalumna terebrantis* y el picudo, *N. eichhorniae*, sin embargo no encontraron ninguna relación entre los insectos y las especies de *Nigrospora*. En este mismo estudio se evaluó la patogenicidad de otros hongos encontrados en plantas afectadas por *O. terebrantis* y *N. eichhorniae* y se encontró poca patogenicidad de especies de *Alternaria*, *Cladosporium*, *Nigrospora* y *Pestalotia*.

Los hongos de mayor interés para nuestro estudio fueron: *Alternaria*, *M. roridum* y *G. cingulata*, encontrados causando daño severos en las plantas de jacinto de agua. El género de *Alternaria* es fácil de reconocer por la morfología de sus conidias formadas en cadenas o solitarias, típicamente ovoides, frecuentemente afilada, de color marrón pálido. Las conidias son multicelulares con septos transversales y oblicuos (Rotem, 1994). Este género está compuesto por más de 50 especies en las cuales se incluyen hospederos específicos y otros patógenos no específicos (Shabana *et al.*, 1995). Algunas especies de *Alternaria* han sido reportadas causando daños severos en el cultivo de la cebolla (Schwartz y Mohan 1995). Fernández, (2005) comprobó la patogenicidad de *Alternaria allii* y *Alternaria tenuissima* en el cultivo de la cebolla en predios experimentales y comerciales en la región sur de Puerto Rico. Este género

incluye patógenos que afectan cultivos de importancia económica, pero algunas especies tienen limitado rango de hospedero. Por ejemplo, *A. cassiae*, *A. crassa*, *A. macrospora* y *A. eichhorniae* se han encontrado causando daños severos en algunas malezas y se han utilizado como agentes de control (Walker, 1980; Raj y Ponnappa, 1970). Aunque algunos de estos hongos no son específicos para un hospedero, se podrían utilizar en ambiente acuático en forma selectiva teniendo en cuenta los cultivos cercanos a los cuerpos de agua.

Myrothecium roridum se ha reportado causando lesiones en jacinto de agua en la India, Filipinas, Tailandia, Malasia, Indonesia, México y algunas regiones de África (Evans y Reeder, 2001; Barreto y Evans, 1996). Este es un hongo de distribución cosmopolita, considerado como un habitante común del suelo, frecuentemente, asociado a materia orgánica en descomposición en condiciones de alta humedad (Bunster y Torres, 2003). *Myrothecium roridum* se considera uno de los principales patógenos causantes de canchros y pudrición de la raíz en plántulas de café desarrolladas en viveros (Mercado, 1997). Otros estudios reportan que este hongo puede comportarse como un patógeno ocasionando manchas foliares, pudriciones y otros síntomas en diversas plantas ornamentales y frutales tales como el melón y la sandía (Bunster y Torres, 2003; Singh y Chohan, 1984). En este estudio se encontró a *M. roridum* causando daño severo en las hojas de jacinto, siendo aislado en el Caño Majagual en Mayagüez.

Colletotrichum es uno de los principales hongos patógenos responsables de importantes pérdidas económicas en frutales y diferentes cultivos de regiones tropicales y subtropicales (Bailey y Jeger, 1992). Se ha reportado causando la

enfermedad de antracnosis en frutales de mangó, parcha, fresa, china, papaya, aguacate, manzana, almendra y otros cultivos de importancia económica (Cedeño et al., 1994; Arauz, 2000). *G. cingulata* (estado teleomorfo de *C. gloeosporioides*) se reportó en Sri Lanka ocasionando daños en el jacinto de agua, sin embargo no se conoce mucho acerca de su patogenicidad en esta planta (Evans y Reeder, 2001).

2. Pruebas de patogenicidad *in vitro*

La patogenicidad de *Alternaria sp.*, *M. roridum* y *G. cingulata* fue confirmada, al completar los postulados de Koch, luego de observar las lesiones que se desarrollaron durante las pruebas *in vitro*. Este estudio permitió discriminar el grado de virulencia entre los tres hongos evaluados y también se evidenció su potencial patogénico para invadir el tejido foliar de las plantas de jacinto de agua.

El desarrollo de la enfermedad y el tiempo de aparición de síntomas fueron diferentes para los tres hongos patógenos bajo estudio. Cada patógeno desarrolló lesiones particulares de distintos tamaños luego de la inoculación. También se observó una variación en el número de lesiones desarrolladas por cada hongo. El estudio demostró que *Alternaria sp.* fue el hongo que presentó las lesiones de mayor tamaño (2-4 mm). Resultados similares obtuvo Charudattan (2001) quien describió las lesiones de *A. eichhorniae* como necróticas, de 2-4 mm de longitud y rodeadas de un halo clorótico. Shabana et al. (1995), describieron esta especie como una altamente virulenta, que causa la enfermedad del tizón de la hoja ("leaf blight").

En nuestro estudio, las plantas inoculadas con *Alternaria*, desarrollaron lesiones foliares nueve días después de la inoculación. Estos datos contrastan con un estudio realizado por Elwakil y colaboradores (1989), donde evaluaron diferentes cepas de *A.*

alternata y estas desarrollaron síntomas de enfermedad de dos a tres días luego de su inoculación en plantas de jacinto de agua.

La especie de *Alternaria* aislada en este estudio, no ha sido descrita, lo que nos sugiere que podría ser una especie nueva. (Dr. Emory Simmons, com. pers.,). Según los datos obtenidos en las pruebas *in vitro*, esta especie puede ser utilizada para el control del jacinto de agua.

El aislado de *Alternaria* mostró poca producción de conidias en medio de PDA, lo cual dificultó la preparación del inóculo. Para aumentar la producción de conidias de *Alternaria* se recomienda el uso de otros medios de cultivos como el agar de papa y zanahoria, el cual promueve su esporulación (Simmons, 1992). Por otro lado, estudios demuestran que el uso de micelio, de algunos aislados de *Alternaria* (Ae5), como fuente de inóculo, causan severidad de daño similar a la que se obtiene cuando se utiliza una suspensión de conidias (Shabana, 2005 y Shabana et al., 1995).

Los síntomas de *M. roridum* se observaron cinco DDI y las lesiones se desarrollaron a medida que aumentó el tiempo de incubación. Los síntomas de *M. roridum* observados en este estudio, fueron similares a los descritos por Charrudattan (2001), donde indica presencia de lesiones necróticas de 1-2 mm de longitud, con márgenes marrón oscuro, y en el centro rodeado de una masa de conidias negras. Hasta el presente no se han reportado estudios que determinen la virulencia de *M. roridum* en jacinto de agua. Sin embargo, Charudattan lo menciona en sus investigaciones como un potencial agente de control biológico (Charrudattan, 2001). Estudios recientes, sugieren que algunas especies de *Myrothecium*, pueden utilizarse como bioherbicidas contra algunas malezas tales como: *Euphorbia esula*, *Senna*

obtusifolia, *Ipomoea cocinea*, *I. heredacera*, *I. purpurea* y *Jacquemontia tamnifolia* (Walker y Tilley, 1997; Millhollon, et al., 2003).

La incidencia de la enfermedad para *M. roridum* fue alta en las pruebas *in vitro*. Este hongo produjo una gran cantidad de conidias en el medio de PDA. Según los datos encontrados en las pruebas *in vitro*, *M. roridum* podría ser una alternativa de control para el jacinto de agua. Sin embargo su utilización podría estar limitada debido a su actividad patogénica en cultivos de importancia económica. Según Rodríguez et al. (1996), *M. roridum* puede ocasionar pérdidas de hasta un 100% a los productores de café en Puerto Rico.

Glomerella cingulata presentó pequeñas lesiones de 0.5 a 1.5 mm de longitud y colonizó el tejido foliar rápidamente desarrollando síntomas severos de la enfermedad a los tres DDI. Este patógeno alcanzó mayor incidencia de enfermedad a los 14 y 28 DDI en la prueba *in vitro*. También la producción de numerosas conidias en medio de PDA permitió el buen desarrollo de lesiones y una alta severidad de la enfermedad. Aunque *G. cingulata* no se menciona como un excelente agente de control para el jacinto de agua, este estudio demostró que es una especie patogénica y sus lesiones pueden causar daños significativos a la planta. Por otra parte algunas especies de este género se utilizan como herbicidas biológicos para el control de malezas. Por ejemplo *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (Collego®), fue utilizado para el control de *Aeschynomene virginica* en arroz y soya (Smith, 1986; y Te Beest, 1982). Al igual que *M. roridum*, *G. cingulata* es una especie patogénica en cultivos de importancia económica, por lo cual su utilización como control biológico del jacinto de

agua sería limitado y dependería de la especificidad del aislado evaluado para esta maleza.

Algunos de los síntomas observados en las plantas no tratadas, especialmente la clorosis y marchitamiento, podrían estar asociados a patógenos secundarios o saprófitos, que se desarrollaron dadas las condiciones de alta humedad en la cual se incubaron las plantas. Además del marchitamiento de las hojas, por la pérdida de agua, se observó un aumento en el desarrollo de hongos saprófitos y pudrición y envejecimiento del tejido foliar. La pudrición y muerte de las hojas puede afectar la toma de datos, al momento de contar el número de lesiones. Por esta razón se recomienda utilizar períodos cortos de incubación para los ensayos *in vitro*.

3. Diseminación de hongos patógenos por *Neochetina eichhorniae* bajo condiciones de invernadero.

Experimento I

El método más efectivo para el desarrollo de enfermedad, fue la inoculación por aspersión de los tres hongos patógenos. La combinación de hongos e insectos indicó poca incidencia y severidad de la enfermedad causada por los hongos, contrario a lo observado en las pruebas *in vitro*. Como se explicó anteriormente, las cámaras húmedas utilizadas en las pruebas *in vitro* promueven un ambiente propicio para el desarrollo de los hongos. Aunque no se tomaron en consideración las condiciones de humedad y temperatura en el invernadero, se conoce que estos factores influyen en el desarrollo y germinación de los hongos. Por esto se recomienda el uso de bolsas plásticas para cubrir las bandejas tratadas. Esto aumentaría la humedad relativa y por lo tanto se lograría una mejor germinación de los hongos (Shabana, 2005).

Los resultados del primer experimento nos sugieren, que el insecto podría ser un vector del hongo de forma parcial. Este puede de alguna forma diseminar las esporas o conidias de los hongos a través del aparato bucal o las patas, logrando una infección en las hojas. Esto compara con un estudio realizado por Galbraith (1987b), donde encontró que las esporas de *A. zonatum* fueron transportadas en las patas y en el tracto digestivo de *N. eichhorniae*.

Experimento II

En el segundo experimento observamos mayor incidencia de enfermedad en los tratamientos sin *Neochetina* que los combinados con el picudo. En este experimento, todos los tratamientos se asperjaron con los hongos solos, por lo tanto existe más cantidad de conidias en la superficie de las hojas. Sin embargo, en los tratamientos combinados con *Neochetina* no se observó mayor número de lesiones de los patógenos. En nuestros experimentos no se realizaron estudios minuciosos de las heridas causadas por *Neochetina* en las hojas de jacinto de agua. Sin embargo, éstas no mostraron síntomas de lesiones de hongos. El picudo *Neochetina* se alimenta del tejido foliar de las hojas, removiendo gran parte del tejido epidermal, y esto provoca que la planta se debilite y por consiguiente aumente la pérdida de agua (Jullien, 2000). El daño foliar causado por *Neochetina*, en las plantas podría influenciar en el desarrollo de los hongos ya que existe menos área foliar expuesta para el desarrollo de lesiones.

Den (1998), encontró mayor desarrollo de lesiones en la combinación de insectos y hongos que aquellos tratamientos inoculados con hongos solos. Este también encontró poco desarrollo de lesiones en las heridas causadas por *Neochetina* en tratamientos combinados con hongos e insectos. Por otro lado, en un estudio

realizado por Charudattan et al. (1978), no encontraron relación alguna entre *Neochetina* spp. y la incidencia de la enfermedad causada por los patógenos. Sin embargo las heridas causadas por los insectos crearon una vía de entrada para los hongos aumentando su patogenicidad. Nuestros hallazgos indican que cuando se realiza una aspersión directa del patógeno, se obtiene un mejor desarrollo de lesiones que utilizando el método de inoculación con el insecto.

En los tratamientos asperjados con hongos se observó un aumento en la incidencia y severidad de daño, sin embargo se observó desarrollo de nuevos brotes. Contrario a lo observado en tratamientos con *Neochetina*, donde hubo poca incidencia y severidad de la enfermedad pero no se observó desarrollo de nuevos brotes. Es por esto que mencionamos que la combinación de ambos controles podría resultar en un excelente control de la maleza representado en mortalidad de las hojas y poca producción de brotes. Esto compara con estudios realizados por Moran (2005), donde observó mayor severidad de la enfermedad y desarrollo de lesiones, cuando inoculó plantas de jacinto de agua con especies de *Neochetina*, seguido de una aspersión del hongo *C. piaropi*. Moran encontró que la combinación de ambos agentes, causó una disminución en la producción de brotes y hojas. En otro estudio realizado en México, se encontró una disminución en el peso fresco (29%), número de plantas por metro cuadrado (59%), número de hojas verdes por planta (65%) y número de nuevos brotes (85%), luego de dos meses de haber realizado una aplicación combinada de especies de *Neochetina* y dos aspersiones de *C. piaropi* y *A. zonatum* en plantas de jacinto de agua (Martínez y Gómez, 2007).

Se observó un aumento en la incidencia de enfermedad y severidad de daño, sin embargo el daño foliar causado por los hongos no resultó en valores tan altos como lo observado durante las pruebas *in vitro*. El desarrollo de las lesiones fue de forma localizada limitándose al follaje asperjado. Las hojas que emergieron luego que las plantas fueron inoculadas, no presentaron lesiones de hongos y el crecimiento sano redujo la proporción del tejido enfermo disminuyendo los valores de incidencia y severidad de la enfermedad en las plantas.

Uno de los aspectos más importantes en el desarrollo de enfermedades causadas por hongos patógenos son la humedad y la temperatura (Duthie, 1997). El pobre desarrollo de lesiones de hongos podría estar relacionado a condiciones desfavorables de alta temperatura y baja humedad que pudieron ocurrir en los meses de julio a noviembre en Mayagüez, bajo condiciones de invernadero. La mayoría de los hongos se desarrollan en temperaturas desde 23- 28° C. Se ha documentado que el mayor obstáculo al utilizar un patógeno foliar, es la necesidad de humedad mediante la formación de rocío sobre la hoja para promover la germinación y la infección del hongo en la planta (Shabana et al., 1997; Huber, 1992; Talley et al., 2002). Shabana realizó un estudio donde menciona que un largo período de rocío (26 a 28 horas) puede asegurar el desarrollo de la enfermedad y una mayor infección del hongo (Shabana, 2005). Sin embargo, esto no ocurre en las condiciones naturales donde crece la planta.

En el invernadero el estrés físico al que se exponen las plantas es crítico ya que las temperaturas suelen ser más altas que en condiciones de laboratorio lo cual es difícil de controlar. También la pérdida de agua en las plantas a través de la

evapotranspiración aumenta, causando marchitez en las hojas e interfiriendo con el desarrollo de lesiones y la colección de datos. En nuestro estudio en las pruebas realizadas en invernaderos, no fue posible controlar la humedad ni la temperatura, por lo que se recomienda realizar un estudio de estos parámetros y su efecto sobre los hongos en cámaras de crecimiento. Shabana (2005), recomienda utilizar emulsiones invertidas, aceite vegetal, y/o agentes humedecibles para lograr un mayor período de humedad al momento de aplicar el inóculo. Estos productos aumentan la duración de la humedad en el follaje y permiten que las esporas y/o el micelio del hongo, se peguen a la superficie foliar, logrando un mejor desarrollo de la lesión (Boyette et al., 1992). En nuestros experimentos no se utilizó ningún aditivo que permitiera una mayor infección del patógeno, sin embargo se simulaban las condiciones dadas en el ambiente natural de la planta.

CONCLUSIÓN

- Se encontró una gran diversidad de hongos fitopatógenos afectando las plantas de jacinto de agua en las cuatro localidades estudiadas.
- Los datos de este estudio podrían ser útiles para futuras investigaciones creando una base de datos para el uso hongos patógenos contra el jacinto de agua.
- *Alternaria* sp., *M. roridum* y *G. cingulata* fueron altamente virulentos y no han sido previamente reportados afectando plantas de jacinto de agua en Puerto Rico.
- Las pruebas de patogenicidad *in vitro* demostraron el potencial patogénico de *Alternaria* sp., *M. roridum* y *G. cingulata* para invadir el tejido foliar de las plantas de jacinto de agua.
- El aislado de *Alternaria* sp. evaluado es un candidato potencial para el control del jacinto de agua basado en este estudio.
- *Neochetina eichhorniae* contribuyó de forma parcial a la diseminación de los hongos fitopatógenos, pero no aumentó la incidencia y severidad de la enfermedad.
- La integración de insectos y patógenos puede ser una alternativa viable para complementar el control actual del jacinto de agua.

RECOMENDACIONES

- Continuar con estudios que evalúen la virulencia de estos aislados *Alternaria* sp., *M. roridum* y *G. cingulata*.
- Estudiar la biología de estos patógenos para determinar sus condiciones óptimas de crecimiento.
- Evaluar la patogenicidad de los hongos encontrados durante el catastro sobre las plantas de jacinto de agua.
- Estudiar la combinación de diferencias aislados de hongos en el jacinto de agua.
- Identificar y estudiar los factores que influyen en el éxito, desarrollo y establecimiento de estos controles biológicos e identificar los factores que restringen o previenen el control de la maleza.
- Desarrollar métodos de producción de inóculo para la formulación y aplicación de estos patógenos como micoherbicidas.
- Realizar un estudio donde se evalué la incidencia y severidad de la enfermedad utilizando micelio como inóculo, ya que es más fácil utilizar fragmentos de micelio que una suspensión de conidias.
- Evaluar el efecto de aplicaciones de estos patógenos sobre cultivos aledaños o cercanos a los predios con jacinto de agua.
- Estudiar el uso de productos que promuevan la viabilidad y germinación de las esporas para aumentar la patogenicidad del inóculo.
- Para obtener un mejor control de malezas al utilizar hongos patógenos se recomienda aplicarlos aumentando el nivel de humedad y temperatura para promover un buen desarrollo del hongo.

LITERATURA CITADA

Abdalla, C.W. y L.W. Libby. 1987. Agriculture and ground water quality: A public policy perspective. *Am. J. Alternative Ag.* 2: 37-40.

Abel-Rahim, A.M. 1984. *Phoma sorghina* causing a leaf spot of waterhyacinth in the Sudan. *Plant Path.* 33:429.

Abel-Rahim, A.M. y S. Tawfig. 1984. Pathogenicity of fungi and bacteria from the Sudan to water hyacinth. *Weed Research*, UK 24:233-8.

Aneja, K. R. y Singh, K. 1989. *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler a pathogen of waterhyacinth with biocontrol potential. *Tropical Pest Management* 35: 354-356.

Arauz, L.F. 2000. Mango anthracnose: Economic impact and current options from integrated management. *Plant Disease* 84: 600-611.

Arbelo- García, J. G. 1990. Catastro de Bacterias presentes en le superficie de *Eichhornia crassipes* solms en tres áreas del Río Hondo de Añasco. Thesis M. S., Dept. Protección de Cultivos, U.P.R. Recinto Universitario de Mayagüez, Mayagüez, P.R. 55 pp.

Bailey, J.A. y M.J. Jeger. (eds). 1992. *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. CAB International. Wallingfr UK. 80-120.

Bardur-ud-Din, A. A. 1978. Control of aquatic weeds. Second Annual report, Project No. FG -Pa-271. University of the Punjab. Lahore, Pakistán. 271pp.

Barnett H. L. y B.B. Hunter. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth edition. APS Press. USA-Minnesota. 10-15 p.

Barreto, R.W. y H.C. Evans. 1996. Fungal pathogens of some brazilian aquatic weeds and their potential use in biocontrol. In: Moran, V. C. and J. H. Hoffmann., (ed.) Proceedings of the IX International Symposium on Biological Control of Weeds, Stellenbosch, South Africa, 19-26 January, 1996. Cape Town, University of Cape Town, 121-126.

Barrett, S.C.H. 1980. Sexual reproduction in *Eichhornia crassipes* (water hyacinth). II. Seed production in natural populations. *J. App. Ecol.* 17: 113-124.

Barrett, S.C.H. 1989. Waterweed Invasions. *Scient. Am.* 61(4): 90-96.

Boyette, C.D., P.C. Quimby., Jr., W.J. Connick, Jr., D.J. Daigle, y F. E. Fulgham. 1992. Progress in the production, formulation and application of mycoherbicides. In D.O. TeBeest, ed. *Microbial Control of Weeds*. London: Chapman and Hall 209-225.

Bridges, D.C. 1994. Impact of weeds on humans endeavors. *Weed Tech.* 8: 392-395.

Bunster, A y M. Torres. 2003. Incidence of *M. roridum* Tode: Fries as crown root agent of pansy neck plants (*Viola tricolor* L.) in the Quillota Province, Chile. Bol. Micológico. Vol 18: 39-45.

Cedeño, L., S. Mohali, y E. Palacios. 1994. Antracnosis causada por dos cepas de *Glomerella cingulata* en frutos de parchita. Fitopatol. Venez. 6(2): 30-33.

Center, T.D. 1994. Biological control of weeds: waterhyacinth and waterlettuce. In Pest Management in the Subtropics: Biological Control a Florida Perspective. D. Rosen., F.D. Bennet y Capinera, J.L. (Eds.). Intercept, Ltd., Andover, UK. 737 pp.

Center, T.D., J.H. Frank, y F.A. Dray, jr. 1997. Biological control. In: D. Simberloff, D.C. Schmitz, y T. C. Brown (eds), Strangers in paradise: impact and magement of nonindigenous species in Florida. Island Press, Washington, DC. pp. 245-263.

Center, T. D. y M.P. Hill. 1999. Host specificity of the pickerelweed borer, *Bellura densa* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) a potentially damaging natural enemy of water hyacinth. In Jullien, M.P., M.H. Jullien, y T.D Center, (ed.). Proceeding of the 1st IOBC Water Hyacinth Working Group, Harare, November 1998, 67 pp.

Center, T.D., M.P Hill., H. Cordo, y M. H. Julien. 2002. *Water hyacinth*. In: Van Driesche R., et al. (ed.). Biological Control of Invasive Plants in the Eastern United States. USDA Forest Service Publication FHTET-2002-04, Morgantown, West Virginia, 41-64 pp.

Charudattan, R. 1986. Integrated control of waterhyacinth (*Eichhornia crassipes*) with a pathogen, insects, and herbicides. Weed Sci 34: 26–30.

Charudattan, R. 1990. Biological control by means of fungi. In: Murphy, K. J. & A. Pieterse (eds), Aquatic Weeds. The ecology and management of nuisance aquatic vegetation. Oxford University Press, Oxford, England, pp. 186-201.

Charudattan, R. 1996. Controlling water hyacinth. Integrated pest management Florida newsletter. University of Florida, V2N3, 103 p.

Charudattan, R. 2001. Biological control of water hyacinth by using pathogens: Opportunities, challenges and recent developments. In biological and integrated control of water hyacinth, *E. crassipes*. (ed.) Jullien, M.H., M.P. Hill., T.D. Center y D. Jianqing. ACIAR Proceedings 102. pp. 21-28.

Charudattan, R. 2002. Bioherbicides for the control of water hyacinth: feasibility and needs. Plant pathology Department, Center of Aquatic Plant, Florida University. Appendix 6: 9 pp.

Charudattan, R., B.D. Perkins y R.C. Littell. 1978. Effects of fungi and bacteria on the decline of arthropod damaged water hyacinth (*E. crassipes*) in Florida. *Weed Science*. 26 (2): 100-107.

Charudattan, R., S.B. Linda., M. Kluepfel y Y.A. Osman. 1985. Biocontrol efficacy of *C. rodmani* on waterhyacinth. *Phytopathology*, 75: 1263-1269.

Chippendale, J. F. 1995. The Biological control of Noogoora burr (*Xathium occidentale*) in Queensland: an economic perspective. In: Delfosse, E.S., y R.R. Scott (eds.) *Proceedings 8th International Symposium on Biological Control of Weeds*. CISRO. Melbourne, Australia. pp. 185-192.

Chokar, R.S. y R.S. Balyan. 1999. Competition and control of weeds in soybean. *Weed Sci*. 47: 107- 111.

Cordo, H. A. 1999. New agents for biological control of water hyacinth. In Hill, M. P., Julien, M. H. y T. D. Center (ed.). *Proceedings of the 1st IOBC Water Hyacinth Working Group*, Harare, November 1998. 68-74.

Cullen, J.M., y M.J. Whitten. 1995. Economics of classical biological control: a research perspective. In: Hokkanen, H.M. y J.M. Lynch. *Biological control: Benefits and risks*. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 270-276.

Daniel, J.T., G.E. Templeton y R.J. Smith, Jr. 1973. Biological control of northern jointvetch in rice with an endemic fungal disease. *Weed Sci*. 21(4): 303-307.

DeLoach, C. J. 1997. Biological control of weeds in North America. In Luken, J.O y J.W. Thieret, (eds.). *Assesment and management of plant invasions*. Springer-Verlag, New York. pp. 172-194.

Den, B.A. 1998. Biological control of water hyacinth using plant pathogens: dual pathogenicity and insects interactions. *Proc. Ist IOBC Water Hyacinth Working Group*: 75-79.

Duthie, J. A. 1997. Models of the response of foliar parasites to the combined effects of temperature and duration of wetness. *Phytopathol* 87: 1088-1095.

El-Morsy, E. M. 2004. Evaluation of microfungi for the biological control of waterhyacinth in Egypt. *Fungal Diversity* 16: 35-51.

Elwakil, M.A., E.A. Sadik, E.A. Fayzalla, y Y.M. Shabana. 1989. Biological control of water hyacinth with fungal plant pathogens in Egypt. In: Delfosse, E.S., (ed.), *Proceedings of the VII International Symposium on Biological Control of Weeds*, Rome, Italy, 1988, 483- 497.

Evans H.C. y R.H. Reeder. 2001. Fungi Aassociated with *E. crassipes* (Water Hyacinth) in the upper Amazon Basin and prospects for their use in biological control.

Biological and integrated control of water hyacinth, *E. crassipes*, by Julien, M.H., M.P. Hill, T.D. Center y D. Jianqing (ed.), ACIAR Proceedings 102: 62-70.

Fernández, G. J. 2005. Incidencia y caracterización: morfología, patogénica y genética de *Alternaria* spp. en cultivos de cebolla del sur de Puerto Rico. M.S. Tesis. Departamento de Protección de Cultivos, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez, Mayagüez, P.R. 185 pp.

Freeman T. E. 1977. Biological control of aquatic weeds with plant pathogens. *Aquat. Bot.* 3: 175-84.

Freeman T. E., R. Charudattan y K.E. Conway. 1978. Biological control of water weeds with plant pathogens. Publication, Water Resources Research Center, WRRP-PuB-45:76 p.

Freeman T. E, y R. Charudattan. 1984. *Cercospora rodmanii* Conway, a biocontrol agent of waterhyacinth. *Florida Ag. Exp. Sta. Bull.* 842. University of Florida, Gainesville, FL, 18 pp.

Galbraith, J. C. 1987a. Microorganisms on water hyacinth in Eastern Australia: a survey in relation to biological control by insects. *Biol. Agric. and Hortic.* 4: 283.

Galbraith, J. C. 1987b. The pathogenicity of an Australian isolate of *Acremonium zonatum* to water hyacinth, and its relationship with the biological control agent, *Neochetina eichhorniae*. *Aust. J. Agric. Res.*, 38: 219-229.

Gopal, B. 1987. *Waterhyacinth, Aquatic Plant*, Elsevier Science Publishers, B. V. Amsterdam, The Netherlands, 471 pp.

Gutiérrez, L. E., F. Arreguín., R. Huerto y P. Saldaña. 1994. Control de malezas acuáticas en Mexico. *Ingeniería Hidráulica en Mexico*, 9 (3): 15-34.

Hanlin, R. T. 1997. *Illustrated Genera of Ascomycetes*. Vol. I. 4th ed. APS Press, St. Paul, Minn. 263 pp.

Harley, K, L, S. 1990. The role of biological control in the management of water hyacinth. *Biocontrol news and Information*. 11(1): 11-22.

Hernández, H. F. y B. M. E. Pérez, 1995. "El vuelo del mosquito: un debate sobre el mosquito", *Avance y Perspectiva*, órgano de difusión del centro de investigación y de estudios avanzados del IPN. 14:5-13.

Hoar, S. K., A. Blair, F.F. Holmes, C.D. Brysen, R.J. Robel, R. Hoover y J.F. Franmieri, Jr. 1986. Agricultural herbicide use and risk of soft tissue sarcoma. *J. Am. Med. Assoc.* 256: 1141-1147.

- Holm, L.G., L.G. Weldon y R. D. Blackburn. 1969. Aquatic Seeds, Science, 166:699.
- Holm, L. G., D. L. Plucknett, J. V. Pancho, y J. P. Herberger. 1977. The World's Worst Weeds: Distribution and Biology. University Press, Honolulu, Hawaii. 601pp.
- Holt J. S. y H. M. Le Baron. 1990. Significance and distribution of herbicide resistance. Weed Tech. 4: 141-149.
- Holt, J. S. 1994. Impact of weed control on weed: new problems and research need. Weed Tech. 8: 400-402.
- Hubber, L. 1992. Modeling leaf wetness in relation to plant disease epidemiology. Annu. Rev. Phytopathol. 30: 553-557.
- Julien, M. H. 1987. Biological control of weeds. A world catalogue of agent and their target weeds. 2nd Edition. Walliingford: CAB International. 150 pp.
- Julien, M. H. 1992. Biological control of weeds. A world catalogue of agents and their targets weed, 3rd Edition, Walliingford: CAB International. 186 pp.
- Julien, M. H., y M. W. Griffiths (eds.). 1998. Biological control of weeds. A World catalogue of agents and their target weeds. 4th edition. CABI Publishing, 223 p.
- Julien, M. H. y Stanley, J. N. 1999. Recent research on biological control for water hyacinth in Australia. In: Hill, M.P., Julien, M.H., and Center, T.D., ed., Proceedings of the 1st IOBC Water hyacinth working group, Harare, November 1998, 52-61.
- Julien, M. H., y Orapa, W. 1999. Successful biological control of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in Papua New Guinea by the weevils *Neochetina bruchi* and *N. eichhorniae* (Coleoptera: Curculionidae). In: N.R., Spencer (ed.), Proceedings of the X International Symposium on Biological Control of Weeds, Montana State University, Bozeman, Montana, USA, p. 1027.
- Julien, M. H. Biological control of water hyacinth with arthropods: Review to 2000. 2000. In: Jullien, M. H., M.P. Hill., T.D. Center y D. Jianqing., ed., Biological and Integrated Control of Water hyacinth, *E. crassipes*. Proceedings of the second meeting of the global working group for the biological and integrated control of water hyacinth, Beijing, China, 9-12 Oct. 2000, 8-20.
- Lareo, L. 1981. Crecimiento de Jacinto de Agua (*E. crassipes* (Mart.) Solms Laubach) en el trópico. Arch. Latinoamer. Nutr., 31:758.
- Le Baron, H. M. 1987. Introduction. Weed Sci. 35: 2-3.
- Limon, L. G. 1984. Mexican agency studies aquatic weeds. Aquaphyte. Ecology 24: 935-944.

Lugo, M. de L., y N. Semidey. 2002. Guía para el reconocimiento de malezas comunes en zonas agrícolas de Puerto Rico. Estación Experimental Agrícola, Recinto Universitario de Mayagüez, Universidad de Puerto Rico. 66 p.

Mansour, F.A., M.A. Zahran, y M.A. Shady. 1980. Microbiological control of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in Egypt. Proc. of the Seventh Ann. Conf. on the Restoration and Creation of wetlands, 16-17 May 198, Tampa, Florida Cole, D. P. (ed.), pp. 195-208

Martínez, M.J. y A.B. Gómez. 2007. Integrated control of *Eichhornia crassipes* by using insects and plant pathogens in Mexico. Crop Protection. Vol. 26: 1. pp.1234-1238.

Martyn, R. D. y T. E. Freeman. 1978. Evaluation of *Acremonium zonatum* as a potential biocontrol agent of waterhyacinth. Plant Disease Reports, 62, 64-68.

Medal, J., y Norambuena, H. 2002. Manual de control biológico de plantas invasoras. Entomology & Nematology Department, University of Florida, 85 pp.

Mercado, R. W. 1997. Alternativas para el control de *Rhizoctonia solani* y *Myrothecium roridum* causantes de canchros y pudrición de la raíz en cafetos de viveros. M.S. Tesis. Departamento de Protección de Cultivos, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez. Mayagüez, P.R. 71 pp.

Millhollon, R.W., D.K. Berner, L.K. Paxson, B.B. Jarvis y G.W. Bean. 2003. *Myrothecium verrucaria* for control of annual morningglories in sugarcane. Weed Technology. Vol 17: 276-283.

Moran, P. J., 2005. Leaf scarring by the weevils *Neochetina eichhorniae* and *N. bruchi* enhances infection by the fungus *Cercospora piaropi* on waterhyacinth, *Eichhornia crassipes*. BioControl. 50 (3): 511-524.

Mullin, B.H., L.W. J. Anderson, J.M. DiTomaso, R.E. Eplee, y K.D. Getsinger. 2000. Invasive plant species. Issue Paper No. 13. Council for Agricultural Science and Technology, Washinton, D.C. February 2000. 18 pp.

Oberholzer, I.G. y H.P. Hill. 2001. How safe is the grasshopper *Cornops aquaticum* for release on water hyacinth in South Africa? Center and Ding Jianquing ACIAR Proceedings 102. 82 pp.

Penfound, W.T. y T.T. Earle. 1948. The biology of the water hyacinth. *Ecological Monographs* 18: 447-472.

Phiri, P.M., R.K. Day, S. Chimatiro, M.P. Hill, M.J.W. Cock, M.G. Hill y E. Nyando. 2001. Progress with biological control of water hyacinth in Malawi. ACIAR Proceedings 102 by M. H. Jullien. 47-52 pp.

Potter, D.A., M.C. Buxton, C.T. Redmond, C.T. Patterson y A.J. Powell. 1990. Toxicity of pesticides to earthworms (Oligochaeta: Lumbricidae) and effects on thatch degradation in Kentucky bluegrass turf. *J. Econ. Entomol.* 83(6): 2362-2369.

Raj, T. R. N. y Ponnappa, K. M. 1970. Blight of water hyacinth caused by *A. eichhorniae* sp. Nov. *Tarans. Br. Mycol. Soc.* 55 (1): 123-130.

Rakvidhyasastra, V. y N. Visarathanonth. 1975. Isolation and identification of fungi pathogenic to waterhyacinth (*Eichhornia crassipes* [Mart.] Solms.). *Kasetsart J.* 9:170-177.

Rodríguez, R. P., L. Sánchez, W. González y O. Bosques. 1996. Patogenicidad de *Myrothecium roridum* y *Rhizoctonia solani* en cafetos en el vivero. *J. Agric. Univ. Puerto Rico.* 80: 143-153.

Roskopf, E.N., R. Charudattan y J.B. Kadir. 1999. Use of plant pathogens in weed control. *In Handbook of Biological Control.* T.W. Fisher, T.S. Bellows, L.E. Caltagirone, D.L. Dahlsten, C. Huffaker y G. Gordh., ed., San Diego, CA., Academic Press, 891-918.

Rotem J., 1994. The genus *Alternaria*; Biology, epidemiology and pathogenicity. APS Press. St. Paul, Minnessota. p 203.

Ryan, G. F. 1970. Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed Sci.* 18: 614-616.

Schmitz, D. C., J. D. Schardt, A.J. Leslie, F.A. Dray, Jr., J.A. Osborne, y B.V. Nelson. 1993. The ecological impact and management history of three invasive alien plant species in Florida, pp. 173-194. *In McKnight. N. (ed.). Biological Pollution. The Control and Impact of Invasive Exotic Species.* Indiana Academy of Science, Indianapolis, Indiana, USA. 194 p.

Schwartz, H. F. y S. K. Mohan. 1995. Compendium of onion and garlic diseases. APS Press, St Paul, MN. 54 pp.

Shabana, Y. M., R. Carudattan, y M. A. Elwakil. 1995. Identification, pathogenicity of *A. eichhorniae* from Egypt as bioherbicide agent for water hyacinth. *Biological Control* 5 (2): 123-135.

Shabana, Y. M., R. Charudattan, Devalerio, J. M. y M.A. Elwakil. 1997. An evaluation of hydrophilic polymers for formulating the bioherbicide agents *Alternaria cassiae* and *A. eichhorniae*. *Weed Technology.* Vol. 11: 212-220.

Shabana, Y. M., M.A. Elwakil, y R. Charudattan. 2001a. Biological Control of Water hyacinth by a Mycoherbicide in Egypt. *Biological and Integrated Control of Waterhyacinth, Eichhornia crassipes.* (ed.) Jullien, M.H., M.P Hill., T.D. Center y D. Jianqing. ACIAR Proceedings 102. 53-56 pp.

Shabana, Y.M., M.A. Elwakil y R. Charudattan. 2001b. Effect of nutrition and physical factors on mycelial growth and production of pigments and nonchromatic UV absorbing compounds of *A. eichhorniae*. J. Phytopathol. 149, 21-27.

Shabana, Y. M. 2005. The use of emulsions for improving the efficacy of *Alternaria eichhorniae* as a mycoherbicide for waterhyacinth (*Eichhornia crassipes*). Biological Control 32 (2005) 78-89.

Simmons, E.G. 1992. *Alternaria* taxonomy: current status view-point, challenge. In *Alternaria: biology, plant disease and metabolites*. (J. Chelkowski and A. Visconti, eds.); Elsevier, Amsterdam. pp.1-35.

Singh, R. y J. Chohan. 1984. Some fruits rot of watermelon in North India. Indian Journal of Mycology an Plant Pathology. 14: 279-280.

Singh, S.P. y F. Muller. 1979. Efficacy, uptake and distribution of different herbicides in the water hyacinth. Weed Resource, 19:1.

Smith, R.J. Jr. 1986. Biological control of northern jointvetch (*Aeschynomene virginica*) in rice (*Oryza sativa*) and soybeans (*Glycine max*) - a researcher's view. Weed Sci. 34 (1): 17-23.

Talley, S.M., P.D. Coley y T.A. Kursar. 2002. The effects of weather on fungal abundance and richness among 25 communities in the Intermountain West. BMC Ecology. 2(7): 1472-6785.

TeBeest, D. O. 1982. Survival of *C. gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene* in rice irrigation water and soil. Plant Dis. 66: 469-472.

TeBeest, D. O. 1991. Microbial Control of Weeds. Chapman and Hall, New York. In McKnight, B. N. (ed.). Biological Pollution. The Control and Impact of Invasive Exotic Species. Indiana Academy of Science, Indianapolis, Indiana, USA. 284 p.

Walker, A. 2000. An evaluation of fungal isolates for biological control of water hyacinth, *E. crassipes*. Journal of Undergraduated Research, University of Florida, May, 2000, 6 pp.

Walker, H. L 1980. *Alternaria macrospora* as a potential biocontrol agent for spurred anoda: Production of spores for field studies. U.S. Dep. Agric. Sci. Ed. Admin. Adv. Agric. South. Ser., 12. 5 pp.

Walker, H. L y A. M. Tilley. 1997. Evaluation of an isolate of *Myrothecium verrucaria* from sicklepod (*Senna obtusifolia*) as a potential mycoherbicide agent. Biological Control, 10: 104-112.

Ueckermann, C. y M.P. Hill. 2000. Impact of herbicides used in water hyacinth control on the natural enemies released against the weed for biological control. Report to the Water Research Commission No. 78. 151pp.

Zimdahl, R. L. 1980. Weed Crop Competition, A Review. International Plant Protection Center, Oregon State University. Corvalliis, Or. 9-10.

Zimdahl, R. L. y S. K. Clark. 1982. Degradation of three acetanilide herbicides in soil. Weed Sci. 30: 110-118.