UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Identificación de insectos asociados a *Conyza bonariensis* L. en el departamento de Antioquia

Carlos Enrique Velásquez Arroyo

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Medellín, Colombia

2021

Identificación de insectos asociados a *Conyza bonariensis* L. en el departamento de Antioquia

Carlos Enrique Velásquez Arroyo

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Agrarias

Directora:

Sandra Inés Uribe Soto M.Sc, PhD.

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Medellín, Colombia

2021

Dedicación.

Este trabajo se lo dedico a mis padres, Félix Orlando Velásquez y Esther Cecilia Arroyo, quienes son el motor de mi vida y el ejemplo de perseverancia y dedicación, quienes me enseñaron el valor de la vida por encima del dinero y las cosas materiales. Por ellos, quienes siempre me han regalado felicidad.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Carlos E. Velásquez A.

Carlos Enrique Velásquez Arroyo

Fecha 4/02/2023

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a mi directora de tesis Sandra Inés Uribe Soto por darme la oportunidad de trabajar con ella, por compartir su conocimiento y por todo su apoyo en el desarrollo de este trabajo de grado. De igual manera a las personas que hacen parte del grupo de investigación en sistemática molecular, a mis amigos y familiares quienes me apoyaron siempre en todo momento, también a la Corporación Colombiana de investigación Agropecuaria, C.I. La Selva por concederme el tiempo y los espacios para poder culminar con esta etapa de mi formación académica, a la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, al programa de Maestría en Ciencias Agrarias, al investigador Raghu Santhyamurthy por su apoyo y valiosos aportes y al CSIRO de Australia (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization) por la financiación de este proyecto.

Tabla de contenido

Resumen **10**

Abstract **12**

Introducción general **13**

Objetivos **18**

Metodología general **19**

1. CAPÍTULO 1. Reconocimiento e identificación de *Conyza bonariensis* y los insectos fitófagos asociados **20**

1.1 Introducción 21

1.2 Materiales y métodos 24

1.2.1 Área de estudio 24

1.2.2 Recolecta de plantas, herborización e identificación taxonómica 24

1.2.3 Colecta y procesamiento de insectos fitófagos 25

1.2.4 Descripción del daño, Identificación taxonómica y listado de especies asociadas 26

1.2.5 Asignación del código de barras de ADN 26

1.3 Resultados 29

1.3.1 Sitios muestreados 29

1.3.2 Muestras botánicas y reconocimiento de *C. bonariensis* 30

1.3.3 Descripción del daño, Identificación taxonómica y listado de especies asociadas 33

1.5 Discusión 54

2. CAPÍTULO 2. Observaciones biológicas de *Caloreas cydrota* **57**

2.1 Introducción 58

2.2 Materiales y Métodos 60

2.3 Resultados 62

2.4 Discusión 70

2.5 Conclusiones 72

2.6 Bibliografía 74

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1. Esquema general de la metodología utilizada. 19

Figura 1-2. a) Planta de *C. bonariensis*: b) Inflorescencia de *C. bonariensis*. 31

Figura 1-3. NJ de las dos regiones amplificadas ITS1 y ITS4 que confirman la identidad de las plantas estudiadas como *C. bonariensis*. En rojo se señala *C. bonariensis* de Colombia secuencias consenso de los productos amplificados en el presente estudio. 32

Figura 1-4. a) Hembra de *T. bonariensis*; d) Ala con patrón estrellado y c) Presencia de setas fronto orbitales. 35

Figura 1-5. a) Formación característica de agallas; b) Formación de brotes laterales. 37

Figura 1-6. a) Larvas de *T. bonariensis*; b) Larvas y pupa de *T. bonariensis* s y c) pupas de *T. bonariensis*.....37

Figura 1-7. a y b) Hembras de *C. bonariensis* 38

Figura 1-8. Adultos de *P. vitiscuttis*.....39

Figura 1-9. Daño característico de *P. vitiscuttis* sobre las hojas de *C. bonariensis*.....40

Figura 1-10. a) Adultos de *E. squamigera* yb) *B. pictipennis*.....41

Figura 1-11. a) Evidencia de adultos de *E. squamigera* y b) *B. pictipennis* en *C. bonariensis*….. 42

Figura 1-12. Adultos *C. cydrota*. 43

Figura 1-13. Daño de *C. cydrota* en plantas de *C. bonariensis*.....44

Figura 1.14. Larvas de *C. cydrota* alimentándose de tejido foliar de *C. bonariensis* 45

Figura 1-15. a) Adulto de *Phyllonorycter* sp; b) daño causado por la larva y c) diferentes grados de daño en diferentes hojas.....46

Figura 1-16. a) Adulto *Lioptilodes* especie nueva; b) Genitalia. 47

Figura 1-17. a) Orificio de entrada de la larva; b) Formación de brotes laterales y c) tallo barrenado.....48

Figura 1-18. a) Hembra adulta de *L. prometopa* y b) macho.....48

Figura 1-19. c) Genitalia hembra de *L. prometopa* y d) Genitalia macho de *L. prometopa*…… 49

Figura 1-20. a) Macho de *L. albistrolatus* y b) Genitalia con “phallus” removido y c) “phallus”. 50

Figura 1-21. Alineamientos y análisis NJ..... 52

Figura 2.1. Ápices de los tallos dispuestos en recipientes. 60

Figura 2.2. Cajas usadas para la cría y observaciones biológicas..... 61

Figura 2.3. a) *C. bonariensis* en campo; b) Plantas en macetas y c) plantas bajo observación. 62

Figura 2.4. Evidencia de los primeros síntomas en las hojas. 63

Figura 2.5. a) Observación de huevo de *C. cydrota* bajo estereoscopio; b) recipiente con hojas que presentaban daño por *C. cydrot*a; d) observación de larva de *C. cydrota* bajo estereoscopio y d) Adulto de *C. cydrota* emergido. 63

Figura 2.6. Evidencia adultos posados en el ápice de la planta. 65

Figura 2.7. Evidencia de huevo de *C. cydrota* en hojas..... 65

Figura 2.8. Larva neonata observada bajo estereoscopio con un aumento de 40X..... 66

Figura 2.9. Larvas de *C. cydrota*. a) Larva de 6 días color amarillo (Observación bajo estereoscopio a 16X) b) Larva de 16 días de color amarillo verdoso (Obs.20X). 67

Figura 2.10. Formación de pupa vista bajo estereoscopio a 20X. 67

Figura 2.11. Pupas. a). Prepupa recién formada en saco de seda; b). Pupa de 6 días en saco de seda y c). Pupa de 6 días. 68

Figura 2.12. Adultos de *C. cydrota* obtenidos bajo condiciones de laboratorio. 68

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1. Primers usados *C. bonariensis*. 25

Tabla 1-2. Localidades de muestreo de *C. bonariensis* en Antioquia, Colombia. 29

Tabla 1-3. Tipos de daños observados asociados con los insectos 33

Tabla 1-4. Insectos asociados, estados biológicos y relación con el daño 34

Tabla 1-5. Identidad de las especies procesadas para la obtención de códigos de barrasde ADN y localidad donde fueron encontradas. M1 y M2 son los morfotipos con variabilidad en coloración observados en la mosca del género *Trupanea* (Tephritidae) 52

Tabla 2.1. Duración de los estados biológicos bajo condiciones de laboratorio. 64

Tabla 2.2. Días transcurridos entre una posible oviposición y la aparición del síntoma en la planta..... 65

Resumen

Identificación de insectos asociados a *Conyza bonariensis* L. en el departamento de Antioquia

En el presente estudio se realizó la identificación taxonómica de insectos fitófagos asociados a la planta *Conyza bonariensis,* se considera esta información como línea base para futuros trabajos de control biológico clásico con el uso de insectos. El trabajo permitió reconocer la importancia de la planta como arvense y la necesidad de estrategias adecuadas de manejo dada su capacidad invasiva y afectación de cultivos tanto en América como en países donde ha sido introducida y se considera un problema serio de invasión con necesidad de atención prioritaria. Dada la coexistencia de varias especies de *Conyza* en los agroecosistemas y la dificultad de separarlas a simple vista, se revisó las características morfológicas distintivas y se validó la utilidad de la información molecular de las regiones ITs1, ITs4 para conformar la identidad de la especie, previa revisión de los caracteres morfológicos y particularidades considerados de importancia desde el análisis crítico de la información disponible. Se describieron los principales tipos de daños encontrados en la planta en campo y los insectos asociados encontrándose 4 de mayor frecuencia e importancia: agallas, barrenado de tallos, minas o galerías y enrollamiento en hojas. Los daños descritos en detalle fueron causados por 9 insectos de los cuales 8 fueron identificados hasta la categoría de especies y uno hasta la categoría de género. El orden Lepidoptera y en general las micropolillas fueron las más ampliamente observadas y estudiadas y en particular de las familias Gracilliaridae, Pterophorodae y Choreutidae. También se encontraron insectos en el orden Diptera, familia Tephritidae y en el orden Hemiptera, familias Miridae y Membracidae. El uso de regiones moleculares como códigos de barras de ADN en combinación con morfología, permitió diferenciar especies morfológicamente muy similares como las 3 del género *Liopilodes* de la familia Pterophoridae. De la misma forma permitió evidenciar que variaciones morfológicas en coloración en *Trupanea bonariensis* no representan variabilidad genética o presencia de más de una especie. Considerando la frecuencia de presencia y el tipo de daño, se realizaron observaciones biológicas bajo condiciones controladas de laboratorio sobre las características, variación y duración de los estados inmaduros de la especie *Caloreas cydrota*

Palabras clave: Insectos fitófagos, Control biológico, Regiones moleculares, ADN, código de barras.

Abstract

Identification of insects associated with *Conyza bonariensis* L. in the department of Antioquia

In the current study, the taxonomic identification of phytophagous insects associated with the *Conyza bonariensis* plant was carried out, this information is considered a baseline for future works of classical biological control with the use of insects. The work made it possible to recognize the importance of the plant as a weed and the need for adequate management strategies given its invasive capacity and affectation of crops both in America and in countries where it has been introduced and is considered a serious invasion problem that requires priority attention. Given the coexistence of several Conyza species in agroecosystems and the difficulty of separating them with the naked eye, the distinctive morphological characteristics were reviewed and the usefulness of the molecular information of the ITs1, ITs4 regions was validated to establish the identity of the species, before the review of the morphological characters and particularities considered important from the critical analysis of the available information. The main types of damage found in the plant in the field and the associated insects were described, finding the 4 most frequent and important: galls, stem boring, mines or galleries, and leaf rolling. The damages described in detail were caused by 9 insects, 8 of which were identified to the species category and one to the genus category. The Lepidoptera order and in general the micro moths were the most widely observed and studied, in particular from the Gracilliaridae, Pterophorodae, and Choreutidae families. Insects were also found in the order Diptera, family Tephritidae, and in the order Hemiptera, families Miridae and Membracidae. The use of molecular regions such as DNA barcodes in combination with morphology, allowed the differentiation of morphologically very similar species such as the 3 of the genus *Liopilodes* of the Pterophoridae family. In the same way, it allowed us to show that morphological variations in coloration in *Trupanea bonariensis* do not represent genetic variability or the presence of more than one species. Considering the frequency of presence and the type of damage, biological observations were made under controlled laboratory conditions on the characteristics, variation, and duration of the immature stages of the species *Caloreas cydrota.*

Keywords: Phytophagous insects, Biological control, Molecular regions, DNA, barcode.

Introducción general

Desde que el ser humano comenzó a cultivar sus propios alimentos y hasta la fecha, ha existido una guerra continua contra las plantas arvenses, empleando diferentes tipos de métodos para su manejo y control, algunos preventivos y otros con el propósito de erradicarlas por completo, de manera que este tipo de plantas han sido siempre un problema persistente para el agricultor y un enemigo que hay que vencer (FAO, 2004).

El término “arvense” apareció como una palabra necesaria, para sustituir la expresión “Maleza” (Leiva y Lorens, 2008), la cual ha conducido a los agricultores a la destrucción permanente de la flora herbácea y arbustiva en forma indiscriminada, sin medir beneficios y consecuencias (Blanco y Leyba, 2007). La palabra arvense se asigna a aquellas plantas que por su plasticidad ecológica tienen la capacidad de invadir nuevos hábitats y persistir en ellos a pesar de las acciones antrópicas (Vera Díaz et al., 2020). En el sentido agronómico, representan plantas sin valor económico, no objeto del cultivo, y que afectan la producción y el desarrollo normal del mismo por la competencia de agua, luz, nutrientes y espacio físico, incluso pueden producir sustancias nocivas y ser hospederas de plagas y enfermedades (Blanco y Leyva, 2007).

Por consiguiente, la expresión arvense nace con el propósito de orientar al agricultor hacia su manejo racional, o sea, al conocimiento de las arvenses, ya que existen arvenses buenas y malas, en este sentido, el valor de una arvense está determinado incuestionablemente por la percepción de su observador; es decir, una arvense es toda planta que se encuentra en un lugar inapropiado, que por sí misma puede ser útil en ciertas condiciones e indeseables en otros momentos (Blanco y Leyva, 2007).

Dentro de los principales métodos para el manejo de este tipo de plantas en campos agrícolas está el control mecánico, físico y químico (Schwarzländer et al. 2018), siendo este último el método más utilizado. Uno de los herbicidas de mayor uso debido a su eficacia en el control de arvenses, es el glifosato, el cual es un herbicida sintético universal, post-emergente, no selectivo y de amplio espectro, cuyas formulaciones comerciales se denominan herbicidas a base de glifosato (GBH) (Van Bruggen et al., 2018). Sin embargo, en el año 2015 la Organización Mundial de la Salud (OMS) reclasificó al glifosato como probablemente cancerígeno para los seres humanos, y

por sus efectos sobre la composición microbiana y sus posibles efectos indirectos sobre la salud de las plantas y los animales. (Van Bruggen et al., 2018).

Estudios realizados por Agostini y colaboradores (2020) hallaron que estos GBH y sus metabolitos se pueden encontrar en el suelo, el aire, el agua, así como en las aguas subterráneas y en los productos alimenticios, y que producen un efecto toxicológico en células humanas y consecuencias deletéreas asociadas a su exposición. Otros investigadores, Nagy y colaboradores (2019) afirman que los GBH indujeron una muerte celular y un aumento del daño del ADN de células humanas.

Por otro lado, el uso intensivo de herbicidas ha ocasionado que ciertas arvenses generen un tipo de resistencia, convirtiéndose en una preocupación mundial. Actualmente se tiene reporte de un total de 527 casos notificados en 71 países, afectando a 91 cultivos, 509 especies de arvenses (267 dicotiledóneas y 242 monocotiledóneas) 26 modos de acción y 163 herbicidas diferentes (Heap, 2021).

Conyza bonariensis, es una de las especies de arvenses más problemáticas a nivel mundial en la producción de cultivos de gran tamaño (Bajwa et al. 2016) debido a su alta capacidad invasiva, alto potencial de dispersión, alta fecundidad, emergencia escalonada y por su resistencia a herbicidas (Wu et al. 2007). Según alguna de las investigaciones, se ha encontrado que esta arvense ha desarrollado resistencia a nueve ingredientes activos; glifosato, paraquat, diquat, atrazina, simazina, clorsulfuron, piritiobac-sodio, sulfumeturon-metil e imazapyr, reportados en 13 países (Matzrafi et al., 2015; Heap, 2021). En Colombia se reporta resistencia a glifosato en biotipos de *Erigeron bonariensis* provenientes de cafetales (Menza y Salazar, 2006).

Esta arvense ruda y de mucho éxito invasivo, se puede encontrar comúnmente en terrenos en barbecho, en las orillas de las carreteras, vías férreas, canales de riego, así como huertos, viñedos, bosques y tierras cultivables (Wu et al. 2007). En Antioquia, Colombia, se ha visto además en cultivos de frijol, maíz, papa, y en bancos de conservación *ex situ* de especies de importancia económica como achira, mora, mortiño, arracacha, Yacón, y algunas especies forestales (observaciones del autor).

Hay pocos datos sobre el impacto de *C. bonariensis* en la agricultura de monocultivos, autores como Wu (2007) sostienen que provoca una disminución significativa en el rendimiento del sorgo hasta en un 30% en zonas secas, en comparación con un tratamiento libre de arvenses, esto debido a que compite por la humedad almacenada del suelo. En otro estudio realizado en el norte de Australia, esta arvense provocó

pérdidas en cultivos de sorgo hasta en un 65%, y un 98% en el norte de Nueva Gales del Sur y sur de Queensland, llegando a causar pérdidas de ingresos hasta por $ 43 millones de dólares (Wu et al., 2010).

En evaluaciones de impacto realizadas para la especie *C. canadienses,* en Canadá, se encontró que a densidades de 150 plantas por m^2 la producción del cultivo de soja puede llegar a reducirse en un 83% (Bruce y Kells, 1990) y un 64% en cultivos de uva (Holm et al., 1997). Estudios realizados en cultivos de café en Colombia, encontraron que el manejo inadecuado de *C. bonariensis* en las calles del cultivo puede llegar a causar una reducción del rendimiento hasta en un 65% (Menza y Salazar, 2006).

Debido a que *C. bonariensis* es una especie no endémica en muchos países, es decir, es una especie no nativa que forma poblaciones autosuficientes después de su introducción en un área fuera de su rango de distribución nativo (Schwarzländer et al. 2018) y que no se ha documentado la presencia de enemigos naturales específicos, es decir insectos que en su lugar de origen son plagas para esta planta y que son propios de los ecosistemas originarios, los cuales regulen su población. Entonces esta arvense se convierta en un gran problema, tal como ocurre hoy en día en Australia; en donde *C. bonariensis*, pudo haber sido introducida desde Europa, África y América, siendo una de las especies más invasivas de este país afectando bosques y amenazando su agricultura y fauna nativa (CSIRO, 2018).

Por consiguiente, y debido a que *C. bonariensis* es nativa de América del Sur (Qureshi y Raana, 2014), se considera el control biológico clásico (CBC) como un método alternativo para su manejo mediante insectos fitófagos que atacan la planta y le hacen daños, bien causándole la muerte o menguándola a niveles donde sus funciones fisiológicas se ven afectadas a tal grado donde su reproducción se hace inviable, descendiendo de este modo su población. En el CBC los enemigos naturales co-evolucionados con la planta y que son específicos para dicho hospedador (son agentes de control biológico) del rango nativo de la maleza, se reúnen con la planta invasora en la categoría introducida. En este contexto los insectos fitófagos y que afectan considerablemente la planta, en este caso *C. bonariensis*, se consideran agentes potenciales para el CBC (Schwarzländer et al., 2018).

El presente trabajo se realiza en el marco de una alianza con el instituto CSIRO (por su sigla en inglés (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization) y la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, que busca reconocer en un

programa de trabajo conjunto con varios países de sur américa, insectos fitófagos y hongos fitoparásitos asociados a la planta *C. bonariensis* y proveer información de base para posibles actividades de control biológico de la planta.

Contextualización

En la actualidad se considera prioritario desde el CSIRO continuar con el trabajo de reconocimiento de insectos fitófagos asociados a *C. bonariensis*, los cuales puedan en un futuro evaluarse como posibles candidatos para programas de control biológico.

En Australia, *Conyza* spp., es considerada la tercera arvense más importante en barbechos la cual infesta alrededor de 2.793.252 hectáreas, generando pérdidas a los agricultores por más de 43,2 millones de dólares. Por su parte, *C. bonariensis* es una maleza importante en los cultivos de cereales, donde ocupó el séptimo lugar en términos de área infestada, cubriendo 597,531 hectáreas y generando pérdidas por 1,3 millones de dólares (Llewellyn et al., 2016).

En total se reconocen ocho especies de *Conyza* que se encuentran naturalizadas en Australia: *Conyza aegyptiaca* (L.) Aiton, *C. bilbaoana* J. Remy, *C. bonariensis*, *C. canadensis* (L.) Cronquist var. *canadensis*, *C. leucantha* (D. Don) Ludlow y P.H. Cuervo, *C. parva* (sin. *C. canadensis* var. *Pussila* (Nutt.) Cronquist), *C. primulifolia* (Lam.) Cuatrec. & Lourteig (sin. *C. chilensis* Spreng) y *C. sumatriensis* (sin. *C. albida* Willd. Ex Spreng.). Entre estas especies*, C. bonariensis* y *C. sumatrensis* son las especies más comunes, siendo *C. bonariensis* la más extendida (Wu y Zhu, 2014). En general se conoce que la identificación taxonómica de estas especies puede ser compleja y estas dificultades pueden afectar la selección y rendimiento de las estrategias y agentes de control (Pruuski y Sancho, 2006, Pike, 2020).

La falta de parientes cercanos de la arvense en la flora nativa australiana disminuye la probabilidad de poder encontrar en ese país agentes que sean adecuadamente específicos del huésped; sin embargo, se conocen patógenos e insectos relativamente específicos que afectan plantas del género *Conyza* en América del Sur, por ejemplo la roya *Aecidium* conyzae-colombiensis (Pardo-Cardona, 2000) y la mosca de la familia Tephritidae *Trupanea bonariensis* para *C. albida* (Brèthes, McKay y Gandolfo, 2001); sin embargo, no se han realizado estudios sistemáticos sobre la especie *C. bonariensis* en busca de patógenos y se conoce poco sobre insectos que

se alimenten de las plantas causando daños o afectándolas de forma que puedan considerarse potenciales agentes de control biológico.

El CSIRO “Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization” es una agencia independiente del gobierno federal responsable de la investigación científica. Actualmente se encuentra adelantando investigación que permita realizar actividades de biocontrol para el manejo de malezas y manejo sostenible de arvenses como estas, que afectan sus bosques y amenazan su agricultura y fauna nativa (CSIRO, 2021).

Con base en los avances reportados por el CSIRO sobre el estudio de insectos en especies de *Conyza* en Argentina, Paraguay, Brasil, Colombia y el sur de EE. UU, entre noviembre de 2017 y febrero de 2020, se han identificado insectos herbívoros de unas 14 familias: Agromyzidae; Cecidomyiidae; Cerambycidae; Curculionidae; Lixidae; Membracidae; Miridae; Mordellidae; Pseudococcidae; Pterophoridae; Tephritidae; Tingidae; Tortricidae y Coccidae (CSIRO, 2021).

Objetivos

General

Realizar un inventario de insectos fitófagos asociados a *C. bonariensis* en el departamento de Antioquia, detallando aspectos relacionados con daño y observaciones biológicas

Específicos

Identificar los insectos fitófagos asociados a *C. bonariensis* por métodos morfológicos y moleculares.

Precisar el daño causado en la planta para al menos una especie con uso potencial como agente de biocontrol de esta arvense.

Realizar observaciones biológicas de al menos una especie bajo condiciones de laboratorio

Metodología general

Para cumplir con los objetivos del proyecto se seleccionaron sitios de muestreo en el departamento de Antioquia con previos reportes de la planta y que de acuerdo con las características de restricción de la pandemia y facilidad de acceso pudieran ser explorados para identificar ejemplares de la planta *C. bonariensis* por métodos morfológicos y moleculares, evaluar la presencia y fitofagía por insectos, realizar la descripción del daño, colectar e identificar taxonómicamente por métodos morfológicos y moleculares los insectos encontrados y realizar observaciones biológicas y descripción de observaciones biológicas bajo condiciones de laboratorio para al menos una especie de interés o con uso potencial en programas de control biológico de la planta (Figura 1-1).

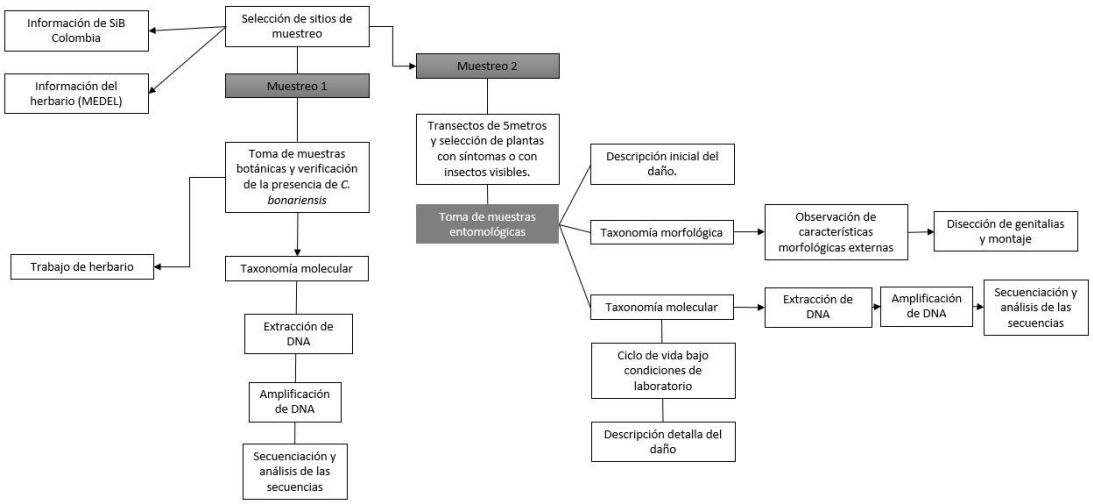

Figura 1-1. Esquema general de la metodología utilizada.

1. CAPÍTULO 1. Reconocimiento e identificación de *Conyza bonariensis* y los insectos fitófagos asociados

1.1 Introducción

C. bonariensis pertenece al género *Conyza*, familia Asteraceae, tribu Astereae, subtribu Conyzinae, siendo una de las familias de plantas con flor más grande en el mundo, incluye aproximadamente 1.600 géneros y 23.000 especies (Gao et al., 2010; Flann, 2016), son plantas anuales o bienales (Wu, 2007). El género comprende alrededor de 150 especies y se cree derivó del género *Erigeron* (Thebaud y Abbott, 1995).

La Taxonomía y la Sistemática tienen gran importancia en los procesos de control biológico de cualquier especie considerada maleza o plaga. El objetivo principal de la sistemática es estudiar la diversidad biológica y sus interrelaciones tanto filogenéticas como biológicas, en tanto que la taxonomía estudia la teoría y práctica de describir, nombrar, ordenar, confirmar determinaciones tempranas, suplir informaciones biológicas referentes a su distribución, rasgos biológicos, preferencia de huéspedes, así como la verificación de especímenes de referencia y proporcionar clasificaciones y claves, entre otras (Gonzales-Hernández y López arroyo, 2007).

Para el control biológico los estudios de sistemática proporcionan nombres de especies precisas, claves y manuales para identificación de especies de insectos plaga o malezas y sus enemigos naturales, así como datos concernientes al huésped, plantas hospederas y preferencia de microhábitats. También proporcionan datos acerca de razas o biotipos, distribuciones geográficas y relaciones filogenéticas con otras especies o grupos (Gonzales-Hernández y López arroyo, 2007).

La ausencia de conocimiento adecuado en sistemática conlleva a inevitables fracasos de programas de control biológico (DeBach y Rosen 1991) por lo cual la identificación de la especie que se considera plaga, maleza u o especie objetivo, tiene importancia crucial en el control biológico. Su identificación errónea ocasiona grandes pérdidas de tiempos de estudio, dinero y esfuerzos. Además, los enemigos naturales estudiados e introducidos fallan al encontrarse con la especie equivocada por lo cual no se establecen en el nuevo hábitat (González-Hernández y López Arroyo, 2007).

La identificación correcta del enemigo natural es tan importante y esencial como la identificación de la especie objetivo. En algunas ocasiones puede llegar a suceder que el enemigo natural no es identificado como una especie diferente, es decir, se confunde un enemigo natural exótico con uno que ya está presente en el nuevo

hábitat, ocasionando retrasos en su utilización en proyectos de control biológico. (González-Hernández y López-Arroyo, 2007).

Asimismo, la determinación del hábitat nativo de la especie objetivo es de suma importancia, puesto que permite reconocer a los enemigos naturales co-evolucionados y específicos del hospedador, permitiendo la selección de enemigos naturales eficientes como agentes de biocontrol. La identificación errónea de la fuente de origen de la especie objetivo puede dirigir inadecuadamente la búsqueda de enemigos naturales (González-Hernández y López Arroyo, 2007).

En este sentido, la identificación correcta de especies es un paso fundamental en el desarrollo de estrategias efectivas para el control biológico, sin embargo, requiere de experiencia taxonómica y depende en gran medida de la disponibilidad de material adecuado (Alpen et al., 2014). Por esto se debe garantizar el acceso de los taxónomos al material necesario para sus estudios de caracterización e identificación de la o las especies de interés, como primer paso para ponerla a disposición para su uso. Debido a que la identificación es tan importante, esta debe ser realizada por los taxónomos más competentes para cada grupo y generalmente se complementa con estudios moleculares u otras herramientas disponibles (Cock et al., 2009).

Para el caso de *C. bonariensis* que es la especie objetivo de este estudio, aunque se dispone de claves taxonómicas para su identificación, es muy fácil confundirla con otras especies de *Conyza* como *C. canadensis* y *C. sumatrensis*. Estas claves, definen características que pueden usarse para diferenciar a las tres especies de *Conyza*. Por ejemplo, en C. *canadensis,* las hojas son de color verde amarillento y glabras, en tanto que en *C. bonariensis* y *C. sumatrensis*, son de color verde grisáceo y muy peludas, de igual manera, las especies varían en altura y hábito de ramificado, en *C. canadensis* se ramifica desde la mitad del tallo principal, *C. bonariensis* tiene ramas que son más altas que el tallo principal y *C. sumatrensis* tiene ramificaciones hacia la parte superior del tallo principal (Prusky y Sancho, 2006). A pesar de esto, en América del Sur, la identificación no es tan sencilla entre las tres especies de *Conyza*, esto debido a la variabilidad morfológica dentro de las especies, la ocurrencia de variedades dentro de algunas especies y la hibridación entre especies (Thébaud y Abbott, 1995).

Por lo anterior, el inventario de insectos asociados a *C. bonariensis,* así como la caracterización de su daño, son un paso fundamental hacia el potencial control

biológico de la especie usando insectos. En este contexto los datos moleculares pueden ser una gran ayuda para las personas que trabajan en control biológico, en aspectos tan diversos como resolver problemas de sistemática inadecuada de enemigos naturales, arvenses, insectos plagas, evaluaciones de resistencia a insecticidas en arvenses, estudios de dispersión de plagas, además de documentar la diversidad genética, entre otros (Álvarez, Menalled y Hoy, 2005).

1.2 Materiales y métodos

1.2.1 Área de estudio

La presente investigación se realizó en el departamento de Antioquia, localizado al noroeste del país y el cual cuenta con 125 municipios, que se encuentran agrupados en nueve subregiones: Valle de Aburrá, Bajo Cauca, Norte, Noreste, Suroeste, Occidente, Oriente, Urabá y Magdalena Medio. Ocupa un territorio de 63.612 km² y limita al norte con el mar Caribe y con el departamento de Córdoba; al occidente con el departamento del Chocó; al oriente con los departamentos de Bolívar, Santander y Boyacá; y al sur con los departamentos de Caldas y Risaralda.

Esta investigación se realizó desde enero de 2019 hasta noviembre de 2021. Para la elección de los sitios de muestreo, debido a la condición de pandemia por la Covid-19 y las restricciones de movilidad que se generaron como consecuencia de la misma, solo se seleccionaron tres subregiones cercanas, de fácil acceso y contrastantes en términos de zonas de vida, la cuales fueron identificadas previamente con alta presencia de *C. bonariensis*. En total se encontraron muestras en 19 sitios en 2 municipios y un corregimiento: Oriente (Rionegro), cuya zona de vida corresponde a Bosque húmedo Montano Bajo (bh-MB); Occidente (Santa Fe de Antioquia) con zona de vida Bosque Seco Tropical (bs-T) y el corregimiento de San Cristóbal sobre la antigua vía al mar con zona de vida bh-MB (Espinal, 1985); en donde se realizaron observaciones de campo, reconocimiento y descripción de daño, recolección de insectos fitófagos y toma de muestras botánicas (Tabla 1).

1.2.2 Recolecta de plantas, herborización e identificación taxonómica

Para cada sitio muestreado se realizó recolecta de muestras botánicas en trayectos de 5 metros durante 4 horas en la mañana (8am a 12pm) y 4 horas en la tarde (1 pm a 4pm) por 3 días y una vez al mes durante 8 meses en cada localidad (3 municipios), las cuales fueron prensadas y almacenadas en bolsas plásticas de acuerdo con la metodología de Marín (2008), posteriormente se llevaron a las instalaciones del Herbario Gabriel Gutiérrez Villegas “MEDEL”, adscrito a la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín para su identificación taxonómica, esta se realizó usando las claves taxonómicas disponibles mediante morfología y también mediante metodología molecular.

Brevemente la metodología para la verificación de la identidad por datos moleculares fue: el DNA fue extraído de pequeños fragmentos de hojas (5 mm) usando el método de Collins et al., (1987, modificado por Cadavid et al., 2013) y se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa 1% v/v en muestras de los tres municipios; posteriormente se realizaron amplificaciones de dos regiones nucleares para la identificación de plantas (Tabla 1). Luego de verificar la amplificación de los fragmentos de ADN objetivo se procedió a una purificación de los productos de PCR y finalmente a la secuenciación por el método de Sanger a través de un proveedor externo con un secuenciador automático ABI 3730xl (Applied Biosystems™). Las secuencias obtenidas de las muestras tomadas del campo fueron comparadas con las secuencias disponibles en las bases de datos de GenBank y estudios moleculares sobre la planta realizados autores por Wang et al., (2018), en los cuales se reporta la información disponible para *C. bonariensis* y otras especies similares para estas regiones genómicas.

Tabla 1-1. Primers usados *C. bonariensis.*

NOMBRE	REGIÓN		DIRECCIÓN 5'-3'	REFERENCIA	PLANTA
ITS1 (FW) White	ITS1, 5.8S, ITS2	F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al. 1990	*C. bonariensis*
ITS4 (Rv) White	ITS1, 5.8S, ITS2	R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White 1990	*C. bonariensis*

1.2.3 Colecta y procesamiento de insectos fitófagos

Una vez verificada la presencia de la planta en los sitios seleccionados, se realizaron 2 recorridos por día, iniciando observaciones desde las 06:00 horas hasta las 17:00 horas. Se evaluó la presencia de daño en las plantas y si este se relacionaba con insectos. El tipo de daño se precisó y se colectaron los insectos presentes registrando datos de hora y fecha de observación, georreferenciación, registro fotográfico, y se revisaron caracteres diagnósticos para la identificación taxonómica a nivel de familia y género en campo, así mismo se registró la actividad de alimentación y la parte de la planta afectada.

Los insectos encontrados en estados inmaduros, por ejemplo, etapas larvaria y pupal, fueron recolectados con la planta para evitar cualquier alteración en su desarrollo,

posteriormente fueron llevados al laboratorio para realizar seguimiento a su crecimiento y obtención de adultos.

1.2.4 Descripción del daño, Identificación taxonómica y listado de especies asociadas

La descripción del daño en las plantas fue realizada en campo tomando nota y registro fotográfico de aspectos clave. También se realizaron observaciones bajo condiciones de laboratorio que permitieron realizar descripciones más detalladas y describirlas, para lo cual plantas infectadas se removieron e instalaron bajo condiciones controladas.

La identificación taxonómica de los insectos se realizó con base en caracteres morfológicos mediante el uso de claves dicotómicas para las diferentes familias y géneros, con el apoyo del personal técnico especializado del Museo Entomológico Francisco Luis Gallego (MEFLG) y el Insectario de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

La verificación de las especies contó con el apoyo de especialistas externos en cada grupo. De manera complementaria, para aquellos en los que había dudas sobre la identificación, falta de claves diagnósticas, y que se consideraron morfológicamente muy similares, se realizó extracción de ADN a partir de pequeños fragmentos de patas, las cuales fueron conservadas a -20°C hasta su procesamiento final.

Los especímenes fueron montados en alfiler siguiendo las normas y estándares del MEFLG para crear una colección de referencia y los resultados fueron presentados en el formato Darwin core y reportados a la base de datos de diversidad biológica del país SiB Colombia, tal y como lo indica la legislación vigente y el permiso marco del MEFLG bajo el cual se realizaron las colectas.

1.2.5 Asignación del código de barras de ADN

Los códigos de barras de ADN (fragmento del gen mitocondrial *coxI* comúnmente usados para la identificación de insectos) Herbert et al., 2003 se asignaron como una herramienta para evaluar su efectividad y separar por genotipos (haplotipos mitocondriales de este gen *coxI*) individuos que morfológicamente eran difíciles de asignar a una especie, o aquellos que se asignarían en primera estancia a una sola especie, pero para los que después de realizada la disección de los genitalia o posteriores observaciones detalladas, se encontraron diferencias que podrían sugerir

la existencia de más de una especie. También para relacionar morfotipos con genotipos y confirmar la diferenciación entre especies. Usando los análisis de divergencia genética en relación con los estándares de la iniciativa códigos de barra de ADN para insectos y considerando la información disponible para esta región como secuencias de ADN en bases de datos (GenBank) para el grupo taxonómico particular, se validó la utilidad de esta herramienta.

Extracción de ADN

Para la obtención de ADN se utilizó el método de extracción buffer de lisis de Collins et al., 1987 adaptado por Uribe (2002). De cada espécimen se tomaron fragmentos de una o dos patas como fuente de ADN, las demás estructuras morfológicas se conservaron en viales hasta la realización de montajes y la disección de genitalias, para poder realizar la identificación con base en caracteres morfológicos de estas estructuras.

El éxito de las extracciones del ADN total se verificó mediante cuantificación, inicialmente en un espectrofotómetro UV-VIS de barrido espectral y posteriormente en una electroforesis en un gel de agarosa al 0.1% con GelRed a 80 voltios durante 45 minutos.

Amplificación de la región genómica de interés

Se utilizaron los oligonucleótidos de la región *coxI* propuestos por la iniciativa de códigos de barras de ADN (IBOL): LCO1490 - GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG (sentido 3´-5´) y HCO2198 - TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA (sentido 5´-3´) (Hébert *et al*., 2003). La amplificación usando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR se realizó en un volumen final de 30 µl incluyendo 3 µl de buffer, 1.92 µL dNTPs, 2.6 µL MgCl2, 0,5 µL Platinum® Taq DNA Polimerasa, 0.96 µL de cada oligonucleótido, 15.26 µL H2O ultrapura y 4.8 µL de ADN. La reacción fue llevada a cabo en un termociclador C-1000 (BIORAD). El programa de ciclo térmico de PCR consistió en desnaturalización inicial de 5 min (94 °C), seguida por 35 ciclos de 94 °C durante 1 min (desnaturalización), 45 °C durante 1.50 min (alineamiento), 72 °C durante 1.50 min (extensión), y una extensión final a 72° C durante 5 min y finalmente manteniendo a -25 ° C hasta su análisis. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.6% a 80 V durante 45 minutos en 1 × TBE Buffer; teñido en 5 µl de SYBR Safe DNA Gel Stain, observados en un sistema de

electroforesis ENDURO ™ Gel XL y finalmente visualizados en el sistema de documentación de gel.

Secuenciación

Luego de verificar la amplificación del fragmento de ADN objetivo se procedió a una purificación de los productos de PCR y finalmente a la secuenciación por el método de Sanger a través de un proveedor externo con un secuenciador automático ABI 3730xl (Applied Biosystems™).

Edición de secuencias

La calidad de las secuencias obtenidas fue verificada a través de programas bioinformáticos. Inicialmente a través del programa Geneious Prime se verificó la calidad del electroferograma y seguidamente se halló la secuencia consenso. Durante el análisis para detectar la presencia de NUMTS (copias nucleares del gen mitocondrial usado como código de barra de ADN) en las secuencias, según lo sugerido por Song *et al*., (2008), durante los pasos de observación de los cromatogramas, se examinó la presencia de ambigüedades, picos dobles y el ruido, entendido este como difícil lectura de los picos. Posteriormente, se examinó la composición nucleotídica para detectar sesgos y se verificó la ausencia de acumulación de mutaciones, codones de parada.

Posteriormente con el fin de verificar que las secuencias pertenecían al grupo estudiado se realizó un BLAST (Altschul, 2005) tomando como referencia el genoma de la mosca Tephritidae *Ceratitis capitata* Wiedemann, 1824 (NCBI: NC_000857.1) se alineó cada una de las secuencias para confirmar la identidad del gen.

Las secuencias consenso obtenidas para cada individuo se alinearon usando el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004), el cual es un método iterativo que reduce los errores de los métodos progresivos y brinda un mejor resultado sin importar la calidad de las secuencias, además se examinaron visualmente, para asegurar que no existían codones de parada ni mutaciones en el marco de lectura.

El análisis de divergencia entre las secuencias que correspondían a los individuos estudiados medido por distancias genéticas se realizó a través del programa MEGA X (Kumar *et al*., 2018) las cuales fueron calculadas utilizando el modelo de distancia de Kimura 2 parámetros —K2PII (Kimura, 1980), con base en el cual se calcularon las distancias con bootstrap de 10000 réplicas. De acuerdo con los valores obtenidos se

realizó el análisis Neighbour-Joining (NJ), el cual provee una representación gráfica de las agrupaciones y patrones de divergencia.

También se incluyeron las secuencias disponibles en Bold Systems para los grupos de interés revisando cuidadosamente su procedencia y autores, de forma que pudiesen aportar información para el análisis.

Se utilizaron dos criterios de amplio uso en estudios de esta índole para determinar la presencia de más de una especie. Los rangos de divergencia expresados como distancias genéticas: “La divergencia de la secuencia de código de barras de ADN entre la mayoría de las especies congéneres es generalmente superior al 2%” (Hébert, *et al.*, 2003), mientras que la variación intraespecífica suele ser inferior al 1% (Avise, 2000).

1.3 Resultados

1.3.1 Sitios muestreados

Tabla 1-2. Localidades de muestreo de *C. bonariensis* en Antioquia, Colombia.

Localidad	Uso del suelo	Coordenadas	a.s.n.m.
Antigua Vía al Mar, Medellín	Borde de carretera	6°19'13.4"N 75°39'16.5"W	2.300
Antigua Vía al Mar, Medellín	Borde de carretera	6°19'09.4"N 75°39'09.5"W	2.289
Llanogrande, Rionegro	Bancos de germoplasma *ex situ* Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*)	6°07'55.8"N 75°24'52.9"W	2.150
Llanogrande, Rionegro	Lote con Aguacate (*Persea americana*)	6°07'51.6"N 75°24'52.3"W	2.150
Llanogrande, Rionegro	Borde de camino - sendero	6°07'50.6"N 75°24'55.6"W	2.150
Llanogrande, Rionegro	Bancos de germoplasma *ex situ* Achira (*Canna indica*)	6°07'51.3"N 75°24'56.3"W	2.150
Llanogrande, Rionegro	Bancos de germoplasma *ex situ* Mora (*Rubus* spp.)	6°07'53.0"N 75°24'51.1"W	2.150
Llanogrande, Rionegro	Lote con Freijoa (*Acca sellowiana*)	6°07'50.6"N 75°24'54.4"W	2.150
Llanogrande, Rionegro	Lote con frijol (*Phaseolus vulgaris*)	6°07'52.5"N 75°24'57.2"W	2.150
Llanogrande, Rionegro	Borde de camino - sendero	6°07'53.8"N 75°24'58.9"W	2.150
Llanogrande, Rionegro	Lote con Fique (*Furcraea* sp.) canal de drenaje	6°08'02.2"N 75°25'03.3"W	2.125

Llanogrande, Rionegro	Lote con Maíz (*Zea mays*)	6°08'06.2"N 75°25'03.2"W	2.125
Llanogrande, Rionegro	Bancos de germoplasma *ex situ* Mortiño (*Vaccinium meridionale*)	6°08'10.1"N 75°25'02.8"W	2.125
Llanogrande, Rionegro	Lote con Papa (*Solanum tuberosum*)	6°08'09.2"N 75°25'06.4"W	2.125
Llanogrande, Rionegro	Lote con Aguacate (*Persea americana*)	6°07'58.1"N 75°25'13.7"W	2.125
Llanogrande, Rionegro	Lote con Arboretum	6°08'12.1"N 75°24'59.2"W	2.125
Santa Fe de Antioquia	Canal de riego, bode de camino	6°31'52.6"N 75°49'40.4"W	510
Santa Fe de Antioquia	Lote con Mango (*Mangifera indica*)	6°31'56.3"N 75°49'35.5"W	510
Santa Fe de Antioquia	Canal de riego	6°31'48.1"N 75°49'44.7"W	510

1.3.2 Muestras botánicas y reconocimiento de *C. bonariensis*

Según la literatura, para Antioquia se reporta la presencia de *Conyza laevigata* (Rich.) Pruski; *C. primulifolia* (Lam.) Cuatrec. & Lourteig, *C. canadensis* (L.) Cronquist, *C. sumatrensis* (Retz.) E. Walker var. *leiotheca* (S.F. Blake) Pruski & G. Sancho, var. *Sumatrensis* y *C. bonariensis* (ICN, 2007; Idárraga et al., 2011).

Las claves taxonómicas disponibles y consultadas para la diferenciación de especies fueron las de Cabrera 1963, Ariza Espinar 2005, Flora Argentina 2017 y Pruski 2006. Algunos de los aspectos a tener en cuenta para la identificación de *C. bonariensis* después de la revisión de las claves son: plantas verde-grisáceas y de ramificación simpodial (excepto var. *angustifolia*); hojas estrechas, las basales oblanceoladas a lineares, irregularmente dentadas o enteras, las distales lineares; capítulos con brácteas internas a menudo purpúreas distalmente; brácteas estrechándose hacia la base; vilano blanquecino cuya anchura, expandida, es de 12-16 mm la forma de capítulos florales, el tamaño de los capítulos, el número de series de flósculos marginales, ausencia de papus y su colación). Las plantas de *C. bonariensis* pueden llegar a medir hasta 1 metro de altura, son de tallo erecto, ramificado en la base y como se mencionó de color gris y con presencia de tricomas, las hojas tienen 40 a 90 mm de largo y de 5 a 15 mm de ancho, con márgenes dentados. Las flores crecen en una panícula de forma piramidal que produce numerosas flores, de 50-200 flósculos radiales por cabeza que rodean a cada bráctea urceolada. Las inflorescencias son blancas y algunas veces se tiñen de púrpura o rojo (Wu, 2007) (Figura 1-2 a y b) fotos

del autor. Además, *C. bonariensis* presenta densidades de tricomas y estomas significativamente más altas que *C. sumatrensis,* siendo las densidades de tricomas para *C. bonariensis* con una variación entre 67,2 a 221,9 tricomas mm^2 sobre el haz de la hoja y de 74,0 a 168,1 tricomas mm^2 sobre el envés, (Wu y Zh, 2014). En cuanto a los estomas, *C. bonariensis* tiene en promedio tiene 314,3 ± 12,5 estomas por mm^2 sobre el haz de la hoja y 273,4 ± 9,1 estomas mm^2 sobre el envés (Wu y Zhu, 2014).

Figura 1-2. **a)** Planta de *C. bonariensis:* ***b)*** Inflorescencia de *C. bonariensis.*

Las muestras verificadas por morfología en el Herbario Gabriel Gutiérrez V. (MEDEL) de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, fueron depositadas en la colección del mismo, pero se tomaron pequeñas muestras para la verificación de la identidad por métodos moleculares. Se consideró fundamental verificar la identidad de la planta para que las observaciones sobre insectos fitófagos fueran estrictamente realizadas sobre la especie de interés.

Verificación de la identidad con base en datos moleculares

Con base en los alineamientos de las secuencias de DNA obtenidas de los ejemplares previamente identificados se confirmó la identidad de las plantas procesadas como *C. bonariensis*, verificando que además de tener criterios morfológicos claros para la identificación de las plantas, los amplificaciones de espaciadores ribosomales son una herramienta importante para la identificación de la especie, lo cual se considera de fundamental importancia para la realización exitosa de programas para su control.

Para la obtención de las secuencias utilizadas en el alineamiento y previa verificación en gel de agarosa al 1.2% en buffer TBE a 80V y Gel Star™ (1:100) los productos de amplificación de la PCR fueron purificados usando un sistema de filtración Millipore y secuenciados en ambos sentidos de la cadena en la empresa Macrogen INc. Se realizó edición manual y construcción de las secuencias consensus usando BioEdit (versión 7.1.3.0) (Hall 1999, Hall 2011).

Los alineamientos fueron realizados usando Clustal W y MUSCLE para las regiones no codificantes, ambos algoritmos integrados en MEGA 5.0. (Tamura et al 2011). Los parámetros de penalidad y extensión de gaps fueron considerados por defecto.

La evaluación de la similaridad entre las secuencias de las bases de datos y las obtenidas fue evaluada usando BLAST en Genbank usando el parámetro MegaBLAST. (Gemeinholzer et al., 2006).

El porcentaje de similaridad fue analizado por los ajustes más cercanos. En la (Figura 1-3) se observan los dendrogramas de Neighbour-Joining (NJ) realizados en el programa Geneious versión 5. (Drummond et al., 2011). Se incluyen al menos ocho secuencias curadas y editadas de *C. bonariensis* disponibles en las bases de datos que fueron comparadas con las del presente estudio.

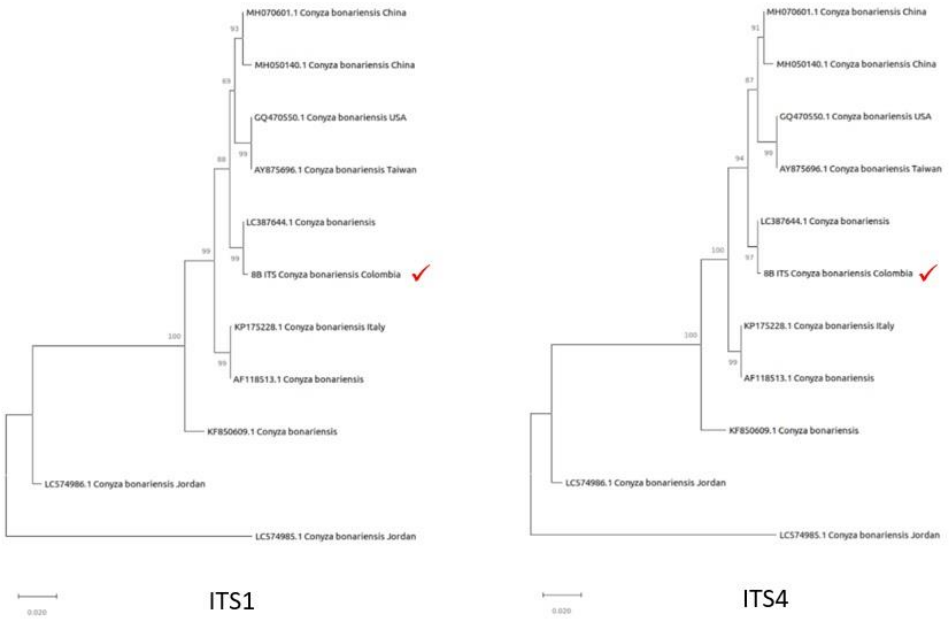

Figura 1-3. NJ de las dos regiones amplificadas ITS1 y ITS4 que confirman la identidad de las plantas estudiadas como *C. bonariensis.* En rojo se señala *C. bonariensis* de Colombia secuencias consenso de los productos amplificados en el presente estudio.

1.3.3 Descripción del daño, Identificación taxonómica y listado de especies asociadas

En total se observaron cuatro tipos de daños realizado por insectos asociados a *C. bonariensis,* afectando diferentes estructuras de la planta como se detalla en la Tabla 1-3.

Tabla 1-3. Tipos de daños observados asociados con los insectos

Tipo de daño	Figura	Descripción
Agalla		Estructuras anormales de partes de los tejidos u órganos de las plantas que se desarrollan por la reacción específica a la presencia o actividad de un organismo inductor" (planta o animal, frecuentemente un insecto), produciendo una reacción de la planta que incluye básicamente el desarrollo anormal o patológico de sus células, tejidos u órganos. (Meyer, 1987; Shorthouse y Rohfritsch, 1992)
Enrollamiento de hojas		Causado por larvas que provocan el enrollamiento de las hojas, pegándolas entre sí, para formar su albergue, donde se alimentan raspando la hoja.
Galerías en hojas		Daño generado durante la alimentación de las larvas, conocido como minadura, las cuales pueden tener forma serpenteada, en laguna o ampolla o una combinación de las dos formas (Csóka, 2003).

Tallos barrenados		Daños causados por las larvas cuando se alimentan de los brotes jóvenes, provocando la muerte de la yema apical, posteriormente perforan el tallo y se alimentan de los haces vasculares.

Los daños registrados fueron asociados con nueve insectos fitófagos pertenecientes a tres orden y 6 familias (Tabla 1-4).

Tabla 1-4. Insectos asociados, estados biológicos y relación con el daño

Insecto fitófago	**Estado biológico encontrado**	**Parte de la planta afectada**
Trupanea bonariensis	Larvas	Tallo (ápice de la planta)
Proba vitiscuttis	Ninfas y adultos	Hojas
Enchenopa squamigera	Adultos	Tallo
Bolbonota pictipennis	Adultos	Tallo
Caloreas cydrota	Larvas	Hojas (ápice de la planta)
Phyllonorycter sp.	Larvas	Hojas
Lioptilodes prometopa	Larvas	Tallo (ápice de la planta)
Lioptilodes albistriolatus	Larvas	Tallo (ápice de la planta)
Lioptilodes sp.	Larvas	Tallo (ápice de la planta)

A continuación, se detalla los resultados de la identificación taxonómica y el daño:

- **Orden Diptera**

La determinación taxonómica se realizó con base en caracteres morfológicos y el empleo de claves dicotómicas para las subfamilias de Tephritidae (modificadas de Korytkowski, 1986). Para la determinación a nivel de género se usó las claves de Diptera del Neártico (Foote, Steyskal, 1987). Los ejemplares de la familia Tephritidae

fueron identificados como *Trupanea bonariensis* y confirmados por el especialista Allen Lee Norrbom del United States Departament of Agriculture USDA.

Algunas de las características morfológicas de importancia para reconocer *Trupanea bonariensis* son: cabeza generalmente con coloraciones predominantes entre amarilla o gris amarillenta; margen oral anterior no muy marcado; probóscide no geniculado; dos pares de setas fronto orbitales superiores; tres pares de fronto-orbitales inferiores, el par anterior a menudo más corto y más débil que otros, pero rara vez falta (Figura 1-4a). Tórax y escutelo densamente grises espolvoreados; venas humerales y supra-alar presentes; un par de setas dorso centrales, más cercano a la sutura que a la línea trazada a través de los supra-alares; un par de escutelares, además de algunas setas que bordean el margen posterior del escutelo y patrón del ala generalmente estrellado (Figura 1-4b).

***Trupanea bonariensis* Brèthes, 1908.**

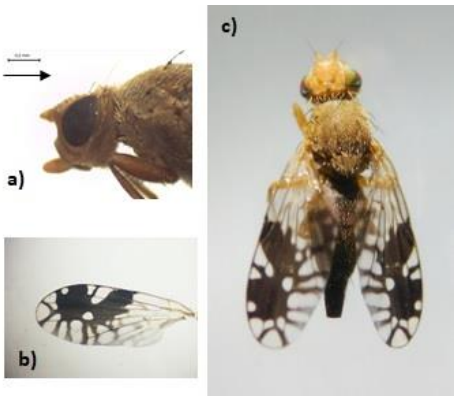

Figura 1-4. **a)** Hembra de *T. bonariensis;* **d)** Ala con patrón estrellado y **c)** Presencia de setas fronto orbitales.

Esta especie fue descrita por primera vez por Brèthes en el año de 1908. El género *Trupanea* Schrank (1795), se considera uno de los más grandes e importantes de la subfamilia Tephritinae, que está representada por 203 géneros con 1.847 especies a nivel mundial, de las cuales 700 se presentan en el continente americano. La subfamilia Tephritinae es una de las menos conocidas en el Neotrópico. La mayoría de las especies de este grupo se alimentan de flores, semillas, tallos o raíces, principalmente de plantas *Asteraceae*, *Verbenaceae* y *Laminaceae* y este es el género considerado como el más especializado de todos los *Tephritidae*, por lo que algunas de sus especies han sido utilizadas como controladores biológicos de malezas, como

es el caso de *Procecidochares utiles* y *Urophora solstitialis* (Hernández-Ortiz et al., 2020).

T. bonariensis ha sido reportada por McKay y Gandolfo (2001) en especies de *Conyza albida* recolectados en el norte de Argentina, Uruguay, sudeste de Paraguay y sur de Brasil. Estos autores afirman que, aunque se han examinado ejemplares de la forma "típica" de *C. bonariensis* coexistiendo con plantas de *C. albida,* no se hallaron agallas, por lo que *C. albida* es hasta ahora el único huésped conocido. En Colombia actualmente no existen reportes en la literatura sobre la presencia de *T. bonariensis* siendo el único antecedente las observaciones de Suarez (2021), quién participó del mismo proyecto de investigación con CSIRO (comunicación personal*)*, por lo cual, esta investigación genera un registro importante sobre esta especie afectando *C. bonariensis.*

Frecuencia de reporte y descripción del daño

La especie *T. bonariensis* se registró en 14 de los 19 sitios muestreados, que corresponden a los realizados en el municipio de Rionegro, Antioquia, encontrándola con frecuencia afectando las plantas de interés. El daño característico ocasionado por *T. bonariensis* con el cual se reconoce en campo, consiste en un abultamiento del tallo en la parte apical de la planta, conocido como cecidia o agalla, que es una "estructura anormal de un órgano de la planta o partes de un tejido, que se desarrolla por la reacción específica a la presencia o actividad de un organismo inductor" (Medianero et al., 2007). En estados tempranos de desarrollo de la agalla, esta es de color verde, y se observa un ligero engrosamiento del tallo, a medida que esta va creciendo, toma una forma redondeada a ovalada y cambia a un color púrpura rojizo cuando está madura (Figura 1-5a).

Figura 1-5. a) Formación característica de agallas; **b)** Formación de brotes laterales.

Según observaciones de campo y laboratorio, el tamaño de la agalla puede variar dependiendo del número de individuos que se desarrollan en su interior, algunas pueden llegar a medir hasta 32,8 mm de largo por 26,4 mm de ancho (Figura 1-5b), estas son huecas y de paredes anchas. Las larvas de *T. bonariensis* se alimentan de las paredes internas de la agalla y empupan dentro de la misma y se puede encontrar entre 3 y 9 larvas (Figura 1-5a). Los adultos emergen de la agalla a través de un orificio realizado previamente por las larvas.

Figura 1-6. **a)** Larvas de *T. bonariensis*; **b)** Larvas y pupa de *T. bonariensis* s y **c)** pupas de *T. bonariensis.*

Se encontraron dos formas del adulto (Figura 1-7) con leve variación morfológica en la coloración del tórax, cuya variabilidad fue evaluada desde la perspectiva molecular (ver datos adelante).

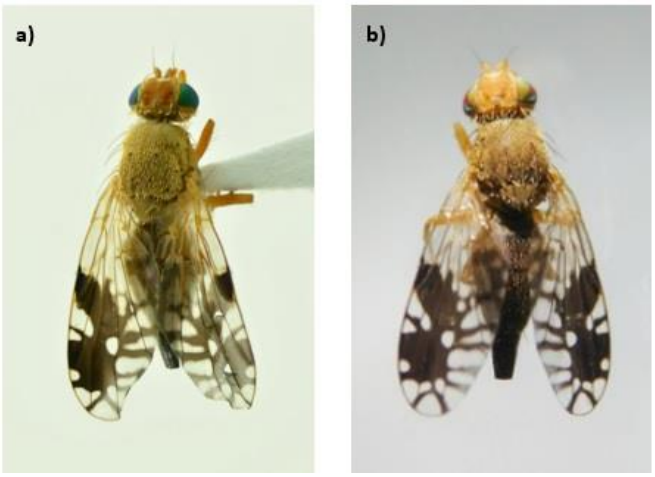

Figura 1-7. a y b) Hembras de *T. bonariensis*

En general, las plantas que se encontraron afectadas por *T. bonariensis*, son plantas jóvenes en estado de desarrollo vegetativo, con una altura promedio de 50 cm. La principal afectación que ocasiona la formación de la agalla es una interrupción del crecimiento de la planta, puesto que provoca la pérdida de la dominancia apical, en consecuencia, se da la formación de brotes laterales. Aunque el daño causado por *T. bonariensis* no ocasiona la muerte de la planta, si modifica su estructura, disminuyendo su capacidad reproductiva y fisiológica, pudiendo actuar como un regulador natural de la población de esta arvense (Hernández y Hernández, 2018).

- **Orden Hemiptera**

Los ejemplares fueron identificados como *Proba vitiscuttis* (Figura 1-8); *Enchenopa squamigera* (Figura 1-10) y *Bolbonota pictipennis* (Figura 1-10). Aunque en la literatura se reporta las claves para la identificación taxonómica de estas especies, no es posible tener acceso a las mismas, por lo cual, la identificación o determinación taxonómica se realizó por comparación con especímenes depositados en colecciones o museos entomológicos y para el caso de *P. vitiscuttis* se realizó identificación molecular.

- ***Proba vitiscuttis* (Stal, 1860)**

Figura 1-8. Adultos *de P. vitiscuttis.*

La especie *P. vitiscuttis* pertenece a la familia Miridae, la cual representa el 25% del suborden Heteroptera (Henry, 2009), con aproximadamente 11.139 especies descritas (Schuh, 2002-2013). La biologia de esta familia es practicamente desconocida en la región neotropical (Ferreira et al, 2018). En general, entre los míridos que se encuentran afectando plantas, el 60 % ocurre en una especie especifica y menos del 20 % tiene asociaciones con más de dos hospedantes lo cual los hace importantes candidatos para programas de CBC (Cassis; Schuh, 2012).

Algunos de los míridos que se han reportado asociados a plantas de *Conyza* sp son: *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois) reportado en *C. canadensis* en Mississippi Delta y Texas, EE.UU. (Cleveland, 1982; Esquivel et al., 2007) y en *Erigeron bonariensis, C. canadensis* y *Conyza* sp. en Canadá (Young, 1986; Weaver, 2001; Burange *et al*., 2012). Logarzo *et* al., (2005) reportan para Argentina y Paraguay a *Hyaliodocoris insignis* (Stal, 1860) y *Taylorilygus apicalis* (Fieber, 1861) en *Conyza* sp y a *Phytocoris aspersus* (Carvalho & Gomes) y *Proba vitiscuttis* (Stal) en *Conyza* sp. En Brasil, Nogueira *et al*., (2019) reportan a *Hyaliodocoris insignis* (Stal, 1860) y *Taylorilygus apicalis* (Fieber, 1861) en *Conyza* sp.

Según Logarzo *et al*., (2005) *T. apicalis* es el mírido que mayormente se asocia con Asteraceae, principalmente con el género *Conyza* sp en los países de Argentina y Paraguay, concluyendo que es una de las principales plantas hospederas (6400 ninfas en 39 sitios); además, sugieren que *T. apicalis* exhibe polifagia regional, es decir, monofagia u oligofagia en ciertos lugares, lo que lleva al uso de numerosos hospedadores en todo el rango geográfico del insecto, como se ha demostrado en

algunos otros míridos, no obstante *T. apicales* no fue observado en las *C. bonariensis* observadas.

Para Colombia, según el boletín del Museo Entomológico Francisco Luis Gallego, Volumen 10 Nº 4 de 2018 de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, actualmente reposan 702 individuos de la familia Miridae en 44 géneros y 50 especies identificadas. Se dispone de ocho ejemplares de *P. vitiscuttis* (Stal, 1860) todos colectados en el departamento de Antioquia en los municipios de Bello y Medellín encontrados en maíz, yuca y en *Crotalaria* sp. Mediante la colaboración del personal especializado del MEFLG los especímenes del presente estudio fueron identificados por comparación como *P. vitiscuttis.*

Por lo anterior, aunque *P. vitiscuttis* (Stal, 1860) se encuentra reportada para Colombia, este sería el primer registro de esta especie sobre plantas de *C. bonariensis*.

Frecuencia de reporte y descripción del daño

La especie *P. vitiscuttis* se registró en 14 de los 19 sitios con muestreos, que corresponden a los realizados en el municipio de Rionegro, Antioquia, en los cuales esta especie se encontró frecuente en planta. El daño que ocasiona *P. vitiscuttis* ocurre en las hojas de *C. bonariensis* al alimentarse, provocando manchas negras producidas por su aparato bucal chupador. En observaciones de campo se llegó a observar hasta siete individuos por planta entre adultos y ninfas. Cuando el daño es severo, las hojas se contraen o deforman provocando una posterior marchitez de la misma y en consecuencia, una pérdida de área foliar disponible (Figura 1-9).

Figura 1-9. Daño característico de *P. vitiscuttis* sobre las hojas de *C. bonariensis*.

- ***Enchenopa squamigera* y *Bolbonota pictipennis***

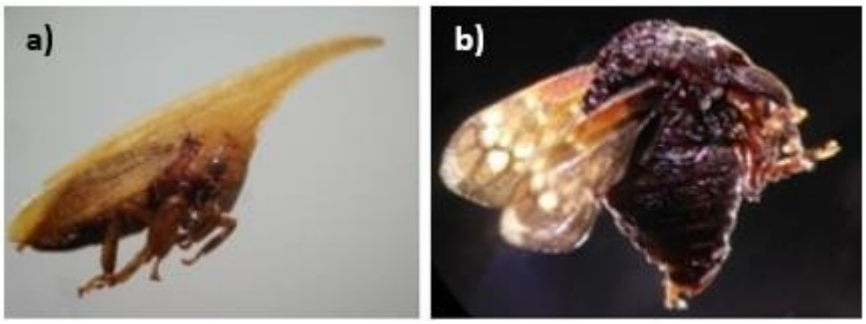

Figura 1-10. a) Adultos de *E. squamigera* y **b)** *B. pictipennis*.

Estas dos especies pertenecen a la familia Membracidae Rafinesquee (1815) la cual se encuentra distribuida en todo el mundo, siendo más diversa en el neotrópico. Es la segunda familia más numerosa dentro de la superfamilia Membracoidea después de Cicadellidae, la cual está compuesta por nueve subfamilias, 49 tribus, 428 géneros (Deitz & Wallace, 2011) y 3,450 especies (McKamey, 1998).

Los membracidos de la región Neártica, caribe y neotropical son endémicos del nuevo mundo. Colombia, Perú, Ecuador y Guayana son los países más diversos en especies (Wood, 1993). Evidencias fósiles y análisis morfológicos, sugieren que la familia se originó en el nuevo mundo y por dispersión llegaron al viejo mundo (Dietrich et al., 2001).

Los membrácidos se alimentan del floema de las plantas hospedantes, tanto de plantas gimnospermas como angiospermas. Según Wood (1993) existen especies monófagas y polífagas. La monofagía está presente en *Enchenopa binotata*, *Vanduzea arquata*, *Thelia bimaculata*. Especies de *Cyrtolobus* y *Platycotis vittata* están restringidas a *Quercus*. *Umbonia crassicornis* utiliza al menos nueve géneros diferentes de leguminosas. Otros géneros generalistas son *Bolbonota*, *Guayaquila* y *Calloconophora*, a los cuales se les ha registrado en dos o más familias de plantas.

En Colombia, para el género *Enchenopa* Amyot & Serville, 1843, según Gonzáles (2014) se encuentran registros en los departamentos de Antioquia, Bolivia, Boyacá, Caldas, Chocó, Córdoba, Cundinamarca, Huila, Magdalena, Meta, Quindío, Santander, Tolima, Valle del Cauca y Vichada, asociados a cultivos de *Eucaliptus grandis*, *Eucalyptus salinga*, *Musa* sp., *Citrus* sp, *Coffea arabica*, y *Rubus* sp, también se reportan otros hospedantes como: *Ficus* sp., *Vismia* sp., *Maclura tinctoria*, *Dipteryx*

sp., *Tecoma grandis*, *Brunfelsia pauciflora, Acacia* sp y algunas especies de Verbenaceae, Peperaceae, Asteraceae y Poaceae.

En cuanto al género *Bolbonota* Amyot & Serville, (1843) y Gonzáles (2014) mencionan reportes en los departamentos de Amazonas, Antioquia, Boyacá, Caldas, Cauca, Chocó, Cundinamarca, Magdalena, Meta, Santander, Valle del Cauca, asociados en cultivos de *Theobroma cacao*, *Phaseolus vulgaris*, *Annona muricata*, *Citrus* sp., *Coffea arabica*, y otros hospedantes de familias como Piperaceae y Fabaceae, además de *Eucalyptus saligna*, *Cytharexylum subflavescens*, *Rubus* sp. y *Heliconia rostrata*.

- **Frecuencia de reporte y descripción del daño**

Estas dos especies de membracidos fueron encontrados en un solo sitio de muestreo de la localidad de Santa Fe de Antioquia, Antioquia. Estos insectos no fueron vistos en otras localidades. Ambas especies fueron halladas sobre plantas jóvenes con los individuos posados sobre el tallo principal alimentándose de savia y en asocio con hormigas. Según Godoy et al. (2006) los membrácidos presentan mutualismo con algunos himenópteros, como hormigas, mientras ellos les proveen gotas de rocío de miel, rico en sustancias azucaradas, las hormigas los protegen de sus enemigos naturales.

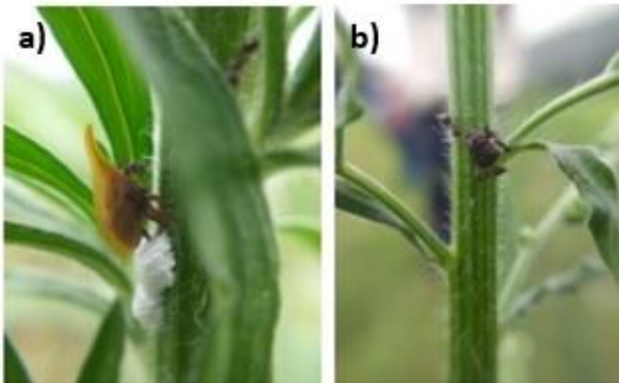

Figura 1-11. a) Evidencia de adultos de *E. squamigera* y **b)** *B. pictipennis* en *C. bonariensis.*

Según (Funkhouser, 1951), la cantidad de savia consumida por un membrácido generalmente es poco significativa. En observaciones de campo, los daños causados por inserción del estilete sobre el tallo tampoco tienen mayor relevancia. Deitz & Wallace (2011), mencionan que son pocas las especies de la familia membracidae consideradas de importancia económica, algunas se registran como plagas menores

de leguminosas, aguacate, cacao, café y papaya. Su daño está más dirigido hacia la pérdida de producción por daños en las flores o frutas a causa de la inserción del estilete y el órgano ovipositor (Funkhouser, 1951). El género *Micrutalis* es el único con registro como vector de virus. *Micrutalis malleifera* trasmite el virus seudoencrespamiento superior en *Solanum lycopersicum* (Mead, 1986).

- **Orden Lepidoptera**

  - **Familia Choreutidae**

Respecto a esta familia la identificación se realizó con base en caracteres morfológicos y el uso de claves dicotómicas (Heppner & Duckworth, 1981) y subfamilias de Chroreutidae (Rota, 2003). Para la disección de genitalia se utilizó la metodología descrita por Zimmerman (1978).

La especie fue identificada como *Caloreas cydrota* (Figura 1-12). Esta fue verificada por la doctora Jadranka Rota, curadora de entomología del Museo Biológico de la Universidad de Lund Suecia y especialista en polillas “metalmark moths” (Choreutidae). Morfológicamente estas especies de microlepidópteros se distinguen fácilmente de otras por el haustellum de escamas basales. Este es de tipo escamado está presente en todas las especies de Choreutidae. Estas escamas están generalmente unidas en dos filas, una en cada gálea. Por la importancia del daño y las características de esta especie también se realizó identificación molecular.

  - ***Caloreas cydrota* (Meyrick, 1915)**

Figura 1-12. Adultos *C. cydrota.*

La especie *C. cydrota* se reportó por primera vez en Colombia en 1915 por Meyrick, hace parte de esta pequeña familia de microlepidópteros distribuidos en todo el mundo, concentrándose la mayor diversidad en los trópicos. Sin embargo, esta familia ha sido poco estudiada y la información disponible de este grupo de insectos es limitada. Happener y Duckwort en su catálogo de Sesiodea, enumeran 356 especies, de las cuales 44 han sido descritas desde entonces (Rota, 2005).

- **Frecuencia de reporte y descripción del daño**

La especie fue encontrada en 12 sitios de la localidad de Rionegro en el Oriente antioqueño y en dos sitios de la localidad de Santa Fe de Antioquia, Occidente antioqueño. Se encontró de manera abundante y con mucha frecuencia afectando plantas de *C. bonariensis.* El primer síntoma visible causado por larvas consistió en el agrupamiento de las hojas jóvenes cercanas al ápice de la planta mediante la seda que estas mismas generan, creando una especie de refugio, el cual utilizan como protección frente a posibles depredadores (Figura 1-13). Generalmente se ha observado un solo refugio por planta, en el cual se pude llegar a encontrarse entre dos y seis larvas en diferentes instar.

Figura 1-13. Daño de *C. cydrota* en plantas de *C. bonariensis.*

La alimentación de las larvas ocurre en las hojas más internas dentro del refugio, prefiriendo las hojas más jóvenes provocando en las mismas una esqueletización (Figura 1-14). Debido a la preferencia por los brotes tiernos de la parte apical de la

planta para su alimentación, en ocasiones las larvas pueden llegar a afectar el meristemo apical, induciendo pérdida de dominancia. Comúnmente estas plantas presentan un aspecto de marchitez irreversible y son de menor tamaño.

Se ha observado que a medida que las larvas se alimentan dentro del refugio, este comienza a llenarse de excremento que se observa como pequeñas bolitas fecales de color negro o café oscuro. Cuando esto ocurre, la larva se mueve a una nueva hoja, incluso cuándo va a empupar, agrandando cada vez más el tamaño del refugio.

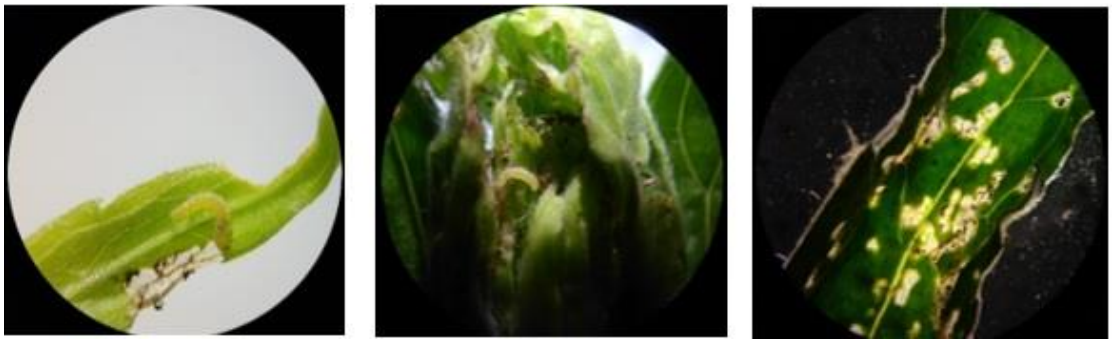

Figura 1.14. Larvas de *C. cydrota* alimentándose de tejido foliar de *C. bonariensis*

- **Familia Gracillariidae**

Par este caso los individuos fueron observados con muy poca frecuencia, no se contó con material suficiente para lograr la identificación al nivel de especie. Se determinó como una especie sin identificar del género *Phyllonorycter.*

Las características morfológicas más importantes del género en el estado adulto son: tegumento cónico sin setas apicales, octavo esternito formando una capa alargada cubriendo las valvas; occipucio con escamas piliformes, ala anterior con cinco venas apicales y ala posterior con vena M2 (Kumata, 1993).

- **Genero *Phyllonorycter* sp**

Para este género se registran 401 especies relacionadas con 29 familias vegetales. Las especies de este género se distribuyen a lo largo del mundo, en especial en la región Paleártica (De Prins y Kawahara, 2012). Para el Neotrópico se registran 15 especies (De prins y De Prins, 2014) y en Colombia aún no se reporta ninguna especie, debido a la dificultad de trabajar con este tipo de microlepidópteros.

- **Frecuencia de reporte y descripción del daño**

Este minador de hojas fue encontrado en un solo sitio de la localidad de Rionegro, Antioquia, se encontraron larvas con poca frecuencia y se logró obtener un solo individuo adulto (Figura 1-15).

El daño que causa este microlepidóptero consiste en la formación de galerías sobre las hojas; las larvas comienzan a minar las hojas desde el ápice, formándose una especie de laguna globosa y después se observan galerías a lo largo de la lámina foliar. Se puede encontrar hasta dos o tres larvas por hoja. Las hojas afectadas terminan marchitándose, lo que provoca una pérdida de área foliar efectiva.

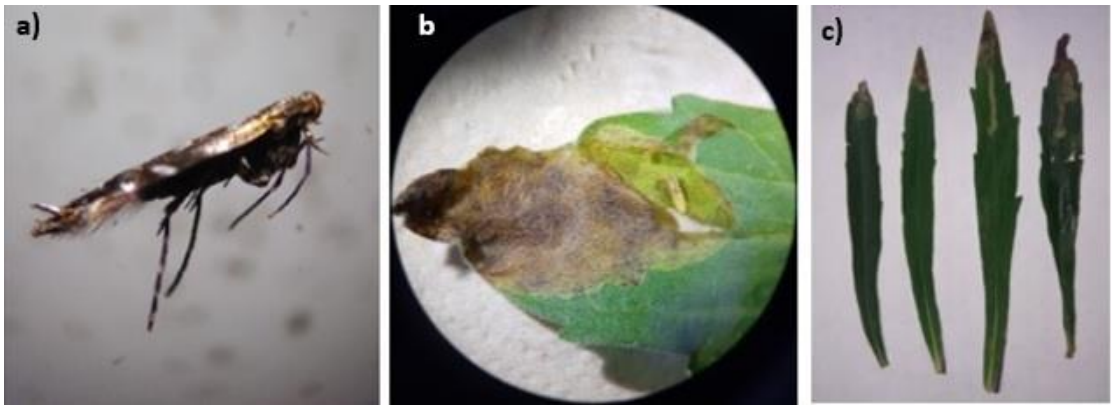

Figura 1-15. a) Adulto de *Phyllonorycter* sp; **b)** daño causado por la larva y **c)** diferentes grados de daño en diferentes hojas.

El único registro similar de un minador de la misma familia en *Conyza* sp*,* está en la página Web BugGuide (2021), la cual permite la identificación de insectos y arañas para Estados Unidos y Canadá con base en imágenes e información complementaria. En ella se encontró un registro fotográfico cargado por Tracy S. Fedelman de un minador afectando hojas de *C. canadensis* que fue identificado como posible *Leucospilapteryx venustella* o quizá *Parectopa plantaginisella.*

▪ Familia Pterophoridae

Se encontraron tres especies con base en observaciones de adultos y sus genitalias: *Lioptilodes albistriolatus*, *Lioptilodes prometopa* y una especie desconocida del género *Liotilodes* sp. Por su frecuencia de hallazgo e importancia del daño y similaridad entre las especies, también se realizó taxonomía molecular.

***Lioptilodes* sp Zimmerman, 1958** (se considera con base en la morfología que esta constituye una nueva especie la cual está en proceso de descripción (Figura 1-16a).

Según Gielis (2006), las principales características para el género son: Cabeza aparentemente escamosa. Cara con penacho de pequeña escala. Palpos extendidos hacia adelante, segundo segmento cubierto con escamas erectas, aproximadamente una vez y media el diámetro del ojo. Alas anteriores hendidas desde aproximadamente 3/4; sin triángulo costal; vena R1 presente. Segundo lóbulo, en la mayoría de las especies del género, más ancho que el primer lóbulo (Figura 1-16b).

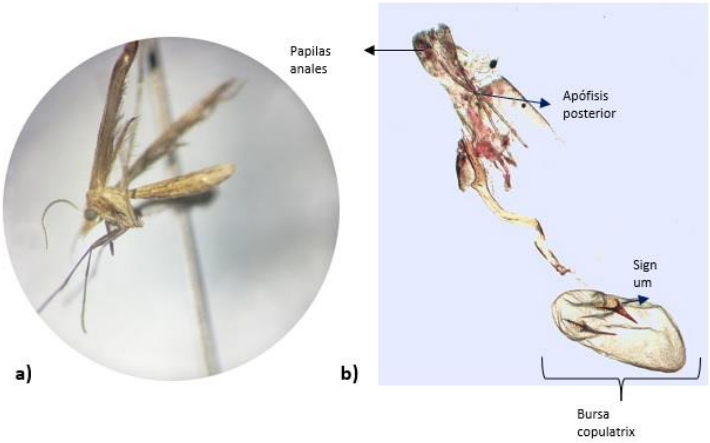

Figura 1-16. **a)** Adulto *Lioptilodes* especie nueva; **b)** Genitalia.

Venas anteriores: R1, R2, R3, R4 y R5 presentes; R3 acechado con R4; Cu1 y Cu2 presentes y separados; Cu1 desde el ángulo de la celda; Cu2 de la celda. Alas posteriores sin dientes escamosos en el dorso del tercer lóbulo; tercer lóbulo con una vena.

En cuanto a la genitalia, los machos presentan valvas simétricas, ovaladas a alargadas. El sáculo y el círculo llegan a la punta. Tegumen bien desarrollado y grande. Uncu robusto. Vinculum arqueado y bien conectado con el saco y antisacccus, arqueado ventrodorsalmente. Saccus a menudo bien desarrollado. Aedeagus curvado con coecum bien desarrollado. Las hembras por su parte presentan Ostio en posición central. El antro progresa gradualmente hacia las bolsas del conducto. Bursas de los conductos ocasionalmente con esclerito. Par de signa en forma de cuerno en bursa copulatrix. Lámina pos vaginal bien desarrollada, ya sea como una cresta después o como dos manchas al lado del antro, progresando lateralmente en cresta esclerotizada que termina en apófisis anteriores.

- **Frecuencia de reporte y descripción del daño.**

Las larvas de la familia Pterophoridae fueron observadas en siete sitios de la localidad del municipio de Rionegro y en dos sitios del corregimiento de San Cristóbal, Medellín, siendo en todos los casos frecuentemente observadas. Principalmente se encontraron afectando la parte apical de las plantas, barrenando el tallo (Figura 1-17c). En plantas con daño fresco se observó la presencia de excretas a la entrada del orificio (Figura 1-17a), mientras que, en las plantas con daño viejo, la pérdida de la dominancia apical indujo la formación de algunos brotes laterales (Figura 1-17b).

Figura 1-17. **a)** Orificio de entrada de la larva; **b)** Formación de brotes laterales y **c)** tallo barrenado.

Las larvas pueden llegar a barrenar hasta 6 cm desde el ápice de la planta y solo se encuentra una larva por planta. En laboratorio se pudo observar que en el momento de empupar salían del tallo. El daño que las larvas ocasionan no genera la muerte de la planta, pero sí afecta su arquitectura, reduciendo su capacidad fisiológica y reproductiva. Las plantas afectadas por lo general son plantas en estado vegetativo, pequeñas y cloróticas.

- ***Lioptilodes prometopa* (Meyrick, 1909)**

Figura 1-18. a) Hembra adulta de *L. prometopa* y **b)** macho.

Según Gielis (2006) esta especie se caracteriza por su tamaño, pero en gran medida por su genitalia. Tanto el macho como la hembra pueden tener una envergadura alar entre 27 – 30 mm. Presentan una cabeza escamosa con un mechón frontal prominente, con antenas de la mitad de la longitud del ala. Tórax y abdomen con una línea blanca lateral, patas traseras ferruginosas con dos pares de espolones cortos e iguales de largos. Hendidura de las alas anteriores desde 5/6, de color marrón rojizo. Primer lóbulo agudo y muy estrecho, segundo lóbulo cuatro veces más ancho que el primero. Flecos grisáceos, cerca del ápice de ambos lóbulos, parte inferior marrón. Alas traseras marrón-grisáceas. Flecos gris-blanquecinos. Parte inferior marrón.

Los caracteres morfológicos de la genitalia de la hembra son: antro que se estrecha gradualmente hacia la bolsa del conducto, bolsas de los conductos largas y delgadas. Bursa copulatrix vesicular, ligeramente triangular, cubierta de diminutas espículas. Sígum doble en forma de cuerno corto. Lamina postvaginalis ondular, lamina antevaginalis originada a partir de dos manchas por encima del antro. Apofisis anteriores tan largos como papilas anales. Apofisis posteriores cuatro veces más largos que las papilas anales (Gielis, 2006) (Figura 1-19c).

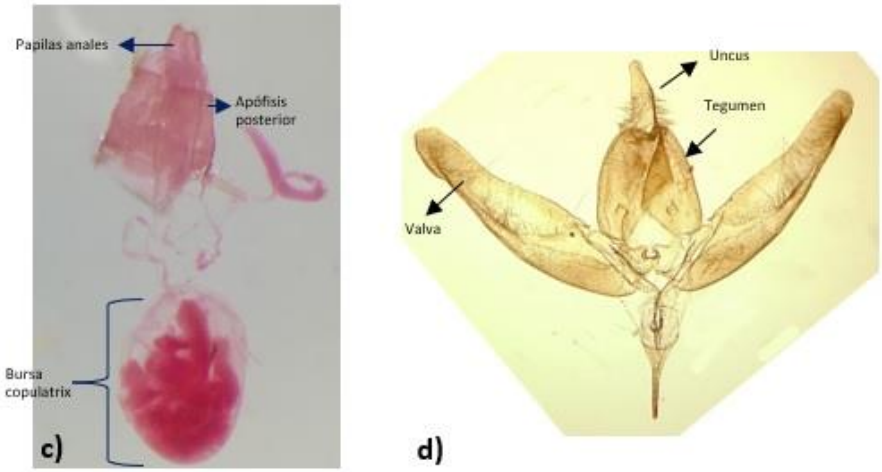

Figura 1-19. c) Genitalia hembra de *L. prometopa* y **d)** Genitalia macho de *L. prometopa.*

En cuanto a los genitales masculinos esta especie presenta: áculos extendido hacia ¾ de la longitud de la valva. Tegumen ancho. Uncus robusto. Vinculum delgado, progresando hacia un saco largo y grande. Antisaccus recto que termina en pomo. y adeagus curvado con un coecum bien desarrollado (Gielis, 2006) (Figura 1-19d).

Los individuos adultos de esta especie son de color gris claro, las alas anteriores están compuestas de escamas mixtas de color gris claro y blancas con manchas de color gris parduzco, presentan una envergadura entre 9.5 – 16.5 mm. Y su abdomen presenta rayas laterales pálidas. La especie se reconoce por las pequeñas manchas de color gris pardo oscuro anteriores y posteriores emparejadas en la base de la hendidura del ala anterior y una en el medio de la célula discal y un trazo de color blanco a lo largo de la costa en la base del primer lóbulo (Matthews et al., 2019).

La célula discal del ala anterior se pliega desde el centro de la célula discal hasta la hendidura, de modo que, en las muestras vivas, así como en las muestras sin extender, el par de manchas de color gris parduzco y las escamas oscuras a lo largo de la costa aparecen contiguos (Matthews et al., 2019).

A la fecha se conoce pocos registros de esta especie y no existe literatura con nuevos reportes. Actualmente en Perú, Carabaya, Limbani y Bolivia en Aguilani se reporta esta especie, pero no se mencionan las plantas hospederas (Gielis, 2006).

Para Colombia no se tiene información o registro de la especie, por lo que este sería el primer hallazgo para el país y el primer asocio con *C. bonariensis.*

- ***Lioptilodes albistriolatus* (Zeller, 1871).**

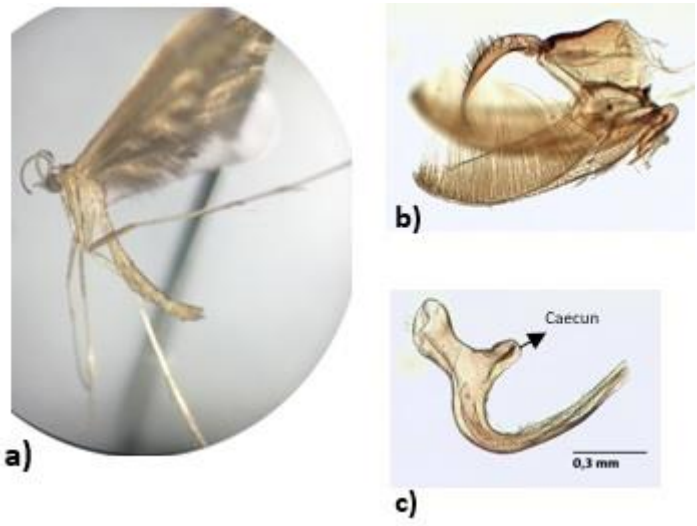

Figura 1-20. **a)** Macho de *L. albistrolatus* y **b)** Genitalia con “phallus” removido y **c)** “phallus”.

Los genitales femeninos de *L. albistriolatus* presentan, antro ligeramente redondeado, ductus bursae bastante corto y bien desarrollado, bursa copulatrix vesicular, con un par de signa en forma de cuerno, lámina postvaginal en forma de maza extendida distalmente y poco esclerotizada, apófisis anteriores ausentes y los posteriores una vez y media a dos veces y media más largas que las papilas anales (Gielis, 2006).

Respecto a los genitales masculinos, las valvas son simétricas y el sáculo se estrecha gradualmente hacia un tercio de la longitud de la valva, tienen un tegumen no lobulado. Uncus robusto. Vinculum ancho, pero bastante corto, juxta amplia y adeago curvo, con un coeco pronunciado (Gielis, 2006).

Algunas de las especies reportadas como hospedantes para *L. albistriolatus* son: *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist; *C. primulifolia* (Lam.) Cuatrec (=C. chilensis Spreng); *C. canadiensis* (L.) Cronquist. (Matthews et al., 2012).

Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en el Neotrópico y se reporta en países como Argentina, Brasil, Chile, Costa Rica, Cuba, Ecuador, Guatemala, México, Paraguay, Perú, Puerto Rico (Gielis, 2006), así como Honduras y Hawái (Matthews et al., 2012). En la región Neártica se presenta en todo el sur de Estados Unidos desde Florida hasta California y se extiende hacia el norte sobre la costa este hasta Maryland (Matthews et al., 2012).

Para Colombia se tiene un reporte de *Mimeseoptilus albistriolatus* Zeller, holotipo de *L. albistriolatus*, cuyo ejemplar fue colectado en Bogotá y es conservado en el Museo Británico de Historia Natural en Londres (Gielis 2006), este sería el primer registro en asocio con *C. bonariensis.*

Asignación del código de barras de ADN para identificación de insectos

En cuanto al apoyo para la identificación de los insectos usando como complemento los datos moleculares, se obtuvo códigos de barras de ADN para un total de 20 muestras. Las secuencias correspondieron como se esperaba al fragmento 5´ del gen *coxl,* con tamaños aproximados de 674 pb. Se obtuvieron 8 secuencias correspondientes a individuos de la familia Pterophoridae, seis secuencias de individuos de la familia Choreutidae, dos secuencias de individuos de la familia Miridae y cuatro secuencias de individuos de la familia Tephritidae. Con base en los alineamientos y análisis de NJ (Figura 1-21), se pudo precisar la presencia de tres especies, -incluyendo una nueva especie en la familia Pterophoridae-, todas en el género *Lioptilodes,* una sola especie en el caso de la familia Coreutidae, una sola

especie en la familia Tephritidae -a pesar de la variación morfológica observada previamente en los adultos- (Figura 1-7 ayb) y una sola especie en la familia Miridae (Tabla 1-5). En cuanto a las tres especies de *Lioptilode*s su separación por datos morfológicos y moleculares es remarcable confirmando la importancia de aproximaciones integrales que incluyan en este caso la observación detallada de estructuras morfológicas como las de la genitalia y las secuencias de ADN gen CoI. Aunque para este género es relativamente poca la disponibilidad de secuencias o códigos de barras de ADN en las bases de datos, se confirma al unir las dos evidencias y con el apoyo del especialista en polillas pluma, doctor Cees Gielis, la presencia de las tres especies (Figura 1-21) -una de las cuales está en proceso de descripción incluyendo ambos tipos de datos-. En este sentido la especie *L. prometopa* se encontró en las localidades de San Cristóbal del municipio de Medellín, la especie *L. albistrolatus* en las localidades del municipio de Rionegro y la *L.* probable especie nueva en las localidades San Cristóbal, Medellín.

Una de las especies esta

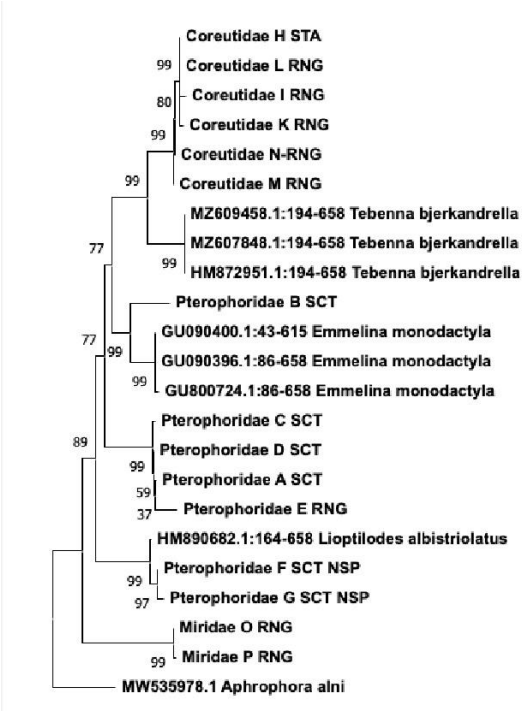

Figura 1-21. Alineamientos y análisis NJ

Tabla 1-5. Identidad de las especies procesadas para la obtención de códigos de barras de ADN y localidad donde fueron encontradas. M1 y M2 son los morfotipos

con variabilidad en coloración observados en la mosca del género *Trupanea* (Tephritidae)

Familia	ID de la muestra	Localidad
Tephritidae	*Trupanea bonariensis M1*	Rionegro, Antioquia
	Trupanea bonariensis M1	Rionegro, Antioquia
	Trupanea bonariensis M2	Rionegro, Antioquia
	Trupanea bonariensis M2	Rionegro, Antioquia
Miridae	*Proba visicuttis*	Rionegro, Antioquia
	Proba visicuttis	Rionegro, Antioquia
Choreutidae	*Caloreas cydrota*	Santa fe de Antioquia, Antioquia
	Caloreas cydrota	Rionegro, Antioquia
	Caloreas cydrota	Rionegro, Antioquia
	Caloreas cydrota	Rionegro, Antioquia
	Caloreas cydrota	Rionegro, Antioquia
	Caloreas cydrota	Rionegro, Antioquia
Pterophoridae	*Lioptilodes sp* (n)	San Cristóbal, Antioquia
	Lioptolodes sp (n)	San Cristóbal, Antioquia
	Lioptilodes albistrolatus	San Cristóbal, Antioquia
	Lioptilodes albistrolatus	San Cristóbal, Antioquia
	Lioptilodes albistrolatus	San Cristóbal, Antioquia
	Lioptilodes albistrolatus	San Cristóbal, Antioquia
	Lioptilodes prometopa	San Cristóbal, Antioquia
	Lioptilodes albistratus	Rionegro, Antioquia

1.5 Discusión

Las actividades de identificación taxonómica del presente estudio se iniciaron para la planta *C. bonariensis* dado que se encontró que esta presenta similitudes morfológicas con otras especies del mismo género y que pueden encontrarse en el mismo habitad; por lo cual y considerando la verificación de la identidad de la especie de interés se precisaron los aspectos particulares que permiten su diferenciación y se usaron dos espaciadores de la región ITS (ADN nuclear) para su identificación. En investigaciones como esta y en la implementación de programas de control de arvenses se considera fundamental una adecuada identificación de la especie de interés de la cual depende la asociación correspondiente con enemigos naturales de uso potencial en programas de control biológico, así como el éxito de los mismos relacionado con el alcance de la especie a controlar (González & López, 2007).

La identificación taxonómica de las especies de insectos encontradas con base en caracteres morfológicas presentó cierto grado de dificultad, lo que se relaciona con el hecho de que muchas de ellas pertenecen a grupos que son parcialmente conocidos para el país, hacen parte de grupos no muy estudiados a nivel local y existen pocos especialistas, en particular para los géneros encontrados; por lo cual, el apoyo con los datos moleculares y en particular con la secuencia código de barras de ADN, fue significativo, al menos en lo que respecta a la separación de unidades taxonómicas diagnosticables y a la verificación de grupos (familias) o especies por comparación y análisis mediante N.J.

Entre los grupos encontrados asociados a la planta de interés se encuentra el orden Lepidoptera con cinco especies, una de las cuales se encontró de forma poco frecuente (Gracillariidae) y no se dispuso de ejemplares necesarios para el procesamiento e identificación taxonómica que para estas familias generalmente requiere la disección y observación detallada de la genitalia femenina y masculina. La mayoría de las micropolillas se encontraron haciendo minas y galerías en *C. bonariensis* y el daño que realizan en la planta pudo ser claramente evidenciado, con observaciones detallados en los estados inmaduros en la mayoría de ellos.

Entre los hallazgos más interesantes en lepidóptera está el de las tres especies de Pterophoridae, familia con base en la cual, se conocen casos exitosos de control biológico de malezas (Balonotes, 1992). Los Pterophoridae son parte de la superfamilia Pterophoroidea en la cual más de 1,000 especies se han descrito en el mundo alimentándose de angiospermas vivas y se considera que existen muchas especies tropicales no descritas, dada la dificultad de llegar hasta el nivel de especie (Gielis, 2006).

En el presente estudio las especies pertenecen al género *Lioptilodes* una de las cuales, en efecto, se considera nueva especie y está en proceso de descripción. El daño causado y la frecuencia de aparición de las tres especies en campo fue significativo y su hallazgo es relevante considerando que este grupo no se encontró atacando otras asteráceas presentes en las áreas de muestreo, lo cual puede ser importante desde la perspectiva de su uso potencial como control biológico, aspecto que se escapa al alcance del presente estudio y que precisa de observaciones detalladas y realización de pruebas de especificidad.

Aunque la mayoría de los estudios y registros de esta familia aparecen para Estados Unidos, algunos trabajos de revisión taxonómica han sido realizados en Argentina y Chile (Gielis 1982, Vargas y Parra, 2005). En relación con la fitofagia de Pterophridae den *C. bonariensis,* aparecen pocos registros y ningún estudio sobre el daño o estados inmaduros (Gielis, 2006). Para Colombia los estudios de esta familia en asocio con Asteraceas son pocos (Gielis, 2006).

En cuanto al microlepidóptero del género *Calorea,* (Lepidoptera: Choreutidae), Barlotto, Silva y Bueno (2015), hicieron el primer reporte en Brasil de la misma especie del presente estudio: *Caloreas cydrota* asociado con *C. bonariensis.* Para Colombia, Meyrick (1915) registró por primera vez esta especie y realizó una breve descripción de un ejemplar colectado en la Cumbre, Valle del Cauca. En 1972, Jesús Botina de la Universidad de Nariño reportó el mismo microlepidóptero asociado a *C. bonariensis* en su trabajo denominado "Reconocimiento e identificación de un insecto en el control biológico de la Yaguacha *Conyza bonariensis* (L.) Cronq. (Campanulales, Compositae) en el altiplano de Pasto ", el cual fue identificado por W.D. Duckworth, como del género *Choreutis* sp. Además, Suarez, Gil, Benavides, Carrero & Sánchez (2018), en estudio de plantas hospedantes de *Puto barberi* (Hemiptera: Putoidae), uno de los insectos más limitantes en el establecimiento de cafetales en Norte de Santander, reportan *a C. bonariensis* como hospedante alterno de este insecto. A la

fecha se desconoce otras publicaciones respecto a este insecto que, con base en su presencia en el país y los registros particulares en asocio con la planta de interés en el presente estudio, constituyen también uno de los hallazgos importantes, razón por la cual se estudió bajo condiciones de laboratorio.

En cuanto a la familia Tephritidae FUEDEI (2021), en el “Catálogo de insectos fitófagos de la Argentina y sus plantas asociadas” que compila asociaciones insecto-planta desde el año 1861 hasta el 2004, reportó la especie *T. bonariensis* (Brèthes), del orden Diptera familia Tephritidae, asociada a *C. bonariensis.* El registro de esta especie en asocio con la planta de interés es nuevo en este proyecto desarrollado con Australia para Colombia y constituye también un hallazgo relevante en relación con su posible uso como agente potencial de control biológico de *C. bonariensis* como ha sido aprobado para otros miembros de la familia, como es el caso de *Procecidochares utiles* y *Urophora solstitialis* (Hernández-Ortiz et al., 2020).

2. CAPÍTULO 2. Observaciones biológicas de *Caloreas cydrota*

2.1 Introducción

El control biológico clásico (CBC), es la regulación natural de las poblaciones de insectos o plantas que sobrepasan el umbral poblacional y que por lo tanto hay que entrar a regular, ya que muchos casos estas poblaciones son especies no nativas, que forman poblaciones autosuficientes después de su introducción en un área fuera de su rango de distribución endémico; en consecuencia, no cuentan con enemigos naturales específicos propios de su origen que regulen sus poblaciones, lo que permite además su fácil dispersión (Schwarzländer et al., 2018).

El CBC consiste en encontrar enemigos naturales co-evolucionados y específicos del hospedador (agente de control biológico), en el rango nativo de la arvense y reunirlo con la planta invasora en el rango introducido; el objetivo, es que los agentes de control biológico introducidos se establezcan en su nuevo hábitat y puedan tener un nicho, con una perfomamcia reproductiva abundante, a niveles que permitan la regulación de la población de las arvenses, permitiendo la instalación permanente de dichos enemigos naturales (Schwarzländer et al., 2018), en este sentido el estudio detallado del daño causado, como el mismo estudio de los enemigos naturales, en este caso insectos, bajo condiciones de laboratorio, es fundamental para conocer aspectos particulares del insecto y evaluar su uso potencial en relación poblacional con las características y criterios que debería cumplir un buen agente de control biológico (Araiza & Salazar-Solís, 2003).

La histórica del CBC se remonta a unos 182 años atrás, cuando la cochinilla *Dactylopius ceylonicus* (verde), originaria de América fue llevada por error de Brasil a la India en 1795 para la producción de tintes, y de la India a Sri Lanka en 1865 para controlar *Opuntia monacantha* (Willd.) Haw. (Cactaceae) (Goeden, 1988).

Según Egil y Olckers (2017), unas 108 especies de insectos, de cinco órdenes y 23 familias, se han usado para controlar 38 taxones de arvenses, principalmente en los EE. UU, Canadá, Australia y Nueva Zelanda, siendo los órdenes más destacados: Coleoptera (principalmente Curculionidae y Chrysomelidae), Diptera (Tephritidae) y Lepidoptera (Tortricidae). A pesar del alto éxito de establecimiento (73% de las experiencias en todos los países), solo el 37% de las versiones exitosas lograron un impacto significativo siendo los insectos que se alimentan de raíces y tallos los mejores candidatos. No obstante, sigue siendo importante evaluar la actividad que

podría derivarse de insectos que se alimentan de otras partes de la planta como hojas y flores (Schwarzländer et al. 2018).

En el catálogo mundial de agentes de control biológico y sus malezas objetivo", actualizado hasta el año 2012, se concentran datos sobre 1555 liberaciones intencionales de 468 especies de agentes de control biológico utilizadas contra 175 especies de arvenses objetivos, en 48 familias de plantas, en 90 países (Schwarzländer, Hinz, Winston y Day 2018).

Algunos ejemplos de insectos utilizados como controladores biológicos de plantas de la familia Asteraceae son microlepidopteros de la familia Tortricidae como *Epiblema strenuana* y *Dichrorampha odorata* Brown & Zachariades utilizadas para el control de *Chromolaena odorata* (L.) RM King & H. Rob. (Zachariades et al., 2011). También se han señalado como de uso potencial especies de la familia Choreutidae como *Caloreas cydrota.*

No obstante, la cantidad de registros de presencia de insectos fitófagos con potencial como biocontroladores, además de su registro y descripción, muchas veces parcial del daño, sigue habiendo un desconocimiento sobre la biología, comportamiento y ciclo de vida, como elementos fundamentales del uso de insectos como agentes de biocontrol.

Teniendo en cuenta las características del daño y la frecuencia con la que se encontró en campo *C. cydrota*, además del hábito alimenticio de los inmaduros y el número de individuos encontrados por planta, se seleccionó esta especie para realizar observaciones biológicas en general, bajo condiciones de laboratorio. Para esto se seleccionó uno de los sitios de muestreo que presentó mayor abundancia y frecuencia del insecto, se recolectaron inmaduros de campo los cuales se llevaron al laboratorio para iniciar la cría bajo condiciones controladas y documentar las características de los estados inmaduros, precisar el daño y los estados mayormente activos y responsables del mismo y estimar los tiempos de duración de los diferentes estados biológicos (huevo, pupa, larva y longevidad de adulto). Como es debido dentro de todo ciclo biológico se tuvieron en cuenta las observaciones etológicas. Todos estos aspectos fundamentales para evaluar el potencial de una especie como controlador biológico.

2.2 Materiales y Métodos

Los muestreos para la obtención de inmaduros de *C. cydrota*, se realizaron en la subregión oriente del departamento de Antioquia, en el Centro de Investigación la Selva de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia), ubicado en el municipio de Rionegro a 2150 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.) y con una zona de vida bosque húmedo montano bajo. (bh-MB). Esta localidad fue seleccionada por la alta presencia de *C. bonariensis* en lotes dedicados a la investigación, barbecho, y otros dedicados a la conservación *ex situ* de especies pertenecientes a los Bancos de Germoplasma de la Nación Colombiana.

Las observaciones biológicas se llevaron a cabo en el laboratorio de plagas cuarentenarias del Centro de Investigación La Selva de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - AGROSAVIA, bajo condiciones de temperatura de 20,7 ± 2°C y una humedad relativa de 69 ± 6%.

Para la obtención de inmaduros, se recolectaron ápices de plantas con presencia de enrollamiento de hojas, síntoma típico de afectación por el insecto en campo, que fueron almacenados en nevera de poliestireno para ser transportadas al laboratorio; allí cada ápice fue separado en recipientes de vidrio y tapa de tul. Los tallos de los ápices fueron envueltos en algodón y humedecidos periódicamente para evitar su desecación (Figura 2.1). Se evitó perturbar el refugio hasta la obtención de adultos.

Figura 2.1. Ápices de los tallos dispuestos en recipientes.

- **Obtención de adultos parentales**

Una vez que los adultos emergieron, se recolectaron y trasladaron a una caja de madera forrada en tela de tul con tapa de las siguientes dimensiones; 40 cm de largo x 34 cm alto x 34 cm de ancho, donde fueron alimentados con una solución de miel al 10%, proporcionada por capilaridad por medio de una mota de algodón sobre un recipiente plástico (Figura 2.2), reportada para la cría de *Stenoma catenifer* Walsingham, (Lepidoptera: *Elachistidae*) (Nava et al., 2005), perforador del fruto del aguacate.

Figura 2.2. Cajas usadas para la cría y observaciones biológicas.

- **Obtención de material vegetal para infestación**

La fácil dispersión y germinación de las semillas de esta especie en el área de estudio, permitió la obtención de plantas provenientes directamente de campo, las cuales fueron seleccionadas teniendo en cuenta su apariencia vigorosa, y una altura promedio de 10 a 15 cm (Figura 2.3-a). Las plantas fueron trasplantadas en macetas de plástico de 14 cm de diámetro por 12 cm de profundidad con todo y suelo evitando perturbar la raíz (Figura 2.3-b). Una vez trasplantadas, fueron adaptadas a condiciones de invernadero durante un tiempo aproximado de 14 días durante el cual estuvieron en una especie de cuarentena revisándolas una vez al día para estar seguros de que no tuvieran presencia de ningún insecto, no exhibieran síntomas de daño alguno causado por insectos e incluso evaluar presencia de patógenos o cualquier afección que pudiera impactar las observaciones (Figura 2.3-c).

Figura 2.3. a) *C. bonariensis* en campo; **b)** Plantas en macetas y **c)** plantas bajo observación.

- **Infestación**

Debido al pequeño tamaño que presentan los adultos de *C. cydrota*, y su fragilidad para ser manipulados, se consideró no sexar los insectos que participarían en las infestaciones. En total se realizaron 25 infestaciones. Cada infestación se realizó en una planta previamente adaptada y revisada con 20 polillas adultas, las cuales fueron liberadas dentro de la jaula de madera y alimentadas con una solución de agua y miel.

2.3 Resultados

- **Observaciones biológicas**

Las observaciones y toma de datos se realizaron de manera periódica durante los tres primeros días después de la infestación, con un intervalo de tiempo de 3 horas, luego, se realizaron dos observaciones por día, durante los tres días siguientes. Se registró aspectos biológicos y comportamiento de oviposición y alimentación.

Pasados los siete días después de la liberación de los adultos dentro de la jaula de madera, la planta era retirada para posteriormente determinar si fue o no infestada. Las plantas que fueron positivas en la infestación se reconocieron por la presencia de seda producida por las larvas neonatas sobre las hojas cercanas al ápice (Figura 2.4).

Figura 2.4. Evidencia de los primeros síntomas en las hojas.

Con el propósito de realizar el seguimiento a las posturas se realizaron muestreos de algunas de las plantas donde se observó adultos posados sobre el ápice realizando posibles oviposiciones; las hojas fueron revisadas bajo estereoscopio para evaluar la presencia de posturas y aquellas con huevos fueron dispuestas en frascos de 50ml con tapa de tul y en el fondo papel toalla humedecido con agua estéril para garantizar la turgencia de la hoja hasta registrar la temporalidad del estado de huevo (Figura 2.5a).

Las larvas que emergieron fueron dejadas sobre el mismo recipiente y alimentadas con brotes tiernos de ápices de plantas. Su seguimiento permitió registrar otros aspectos de interés como la duración del estado larval, el estado de pupa, obtención de adultos y su longevidad.

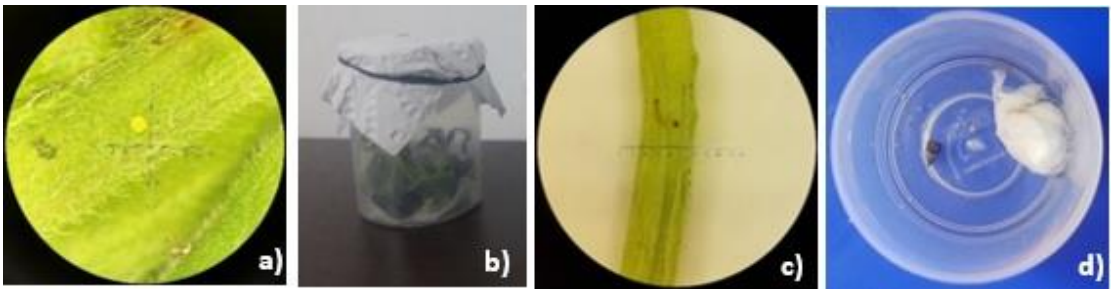

Figura 2.5. a) Observación de huevo de *C. cydrota* bajo estereoscopio; **b)** recipiente con hojas que presentaban daño por *C. cydrota*; **c)** observación de larva de *C. cydrota* bajo estereoscopio y **d)** Adulto de *C. cydrota* emergido.

En la tabla 2.1. se reporta la duración en días para cada uno de los estados biológicos de *C. cydrota.* Con base en las observaciones biológicas, el tiempo del ciclo completo de esta especie fue de 48,9 ± 4 días (n = 11).

Tabla 2.1. Duración de los estados biológicos bajo condiciones de laboratorio.

Individuo	Huevo (días)	Larva (días)	Pupa (días)	Longevidad adultos (días)	Total (días)
1	9	16	6	16	47
2	8	15	12	12	47
3	9	18	14	15	56
4	6	18	7	15	46
5	7	19	8	10	44
6	5	20	7	18	50
7	5	16	8	17	46
8	9	15	12	17	53
9	5	14	10	15	44
10	6	15	12	20	53
11	6	18	6	22	52
12	-	21*	10	18	-
13	-	16*	7	17	-
14	-	17*	5	15	-
15	-	14*	12	14	-
16	-	15*	8	22	-
17	-	20*	5	20	-
18	-	19*	9	18	-
19	-	22*	11	18	-
20	-	15*	7	16	-
21	-	14*	5	-	-
22	-	16*	6	-	-
23	-	17*	-	-	-
24	-	15*	-	-	-
25	-	15*	-	-	-
Promedio	6,8	16,8	8,5	16,8	48,9
Des. Estándar	1,7	2,3	2,7	3,0	4,1

* Datos registrados a partir de la observación de larvas neonata recién emergidas, para las cuales no fue posible registrar la duración del estado de huevo.

- **Oviposición**

Los insectos adultos de *C. cydrota* en laboratorio, fueron vistos posados sobre las hojas apicales buscando ovipocitar (Figura 2.6), por lo general prefieren hacerlo sobre las hojas más próximas a la parte apical de la planta. En condiciones de campo la

preferencia para las oviposiciones, teniendo en cuenta la altura de las plantas afectadas, son generalmente plantas jóvenes de una altura promedio de 38 cm.

Figura 2.6. Evidencia adultos posados en el ápice de la planta.

Debido al pequeño tamaño de los huevos, estos son muy difíciles de observar a simple vista, sin embargo, observaciones bajo estereoscopio permitieron evidenciar posturas sobre el haz de las hojas más jóvenes próximas al ápice y de forma individual. Estos son de color blanco al inicio de la postura y se van tornando a un color amarillento durante su desarrollo, miden alrededor de 0,3 a 0,4 mm de diámetro (figura 2.7). El tiempo registrado para el estado de huevo fue de 6,8 ± 2 días (n = 11) (Tabla 2.2)

Figura 2.7. Evidencia de huevo de *C. cydrota* en hojas.

Tabla 2.2. Días transcurridos entre una posible oviposición y la aparición del síntoma en la planta.

Lecturas de infestaciones positiva	Duración en días hasta la aparición del síntoma (larva neonata < 0,5 mm)
1	5
2	6
3	8

4	5
5	7
6	5
7	8
8	9
9	6
10	8
11	7
12	9
13	5
14	6
15	12
16	8
17	8
18	7
19	7
20	6
21	6
22	9
23	8
24	5
25	11
26	9
27	7
28	7
29	5
30	8
Promedio	7,2
Des. Estándar	1,8

- **Observación y seguimiento de larvas**

Una vez que las larvas neonatas emergen, comienzan a alimentarse de los brotes tiernos del ápice de la planta y construyen un entretejido de seda bajo la cual se protegen. Son de color amarillo y miden aproximadamente entre 0,6 a 1 mm de largo (Figura 2.8).

Figura 2.8. Larva neonata observada bajo estereoscopio con un aumento de 40X.

Las larvas son eruciformes, con una cabeza y aparato bucal masticador bien diferenciados, su cuerpo está conformado por 13 urómeros, con tres pares de patas verdaderas en los urómeros 1, 2 y 3 respectivamente, y 5 pares de pseudopatas, cuatro pares en los urómeros 6, 7, 8, 9 y un par en el urómero 13 (Figura 2.9). El color de la larva varía durante su desarrollo, pasando de un color amarillento a un amarillo verdoso (Figura 2.9) con puntos color marrón. Puede llegar a medir entre 9 y 10 mm de longitud y 1,2 mm de diámetro antes de empupar. El tiempo registrado para el estado de larva fue de 16,8 ± 2 días (n=25) (Tabla 2.3).

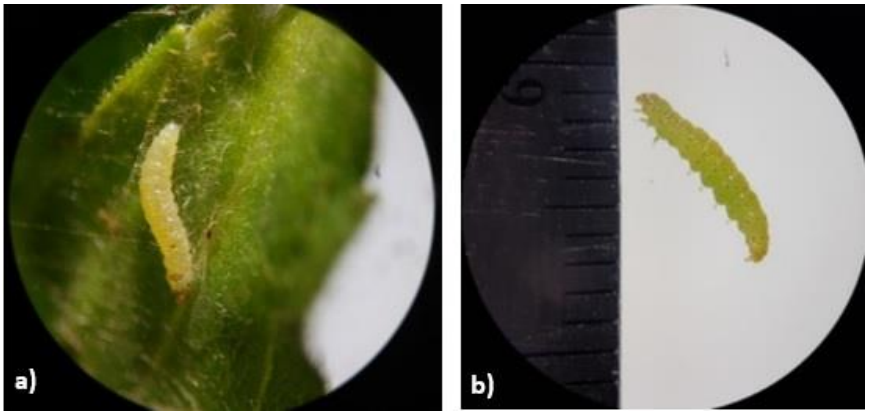

Figura 2.9. Larvas de *C. cydrota*. **a)** Larva de 6 días color amarillo (Observación bajo estereoscopio a 16X) **b)** Larva de 16 días de color amarillo verdoso (Obs.20X).

- **Observación y seguimiento de pupas**

Igual que las larvas, la pupa se desarrolla dentro del refugio y se encuentra envuelta en un capullo de seda que a su vez está protegido por un entretejido que la misma larva fabrica en su último instar larval, mide 15 cm de diámetro y esta adherido sobre el haz de la hoja provocando un enrollamiento en esa parte de la lámina (Figura 2.10).

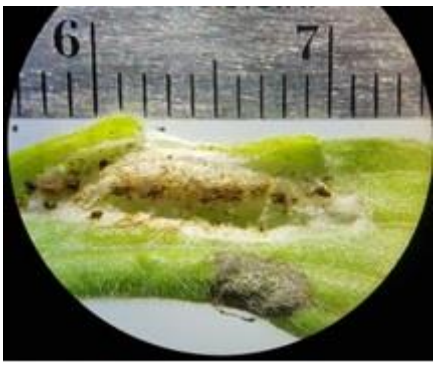

Figura 2.10. Formación de pupa vista bajo estereoscopio a 20X.

El saco de seda que envuelve la pupa en el inicio de la pupación es de color blanco y mide 13 mm de largo y 2,7 mm de ancho y su prepupa presenta un color amarillo verdoso (Figura 2.11). A medida que la pupa se desarrolla, el saco de seda se recoge y la pupa cambia a un color café claro con amarillo ámbar (Figura 2.11), para luego tornarse café oscuro antes de emerger el adulto. Sus dimensiones son 5,7 mm de largo por 1,2 mm de ancho. El tiempo registrado para el estado de pupa fue de 8,5 ± 3 días (n =22).

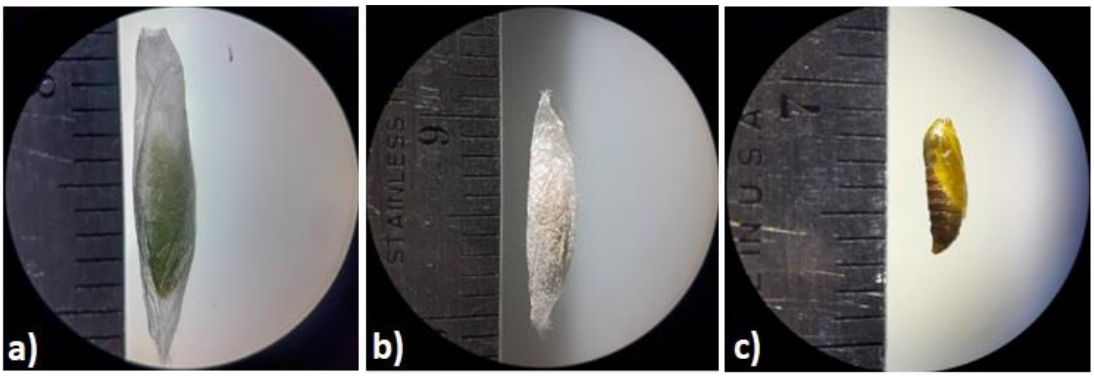

Figura 2.11. Pupas. **a).** Prepupa recién formada en saco de seda; **b).** Pupa de 6 días en saco de seda y **c).** Pupa de 6 días.

- **Observación y seguimiento de los adultos**

Figura 2.12. Adultos de *C. cydrota* obtenidos bajo condiciones de laboratorio.

Los adultos presentan una coloración café oscuro, con áreas brillantes conformado por escamas de color café claro, amarillo y blanco metálico, observándose como franjas que se alternan con el color café oscuro en la parte basal de las alas anteriores, en la zona posbasal las franjas de color café se tornan más oscuras, alternadas con

las franjas de escamas brillantes metálicas que se van estrechando, formando una V invertida que se diferencia de las formas y colores de la parte basal.

Luego, cerca de la zona discal siguiendo la forma de V invertida, se observa una franja formada por escamas de color café claro, amarillo y blanco metálico brillante y debajo de esta se observa otra franja de color plateado brillante alternado con manchas de color café.

En la parte posdiscal y cerca al vértice de la V invertida que se forma, se observa dos ocelos, en cada una de las alas anteriores, uno de estos esta próximo al margen interno y el otro cercano a la zona subapical del ala, los ocelos tienen escamas de color blanco en su interior, rodeado de escamas color negro y luego por escamas de color café claro. También se puede observar pequeñas manchas de escamas azules metálicas brillantes alternadas con manchas de color café oscuro metálico, otras de color amarillo metálico y blanco metálico.

La envergadura alar tiene un promedio de 10, 8 y 12, 5 mm de longitud y su cuerpo mide entre 4,2 a 4,8 mm en promedio, medidos desde la cabeza hasta la parte final del abdomen. Las antenas son filiformes con escamas de color blanco intercaladas con escamas de color café oscuro a negro y miden alrededor de 2,5 a 3,2 mm de longitud. La longevidad registrada para los adultos fue de 16,8 ± 3 días (n =11).

2.4 Discusión

Conocer el ciclo biológico de los enemigos naturales usados en programas de manejo o control biológico de arvenses es de suma importancia, siendo crítico en las etapas previas a la introducción y los períodos de cuarentena de agentes importados. En este sentido, muchos investigadores plantean la relevancia de que las especies de insectos benéficos que se introducen desde sus centros de origen como agentes de control biológico de malezas, se reproduzcan bajo condiciones cuarentenarias, por lo cual es indispensable conocer y estandarizar las metodologías de cría y precisar la duración de sus estados biológicos (Araiza & Salazar-Solís, 2003).

En el presente trabajo se dispuso de un sistema sencillo de cría en jaulas que permitió conocer algunos detalles del desarrollo del insecto desde huevo hasta adulto y describir los estados biológicos (huevo, larva y pupa), siendo este último aspecto de considerable importancia, ya que se estima que períodos largos de duración de las larvas son deseables cuando son estas las que ocasionan el daño y son voraces consumidoras de la planta que se desea controlar. Es importante también ser riguroso con todos los aspectos ecológicos y etológicos del insecto, pues si esto no se hace, dichos ciclos de vida son incompletos, limitándose a contar solo, número de días, que dura cada estado, lo que limita el conocimiento de las relaciones planta- insecto, lo que haría perder el importante factor de la coincidencia, concepto primordial en un proceso de control biológico.

Para *C.cydrota* las observaciones realizadas aquí representan algunas de las pocas disponibles en la literatura para esta especie. En general se encuentran pocos estudios sobre historias de vida y biología de inmaduros de estas pequeñas polillas con excepción de trabajos como el de Sidhu et *al.,* (2012) quien estudió algunos detalles del ciclo de vida a de *Brenthia luminifera* de la misma familia.

En *C. cydrota* se encontró que los huevos son puestos de forma individual, similar a los que ocurre en insectos fitófagos del orden lepidoptera usados en control de malezas, lo cual según estudios realizados por Capuccino (2000), no necesariamente representa una desventaja para el éxito de la introducción de los mismos.

El tiempo de duración en el estado lavar fue 16,8 ± 2 días similar al encontrado para la larva de *B. luminifera* y para *Tortryra cuprinella* en moraceae (Kaur *et al.,* 2012; Carmona,

2019), de la misma forma se encontraron cuatro instar larvales que se alimentaron de los brotes tiernos del ápice de la planta.

Resultados similares con micropolillas acuáticas fueron reportados para *Cataclysta lemnata* (Crambidae) estudiadas bajo condiciones de laboratorio por su uso potencial en el control biológico de arvenses de la familia Araceae (Mariani *et al.,* 2021).

La duración completa del ciclo de *C. cydrota* fue de 48,9 ± 4 días, lo cual a primera vista podría considerarse un tiempo largo ya que uno de los atributos que se busca en un biocontrolador es una alta tasa de incremento generalmente relacionada con ciclos de vida cortos, que aumentan la tasa de incremento, siempre y cuando la tasa de reproducción también sea alta (Araiza & Salazar-Solís, 2003).

Por su tamaño muy pequeño (entre 4,2 a 4,8 mm) y las características de las larvas relacionadas con el daño (entretejido de seda donde se esconden), se considera importante avanzar en estudios específicos que permitan precisar algunos aspectos como la duración presumida de cuatro instar larvales, la estimación del daño y el consumo foliar y en el caso del adulto aspectos como la copula, la fecundidad y otros relacionados con la proporción de sexos y la reproducción, todos estos aspectos son importantes si se considera la posibilidad de una cría masiva para uso como control biológico (Araiza & Salazar-Solís, 2003).

Aragón et al. (2005) menciona que conocer el ciclo de vida que tienen los insectos, permite comprender los diferentes nichos ecológicos de los mismos, debido a esto, el conocimiento de las características biológicas es importantes a considerar en el desarrollo de métodos de control, por lo cual, continuar con la realización de estos experimentos y observaciones biológicas donde están incluidas las ecológicas y etológicas es fundamental para establecer bases que permitan avanzar en la búsqueda de programas de control biológico.

2.5 Conclusiones

Con los resultados obtenidos en esta investigación se contribuye al aumento de los registros y del conocimiento de las familias de insectos Tephritidae, Choreutidae, Gracillariidae, Pterophoridae, Membracidae y Miridae, asociados C. bonariensis en el país.

En cuanto al apoyo para la identificación de los insectos usando como complemento los datos moleculares, se pudo precisar la presencia de tres especies, -incluyendo una nueva especie en la familia Pterophoridae-, todas en el género Lioptilodes, una sola especie en el caso de la familia Coreutidae, una sola especie en la familia Tephritidae y una sola especie en la familia Miridae.

Con base en las observaciones registradas en campo y la literatura disponible, se infiere que las especies identificadas como *T. bonariensis*, *C. cydrota*, y el complejo de Pterophoridos; *L. albistriolatus, L. promotopa y L.* posible especie nueva, y la cual esta en proceso de descripción, pueden ser considerados en posteriores estudios como candidatos potenciales para el control biológico. El daño causado y la frecuencia de aparición de estas especies en campo fue significativo y su hallazgo es relevante, considerando que este grupo no se encontró atacando otras asteráceas presentes en las áreas de muestreo.

En Colombia actualmente no existen reportes en la literatura sobre la presencia de *T. bonariensis* en asocio con C. bonariensis, siendo un hallazgo nuevo en este proyecto desarrollado con Australia para Colombia y constituye también un descubrimiento relevante en relación con su posible uso como agente potencial de control biológico de *C. bonariensis* como ha sido aprobado para otros miembros de la misma familia, como es el caso de *Procecidochares utiles* y *Urophora solstitialis.*

Según observaciones de campo y reportes en literatura, las especies Proba vittiscutis, Enchenopa squamigera y Bolbonota pictipennis, todos hemípteros, han sido reportadas en otras especies de plantas, por lo cual se las considera polífagas, excluyéndolas de posibles insectos potenciales para control biológico.

Se resalta la importancia de continuar estudiando la familia Gracillariidae, puesto que estos minadores de hojas ocasionan un daño importante en plantas de C. bonariensis. Sin

embargo, debido a su poca frecuencia no fue posible precisar su identidad, por lo cual se requiere la disección y observación detallada de la genitalia femenina y masculina.

Finalmente, teniendo en cuenta las características del daño y la frecuencia con la que se encontró en campo *C. cydrota*, además del hábito alimenticio de los inmaduros y el número de individuos encontrados por planta, se seleccionó esta especie para realizar observaciones biológicas en general, bajo condiciones de laboratorio, constituyéndose en el primer reporte del ciclo biológico de esta especie para el país, la cual es de suma importancia en posteriores estudios de control biológico clásico.

2.6 Bibliografía

Agostini, L. P., Dettogni, R. S., Dos Reis, R. S., Stur, E., Dos Santos, E.V.W., Ventorim, D. P., Garcia, F. M., Cardoso, R. C., Graceli, J. B., Louro, L. D. (2020). Effects of glyphosate exposure on human health: Insights from epidemiological and in vitro studies, Science of The Total Environment, Volume 705, 2020, 135808, ISSN 0048-9697, https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135808.

Alpen, K., Gopurenko, D., Wu, H., Lepschi, B. J., & Weston, L. A. (2014). The development of a DNA barcode system for species identification of *Conyza* spp. (fleabane). In *Proceedings of the 19th Australasian Weeds Conference–Science, Community and Food Security: the Weed Challenge* (pp. 401-404).

Altschul, S. F. (2005). BLAST Algorithm. Encyclopedia of Life Sciences, 1–4. https://doi.org/10.1038/npg.els.0005253.

Álvarez, J. M., Menalled, F. & Hoy, M. A. (2005). Las herramientas moleculares en el control biológico.

Andersen, M. (1992). Ananalys is of variability in sedes ettling velocities of several wind- dispersed Asteraceae. Am. J. Bot. 79, 1087–1091. doi: 10.1002/j.15372197.1992.tb13702.x

Aragón G., A., Morón, M. A., López-Olguín, J. F., & Cervantes-Peredo, L. M. (2005). Ciclo de vida y conducta de adultos de cinco especies de Phyllophaga Harris, 1827 (Coleoptera: Melolonthidae; Melolonthinae). *Acta Zoologica Mexicana* (n.s.), 21(2), 87-99.

Araiza, M. D. S., & Salazar-Solís, E. (2003). Importancia del uso adecuado de agentes de control biológico. *Acta Universitaria*, 13(1), 29-35.

Ariza Espinar, L. (2005). Familia Asteraceae: Tribu Astereae. Pródromo de la Flora Fanerogámica de Argentina Central 3: 1-139.

Bortolotto, O. C., Silva, G. V., & Bueno, A. F. (2015). First report of the microlepidopteran *Caloreas cydrota* (Meyrick, 1915) (Lepidoptera: Choreutidae) in Brazil. Brazilian Journal of Biology, 75, 258-258.

Bajwa, A. A., Sadia, S., Ali, H. H., Jabran, K., Peerzada, A. M. & Chauhan, B. S. (2016). Biology and management of two important *Conyza* weeds: a global review. *Environ Sci Pollut.* Res 23, 24694–24710. https://doi.org/10.1007/s11356-016-7794-7

Belin, V. (2003). Nachtfalter der Tschechischen und Slowakischen Republik. Nakladatelstvi, Kabourek, Zlin.

Blanco, Y., & Leyva, Á. (2007). Las arvenses en el agroecosistema y sus beneficios agroecológicos como hospederas de enemigos naturales. *Cultivos Tropicales*, 28(2),21-28. [fecha de Consulta: noviembre de 2021]. Disponible en: https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193217731003

Boletín del Museo Entomológico Francisco Luís Gallego. Volumen 10 Número 4 octubre - diciembre de 2018. ISSN 2027- 4378. Consultado el 9/04/2021. En: https://ciencias.medellin.unal.edu.co/museos/entomologico/images/Boletin/2018-12/VOLUMEN_10_5_octubre-diciembre-de-2018.pdf

Botina. J. J. (1972). Reconocimiento e identificación de un insecto en el control biológico de la yaguacha (*Conyza bonariensis* L.) Cronq. (Campanulales, Compositae) en el altiplano de Pasto.

Bruce, J. A. & Kells, J.J. (1990). Horseweed (*Conyza canadensis*) control in no-tillage soybeans (Glycine max) with preplant and preemergence herbicides. *Weed Technology* 4:642-647.

BugGuide (2021). Identification, Images, & Information For Insects, Spiders & Their Kin Fort he United States & Canada. Consultado: noviembre 2021, en: https://bugguide.net/node/view/1575631/bgimage

Burange, P. S., Roehrdanz, R. L., & Boetel, M. A. (2012). Geographically Based Diversity in Mitochondrial DNA of North American *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). Annals of the Entomological Society of America, 105(6), 917–929. doi:10.1603/an11146

Cabrera, A. L. (1963). Flora de la provincia de Buenos Aires. Tomo 4, parte VI: Compuestas. Colección científica del INTA, Buenos Aires, Argentina.

Cappuccino, N. A. O. M. I. (2000). Oviposition behavior of insects used in the biological control of weeds. In Proceedings of the X international symposium on biological control of weeds (pp. 521-531). Montana State University.

Pardo - Cardona, V. M. (2000). Una nueva especie y un nuevo registro de Uredinales que parasitan a *Conyza bonariensis* en Colombia. Caldasia, 22(1),3-8. https://revistas.unal.edu.co/index.php/cal/article/download/17546/18399

Cleveland, T. C. (1982). Hibernation and Host Plant Sequence Studies of Tarnished Plant Bugs, *Lygus lineolaris*, in the Mississippi Delta. *Environmental Entomology*, 11(5), 1049–1052. doi:10.1093/ee/11.5.1049

Cock, M. J., van Lenteren, J. C., Brodeur, J., Barratt, I. P., Bigler, F., Bolckmans, K. & Parra, J. R. P. (2009). The use and exchange of biological control agents for food and agriculture (No. 47). IOBC.

Cruz, B., Bacca, M. I., Tito. & Canal, N. A. (2017). Diversidad de las moscas de las frutas (Diptera: Tephritidae) y sus parasitoides en siete municipios del departamento de Nariño. Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural, 21(2), 81-98. https://doi.org/10.17151/bccm.2017.21.2.6

CSIRO, (2021). Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation. *Flaxleaf fleabane. biological control*. Online. Consultado el 4 de Abril de 2020. En: https://research.csiro.au/flaxleaf-fleabane/contact/

Csóka, G. (2001). Recent invasions of five species of leafmining lepidoptera in Hungary. Proceedings: Integrated management and dynamics of forest defollating insects. En: USDA *General Technical Reports* http://iufroarchive.boku.ac.at/wu70307/victoria/csoka.pdf. NE-227:31 – 36 consultado: noviembre 2021.

Dalazen, G., Bigolin, M., Valmorbida, I., Stacke, R. F., Cagliari, D. (2017). Faunistic analysis of pest insects and their natural enemies associated with hairy *fleabane* in soybean crop1. *Pesquisa Agropecuária Tropical* [online]. 2017, v. 47, n. 03.

De Prins, J. & De Prins, W. (2014). Global Taxonomic Database of Gracillariidae (Lepidoptera). World Wide Web electronic publication http://www.gracillariidae.net consultado: noviembre 2021.

De Prins, J., Kawahara, A.Y. (2012). Systematics, revisionary taxonomy, and biodiversity of tropical Lithocolletinae (Lepidoptera: Gracillariidae). *Zootaxa*. 3594, 1-283.

DeBach, P., Rosen, D. and Kennett, C. E. (1971). Biological control of coccids by introduced natural enemies. pp. 165-194. In: C.B. Huffaker (ed.), *Biological Control*. Plenum, New York.

Deitz, L. L., Wallace, M. S. (2011). Treehoppers: Aetalionidae, Melizoderidae and Membracidae (Hemiptera). Http://treehoppers.insectmuseum.org Visited on november 2021.

Dietrich, C. H., McKamey, S. H., Deitz, L. L. (2001). Morphology – based phylogenyof the treehopper family Membracidae (Hemiptera: Cicadomorpha: Membracoidea). *Systematic Entomology.* 26: 213-239.

Drummond, A. J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A. et al. (2011) Geneious v5. 4. Available: http://www.Geneious.com. consultado 28 nov 2011.

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. https://doi.org/10.1093/nar/gkh340.

Espinal T., L. S. (1985). Geografía Ecológica del Departamento de Antioquia (Zonas de Vida (Formaciones Vegetales) del Departamento de Antioquia). Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín, 38(1), 5–106. Recuperado a partir de https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/28367

Egli, D., Olckers, T. (2017). Establecimiento e impacto de agentes insectos desplegados para el control biológico de Asteraceae invasoras: perspectivas para el control de *Senecio madagascariensis. BioControl* 62, 681–692. https://doi.org/10.1007/s10526-017-9811-2

Esquivel, J. F., & Mowery, S. V. (2007). Host Plants of the Tarnished Plant Bug (Heteroptera: Miridae) in Central Texas. *Environmental Entomology*, 36(4), 725–730. doi:10.1603/0046-225x(2007)36[725:hpottp]2.0.co;2

FAO. (2004). Sistema global FAO para información y alerta Rápida, sobre alimentación y agricultura. Programa Alimentar Mundial. Roma. 156p.

Flann, C. (ed.) (2016). “GCC: global compositae checklist (version 5 (Beta), Jun 2014,” in Species 2000 and ITIS Catalogue of Life, eds Y. Roskov, L. Abucay, T. Orrell, D. Nicolson, T. Kunze, C. Flann, et al. (Leiden:*Naturalis*).

Flora Argentina. (2017). Plantas vasculares de la República Argentina. Disponible en: www. floraargentina.edu.ar

Florentine, S. K., Raman, A., & Dhileepan, K. (2001). Gall-inducing insects and biological control of *Parthenium hysterophorus* L. (Asteraceae). Plant Protection Quarterly, 16(2), 63-68.

Foote, R. H. y Steyskal. G.C. (1987). Tephritidae. En: J.F. McAlpine et al. (Edrs.). Manual of nearctic Diptera. Research Branch Agriculture of Canada, Canada, v. 2, pp. 817-831. (Monograph, 28).

FUDEI (2021). Cordo, Logarzo, Braun & Di lorio. Catálogo de insectos fitófagos de la Argentina y sus plantas asociadas, consultado el 10 de noviembre. Recuperado de: https://fuedei.org/catalogo-de-insectos/

Funkhouser, W.D. (1951). Homoptera. Family Membracidae. Genera insectorum. 208:1-383.

Gao, T., Yao, H., Song, J., Zhu. Y., Lui, C., & Chen, S. (2010). Evaluation the fearibility of using candidate DNA barcodes in discriminating species of the large Asteraceae family. BMC *Evolutionary Biology*, 10(1), 324.

Gemeinholzer, B., Oberprieler, C. and Bachmann, K. (2006). Using GenBank Data for Plant Identification: Possibilities and Limitations Using the ITS 1 of Asteraceae Species Belonging to the Tribes Lactuceae and Anthemideae. Published By: Wiley. Vol. 55, No. 1., pp. 173-187.

Gielis, C. (2006). Review of the Neotropical species of the family Pterophoridae, part I: Ochyroticinae, Deuterocopinae, Pterophorinae (Platyptiliini, Exelastini, Oxyptilini) (Lepidoptera). *Zoologische Mededelingen* 80-2: 1-290. ISSN 0024-0672

Gielis, C. (2011). Review of the Neotropical species of the family Pterophoridae, part II: Pterophorinae (Oidaematophorini, Pterophorini) (Lepidoptera). *Zoologische Mededelingen*, Leiden 85(10): 589–824.

Gielis, C. (2003). Catálogo mundial de insectos Volumen 4, Pterophoroidea & Alucitoidea (Lepidoptera), Stenstrup (Dinamarca). Apollo Books. 198.

Godoy, C., Miranda, X., Nishida, K. (2006). Membrácidos de la América tropical. Treehoppers of tropical America. 1 ed. Instituto Nacional de Biodiversidad, Santodomingo de Heredia, Costa Rica. 322 p.

Goeden, R.D. (1988). Una cápsula de control biológico de malezas. *Biocontrol News* Inf 9 (2): 55–61.

González Mozo, L. (2014). Sinopsis de Membracidae (Hemiptera: Membracoidea) de Colombia, relacionados con ecosistemas agrícolas. Trabajo de grado – Maestría [en línea] 2014 [Fecha consulta: 19 de noviembre 2021].

González-Hernández, A. y López-Arroyo, J. I. (2007). Importancia de la sistemática en control biológico, pp. 36-47.

Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic acids symposium series. p. 95-98.

Hall, T. (2011). BioEdit: An important software for molecular biology. GERF Bull Biosci 2:60-61.

Heap, I (2021). The International Herbicide-Resistant Weed Database. Online. Monday, November 8, 2021. Available www.weedscience.org

Hebert, P., Cywinska, A., Ball, S., Dewaard, J. (2003). Barcode of Life: Identifying Species with DNA Barcoding Biological identifications through DNA barcodes. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 270:313-321.

Hernández, V & Hernández, M. (2018). Moscas inductoras de tumoraciones en plantas. INECOL, El Instituto de Ecología.

Hernández-Ortiz, V., Hernández-López, M., Steck, G. J. & Montoya. (2020). Morfología y taxonomía de Tephritidae: Especies de importancia económica y cuarentenaria en América. Moscas de la fruta: fundamentos y procedimientos para su manejo. SyG Editores, Mexico, 71-116.

Holm, L. G., Doll, J., Holm, E., Pancho, J & Herberger, J. (1997). World weeds: natural histories and distribution. Toronto: Wiley. p.226-235.

Idárraga P., A. & R. Callejas P. (2011). Análisis florístico de la vegetación del Departamento de Antioquia. pp- 00- 00. En: Idárraga, A., del C, R., Ortiz., Callejas, R. & Merello, M. (eds.). Flora de Antioquia: catálogo de las plantas vasculares. vol. II. Listado de las plantas vasculares del departamento de Antioquia. Programa Expedición Antioquia-2103. Series Biodiversidad y Recursos Naturales. Universidad de Antioquia, Missouri Botanical Garden

& Oficina de planeación departamental de la gobernación de Antioquia, Editorial D'Vinni, Bogotá, Colombia.

Instituto de Ciencias Naturales (2007), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (2004 y actualizado el 14 de febrero de 2007). Colecciones en Línea. Publicado en Internet http://www.biovirtual.unal.edu.co [accesado el 4/04/2019].

Karsholt, O. & Razowski, J. (1996). The Lepidoptera of Europe: A distribunal checklist. Apollo books, Stenstrup.

Kim, S., Byun, B. K., Park, K. T. y Lee, S. (2010). Estudio taxonómico de la tribu Oidaematophorini (Lepidoptera: Pterophoridae) de Corea, con descripciones de las dos nuevas especies. *Revista de Historia Natural*, 44 (23-24), 1377-1399.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111–120. https://doi.org/10.1007/BF01731581.

Korytkwski, Ch. (1986). Reconocimiento de moscas de la fruta y prevención de la mosca del Mediterráneo. Informe Final TCP/COL/4505, FAO.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms*. Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. https://doi.org/10.1093/molbev/msy096.

Kumata, T. (1993). A contribution to the knowledge of the malaysian Lithocolletinae (Gracillariidae, Lepidoptera), with a revision of indian cameraria associated with leguminosae. *Insecta matsumurana*. 48, 1-85.

Lennartsson, T. & Björklund, J. O. (2014). Åtgärdsprogram för hotade insekter på krisslor 2014-2018.

Leyva, A., y Lores, A. (2008). Nuevos índices de agrobiodiversidad (IDA) como herramienta de evaluación de los agroecosistemas. VI Encuentro de Agricultura Orgánica Sostenible. La Habana, Cuba. 72p.

Llewellyn, R. S., Ronning, D., Ouzman, J., Walker, S., Mayfield, A. and Clarke, M. (2016). Impact of Weeds on Australian Grain Production: the cost of weeds to Australian grain growers

and the adoption of weed management and tillage practices Report for GRDC. CSIRO, Australia.

Logarzo, G. & III, L. W. & Carpintero, D. (2005). Plant Bugs (Heteroptera: Miridae) Associated with Roadside Habitats in Argentina and Paraguay: Host Plant, Temporal, and Geographic Range Effects. *Annals of the Entomological Society of America*. 98. 694-702. 10.1603/0013-8746(2005)098[0694:PBHMAW]2.0.CO;2.

Luck, R. F., Tauber, M. J. and Tauber, C. A. (1995). The contributions of biological control to Population and Evolutionary Ecology, pp. 25-45. In: J.R. Nechols (ed.) Biological control in the Western U.S.: Acomplishments and benefits of regional research project W-84. 1964-1989. ANR Publications, Oakland, CA.

Mariani, F., Fattorini, S., Di Giulio, A., & Ceschin, S. (2021). Development and reproduction of *Cataclysta lemnata*, a potential natural enemy of the invasive alien duckweed *Lemna minuta* in Italy. *The European Zoological Journal*, *88*(1), 216-225.

Marochio, C. A., Bevilaqua, M. R. R., Takano, H. K., Mangolim, C. A., Oliveira, R. S. D., & Machado, M. D. F. P. S. (2017). Genetic admixture in species of *Conyza* (Asteraceae) as revealed by microsatellite markers. *Acta Scientiarum. Agronomy*, *39*, 437-445.

Matthews, D. L., Miller, J. Y., Simón, M. J. (2012). Observations of plume moths on North Andros Island, Bahamas, and notes on new records and species previously recorded from the Bahamas (Lepidoptera: Pterophoridae). *Insecta Mundi* 0236: 1-12.

Matzrafi, M., Lazar, T.W., Sibony, M., Rubin, B. (2015*). Conyza* species: distribution and evolution of multiple target-site herbicide resistances. Planta. 2015 Jul;242(1):259-67. doi: 10.1007/s00425-015-2306-4. Epub 2015 Apr 26. PMID: 25912190.

Mckamey, S. H. (1998). Taxonomic catalogue of the Membracoidea (exclusive of leafhoppers): Second supplement to fascicle 1-Membracidae of the General Catalogue of Hemiptera. Mem. Am. *Entomol.* Inst. 60: 1-377

McKay, F., & Gandolfo, D. E. (2001). Description of the irnmature stages of *Trupanea bonariensis* (Diptera: Tephritidae) with notes on its biology. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 60(1-4).

Mead, F.W. (1986). Micrutalis treehoppers and pseudo-curly top in florida. Florida Dept. Agr. Div. *Plant Industry*. Rnt. Circ. No 283, 4p.

Medianero, E., Parra, L. A., Sanchez, L., Aldrey, J. L. (2007). Agallas inducidas por insectos en especies de Artemisia (Asteraceae) en España, con especial referencia a la Comunidad de Madrid. Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa, N° 41.

Mengoni, C; McKay, F; Cabrera, G; Sathyamurthy, R. (sf). Flaxleaf Fleabane Part 3. CSIRO, Brisbane, Australia.

Menza, F. y Salazar, G. (2006). Evaluación de la resistencia al glifosato, de biotipos de *Erigeron bonariensis* provenientes de cafetales de la zona cafetera central colombiana. Cenicafé 57(3):220-231.

Meyer, J. (1987). Plant Galls and Gall Inducers. Gebrüder Borntraeger. Berlin, Stuttgar. 291pp.

Meyrick, E. (1915). Description of South American micro-lepidoptera. The Transaction of the Entomological Society of London, Vol. 63, no 2, pp. 201.256. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2311.1915.tb02527.x

Miller, D. R., and Rossman, A. Y. (1997). Biodiversity and Systematics: Their application to agriculture, pp. 217-229. In: Reaka-Kudia, M. L., Wilson, D. E. and Wilson, E. O. (eds.), "Biodiversity II: Understanding and protecting our biological resources. Joseph Henry Press, Washington, D.C.

Nagy, K., Tessema, R. A., Budnik, L. T., Ádám, B. (2019). Comparative cyto- and genotoxicity assessment of glyphosate and glyphosate-based herbicides in human peripheral white blood cells, Environmental Research, Volume 179, Part B, 2019, 108851, ISSN 0013-9351, https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108851.

Nájar R, A. J., Espitia, M, E., & Arrieta, M. J. (2001). Biology and habits of *Ensina hyalipennis* (Diptera: Tephritidae) and *Homoeosoma oconequensis* (Lepidoptera: Pyralidae), weed phytophagous insects in the Sabana de Bogotá. *Revista Colombiana de Entomologia*, 27(3/4), 159-167.

Natural History Museum. (2021). Base de datos de plantas hospederas de lepidópteros del mundo. (on line). Consultado el 17 de marzo de 2021. Página web: https://www.nhm.ac.uk/

NaturalistaCo. Una comunidad para Naturalista. Pág. web. https://colombia.inaturalist.org/. Consultado el 28 de noviembre de 2021

Nogueira, B. C. F., Coelho, L. A., dos Santos Martins, D., Barcellos, B. D., Sartori, S. R., & Ferreira, P. S. F. (2019). Associações de percevejos mirídeos (Hemiptera: Miridae) com plantas no Brasil. *Biologico*, 81, 1-30. 10.31368/1980-6221v81a10012.

Pruski, J. F. y Sancho, G. (2006). *Conyza sumatrensis* var. leiotheca (Compositae: Asteraceae), una nueva combinación de una maleza neotropical común. Novon: Diario de nomenclatura botánica, 16 (1), 96-101.

Pyke, S. (2020). *Conyza* (Asteraceae): una valoración crítica basada en las poblaciones de Cataluña, España. *Collectanea Botanica* 39: e005 enero-diciembre 2020.

Pyšek, P., Jarosik. V., Hulme, P. E., Pergl, J., Hejda, M., Schaffner, U., Montserrat, V. (2012). Una evaluación global de los impactos de las plantas invasoras en las especies, comunidades y ecosistemas residentes: la interacción de las medidas de impacto, los rasgos de las especies invasoras y el medio ambiente. *Glob Change Biol* 18 (5): 1725-1737.

Qureshi, R. & Raana, S. (2014). *Conyza sumatrensis* (Retz.) E. H. Walker: A new record from Pakistan, Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology: *Official Journal of the Societa Botanica italiana*, 148:5, 1035-1039, DOI: 10.1080/11263504.2013.850119

Rejmánek, M. (2015). Ecology: global trends in plant naturalization. *Nature*. 525:39–40

Richardson, D. M., Allsopp, N., D'Antonio, C. M., Milton, S. J., Rejmánek, M. (2000). Plant invasions—the role of mutualisms. *Biol Rev* 75(1):65–93

Rota, J. (2005). Larval and Pupal Descriptions of the Neotropical Choreutidae Genera Rhobonda Walker y Zodia Heppner (Lepidoptera: Choreutidae), Annals of the Entomological Society of America , Volumen 98, Número 1, 1 de enero de 2005, Páginas 37–47, https: // doi.org/10.1603/0013-8746(2005)098[0037:LAPDOT]2.0.CO;2

Schwarzländer, M., Hinz, H. L., Winston, R. L. & Day, M. D. (2018). Control biológico de malezas: análisis de introducciones, tasas de establecimiento y estimaciones de éxito en todo el mundo. *BioControl* 63, 319–331. https://doi.org/10.1007/s10526-018-9890-8

Shorthouse, J. D. y Rohfritsch, O. (Eds). (1992). Biology of Insect-induced galls. Oxford University Press, New York, Oxford. 285pp.

SIDHU, A. K., KAUR, A., & Rose, H. S. (2012). Life History and Chaetotaxy of Brenthia luminifera Meyrick (Microlepidoptera: Choreutidae: Brenthinae). *Environment and Ecology*, *30*(3B), 1005-1010.

Song, H., Buhay, J. E., Whiting, M. F., & Crandall, K. A. (2008). Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(36), 13486–13491. https://doi.org/10.1073/pnas.0803076105.

Suarez, L., Gil, Z. N., Benavides, M., Carrero, D. A. & Sánchez, R. (2018). Host plants of Toumeyella coffeae and Puto barberi (Hemiptera) in coffe agroecosystems of Norte de Santander, Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 44(2), 172.

Tamura, J. K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. et al. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739.

Thebaud, C. and Abbott, R. J. (1995). Chacterization of Invasive *Conyza* Species (Asteraceae) in Europe: Quantitative Trait and Isozyme Analysis. *American Journal of Botany* 82(3):360-368.

Thebaud, C. y Abbott, R. J. (1995). Caracterización de especies invasoras de *Conyza* (Asteraceae) en Europa: análisis cuantitativo de rasgos e isoenzimas. *Revista estadounidense de botánica*, 82 (3), 360-368.

Van Bruggen, A. H. C., He, M. M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R., Morris, J. G. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate, Science of The Total Environment, Volumes 616–617, 2018, Pages 255-268, ISSN 0048-9697, https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309.

Vera Díaz, F., Castro Arteaga, C., Gutiérrez Mora, X y Vásconez Galarza, G. (2020). “Alternativas agroecológicas para el control y manejo de arvenses en competencia específica con el cultivo de maíz (*Zea mays* L.)”, *Revista Caribeña de Ciencias Sociales* (junio 2020).

Vila. M., Espinar, J. L., Hejda, M., Hulme, P. E., Jarošik, V., Maron, J. L., Pergl, J., Schaffner, U., Sun, Y., Pyšek, P. (2011). Ecological impacts of invasive alien plants: a meta-analysis of their effects on species, *communities and ecosystems*. Ecol Lett 14:702–708.

Wang, A; Wu, H; Zhu, X and Lin, J. (2018). Species Identification of *Conyza bonariensis* Assisted by Chloroplast Genome Sequencing. Front. *Genet.* 9:374. doi: 10.3389/fgene.2018.00374

Weaver, S. E. (2001). The biology of Canadian weeds. 115. *Conyza canadensis*. *Canadian Journal of Plant Science*, 81(4), 867–875. doi:10.4141/p00-196

Wiggins, C. J., Lord, N. P., Raghu, S. y Díaz, R. (2019). Insectos herbívoros y patógenos vegetales asociados con *Conyza bonariensis* (Asterales: Asteraceae) en Louisiana, Texas y Mississippi. En *Entomología*. ESA.

Williams, M., Fitter, A. (1996). The varying success of invaders. *Ecology* 77:1661–1666

Wood, T. K. (1993). Diversity in the New World Membracidae. Annu. Rev. *Entomol.* 38: 409-435.

Wu, H. (2007). The biology of Australian weeds 49. *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist. *Plant Protection Quarterly* 22(4): 122-131.

Wu, H., & Zhu, X. (2014). Who's who in the fleabane (*Conyza* spp.) family? In M. Baker (Ed.), Proceedings of the 19th Australasian Weed Conference (2014): Science, Community and Food Security: the Weed Challenge (pp. 157-160). Tasmanian Weed Society Inc.

Wu, H., Walker, S., Robinson, G. (2010). Control of flaxleaf fleabane (*Conyza bonariensis* L. Cronq.) in wheat and sorghum. *Weed Technol*. 24, 102–107. doi:10.1614/WT-09-043.1

Wu, H., Walker, S., Rollin, M. J., Tan, D. K. Y., Robinson, G., and Werth, J. (2007). Germination, persistence, and emergence of flaxleaf fleabane (*Conyza bonariensis* [L.] Cronquist). *WeedBiol.Manag*. 7,192–199.doi:10.1111/j.14456664.2007.00256.

Yazici, G., Yildirim, E. (2017). Prefered host plants species by Miridae (Hemiptera: Heteroptera) species in Erzurum Province of Turkey. *Entomofauna*, 38: 193-212. 38. 193-212.

Young, O. P. (1986). Host Plants of the Tarnished Plant Bug, *Lygus lineolaris* (Heteroptera: Miridae). Annals of the Entomological Society of America, 79(4), 747–762. doi:10.1093/aesa/79.4.747

Zachariades, C., Strathie, L. W., Retief, E., Dube, N. (2011). Progress towards the biological control of *Chromolaena odorata* (L.) RM King & H. Rob. (Asteraceae) in South Africa. *African Entomology*, 19(1), 282-302.

Zambrano-Navea, C., Bastida, F., Gonzales-Andujar, J. L. (2013). A hydrothermal seedling emergence model for *Conyza bonariensis*. *Weed Research* (Oxford) 53(3): 660-67.