



**Universidad
de La Laguna**

**ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE
INGENIERÍA**

SECCIÓN DE INGENIERÍA AGRARIA

**GRADO EN INGENIERÍA AGRÍCOLA Y DEL
MEDIO RURAL**

**CARACTERIZACIÓN GENÓMICA Y/O MORFOLÓGICA
DE INSECTOS ÚTILES EN EL CONTROL BIOLÓGICO
DE PLANTAS ADVENTICIAS. (TFG)**

Yasmina Hernández Domínguez

La Laguna, septiembre de 2019

CARACTERIZACIÓN GENÓMICA Y/O MORFOLÓGICA DE INSECTOS ÚTILES EN EL
CONTROL BIOLÓGICO DE PLANTAS ADVENTICIAS

ÍNDICE

1	Resumen.....	5
2	Introducción:	7
3	Objetivos del Proyecto:	9
4	Revisión Bibliográfica.....	10
4.1	Concepto de planta adventicia:.....	10
4.2	Características biológicas de las plantas adventicias:	11
4.3	Competencia por el agua, la luz y los nutrientes.	13
4.3.1	Competencia por la Luz.	13
4.3.2	Competencia por el agua.	14
4.3.3	Competencia por los nutrientes.	14
4.3.4	Producción de alelopatías.....	15
4.3.5	Efectos de la competencia.	15
4.4	Clasificación de las plantas adventicias.	16
4.4.1	Clasificación atendiendo a su hábitat.	16
4.4.2	Clasificación atendiendo a su morfología.	17
4.4.3	Clasificación por su ciclo vital.	17
4.5	Concepto de Control Biológico.....	20
4.6	Origen del Control biológico.....	21
4.7	Evolución del control Biológico.	23
4.8	Características del Método de Control Biológico en las plantas adventicias.	25
4.9	Criterios establecidos para los métodos de control biológico en las plantas adventicias. 25	
4.10	Otros métodos biológicos de control de malas hierbas.	26
4.11	Características de los insectos empleados en el control biológico de las plantas adventicias.....	27
4.12	Conceptos generales de los insectos.....	28
4.13	Caracterización genómica de insectos.....	30
4.14	Descripción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	33
5	Materiales y Métodos:.....	36
5.1	Descripción de Especies vegetales e Insectos.	36
5.2	Especies vegetales.	36
5.2.1	<i>Bidens pilosa</i> L. (1753).	36
5.2.2	<i>Conyza sumatrensis</i> L. (1753).....	37

CARACTERIZACIÓN GENÓMICA Y/O MORFOLÓGICA DE INSECTOS ÚTILES EN EL
CONTROL BIOLÓGICO DE PLANTAS ADVENTICIAS

5.2.3	<i>Echium plantagineum</i> L. (1753).....	39
5.2.4	<i>Forsskaolea angustifolia</i> L. (1753).....	40
5.2.5	<i>Gnaphalium luteo-album</i> L. (1753).....	42
5.2.6	<i>Malva parviflora</i> L. (1753).	43
5.2.7	<i>Medicago polymorpha</i> L. (1791).....	45
5.2.8	<i>Parietarias judaica</i> L. (1763).....	46
5.3	Especies de insectos fitófagos	47
5.3.1	<i>Hypera postyca</i> (Gyllenhal 1813).	47
5.3.2	<i>Cosmopterix pulchrimella</i> (Chambers 1875).	50
5.3.3	<i>Dialectica hedemanni</i> (Rebel 1896).....	53
5.3.4	<i>Dialectica sculariella</i> (Zeller 1950).....	55
5.3.5	<i>Vanessa</i> sp.....	57
5.3.6	<i>Nemorimyza maculosa</i> (Malloch,1913)	64
5.4	Ubicación del Estudio.	67
5.5	Identificación de la plaga.	68
5.6	Protocolo de Extracción de ADN.....	69
5.7	Protocolo de Electroforesis.	74
5.8	Ampliación de ADN mediante PCR.	72
5.8.1	Materiales necesarios para realizar la PCR:	72
5.8.2	Preparación pre-PCR.....	72
5.8.3	Proceso de Amplificación.	73
5.9	Protocolo de secuenciación.	76
5.10	Caracterización genómica de los hiperparásitos propuestos del reino animal.	80
5.10.1	Chromas.	80
5.10.2	Clustal Omega.....	80
5.10.3	Blast.....	81
5.10.4	Gen Bank.....	82
6	Resultados y discusiones.....	84
6.1	Análisis Genómico.	84
6.1.1	Resultados de la muestra <i>Hypera postyca</i> (Gyllenhal 1813):	84
6.2	Daños de los fitófagos.	88
7	Conclusiones.	97
8	Agradecimientos.....	98
9	Bibliografía.	99

1 Resumen.

Título: Caracterización genómica y/o morfológica de insectos útiles en el control biológico de plantas adventicias.

Autores: Hernández Domínguez Yasmina, Siverio Núñez Antonio.

Palabras clave: plantas, insectos, control biológico, Barcoding.

Resumen

El proyecto que se pretende desarrollar está basado en el control biológico de plantas adventicias en el término municipal de San Cristóbal de La Laguna. Para poder conocer la capacidad de control que podía ejercer los enemigos naturales escogidos, se realizó un evolucionario/insectario.

Se demostró que existe una capacidad de control biológico de los insectos sobre las plantas adventicias dado que durante el tiempo de cultivo estos devoraron de manera incesante las plantas que se les colocaban como alimento. En campo también se observó esta capacidad de realizar un control biológico, observando se a la hora de la recogida de las especies vegetales.

También se utilizó una técnica de reconocimiento del ADN de un determinado insecto. Denominado análisis genómico, que permite conocer el nombre de dicho insecto.

Con los resultados obtenidos se puede establecer que el control biológico es una forma de control de plantas adventicias viable, con bajo costo de aplicación ya que, en este caso, se emplean enemigos naturales que se encuentran en el medio donde se localizan las adventicias. Además, pueden ser utilizados fácilmente por todos los agricultores.

En otros casos es suficiente con realizar una suelta de los enemigos biológicos que se pueden adquirir en el mercado.

Abstract

Title: Genomic and / or morphological characterization of insects useful in the biological control of adventitious plants.

Authors: Hernández Dominguez Yasmina, Siverio Núñez Antonio.

Keywords: plants, insects, biological control, Barcoding,

Abstract.

The project to be developed is based on the biological control of adventitious plants in the municipality of San Cristóbal de La Laguna. In order to know the control capacity that the chosen natural enemies could exercise, an evolutionary / insectarian was carried out.

It was shown that there is a capacity for biological control of insects on adventitious plants since during the cultivation time they devoured incessantly the plants that were placed as food. In the field, this ability to carry out a biological control was also observed, observing when collecting the plant species.

A DNA recognition technique of a certain insect was also used. Named genomic analysis, which allows to know the name of said insect.

With the results obtained, it can be established that biological control is a viable form of control of adventitious plants, with low application cost since, in this case, natural enemies are used that are located in the environment where the adventitious ones are located. In addition, they can be easily used by all farmers.

In other cases it is enough to make a release of the biological enemies that can be acquired in the market.

2 Introducción:

Las plantas adventicias se podrían definir como aquellas plantas que se ubican en lugares no deseados y que, en su defecto, no representan un beneficio (Fernández and Alii, 1993). Por lo general, son plantas que crecen en medio de los cultivos, en los bordes de las calzadas y aceras principalmente. Representando un problema en la agricultura porque compiten por la luz, los nutrientes y el agua con las plantas que consideramos beneficiosas desde un punto de vista económico (Gascón, 1928). A su vez, también suponen un problema en los entornos urbanos debido a que en estas zonas es imposible utilizar medios de control químicos que pongan en riesgo la seguridad de las personas.

Estas plantas poseen una gran adaptabilidad, esto es así gracias a su rusticidad, capacidad de evolución continua, desarrollo y dispersión muy superior a las plantas empleadas normalmente en los cultivos agrícolas, colonizando por tanto muchas áreas, lo que deriva en un costoso control (F. Xavier Sans i Serra, 2016; García Torres y Fernández-Quintanilla, 1991).

La ciencia encargada del estudio de las plantas adventicias, se denomina malherbología y tiene como fin conocer la biología de dichas plantas, su forma de vida, su hábitat, el tipo de reproducción, su modo de dispersión etc. (Samways, 1990).

Es una ciencia indispensable a la hora de controlar las plantas adventicias, por lo tanto, de gran importancia en el objetivo del presente proyecto a desarrollar.

Para poder controlar estas plantas adventicias existen varios métodos. Los principales y más comunes son a través de realizar: controles preventivos, controles mecánicos, controles biológicos y controles químicos (Peralta y Royuela, 2015).

Dentro de los métodos de control de malas hierbas destacaremos el control biológico, siendo este un método respetuoso con el medio ambiente dado que se emplean organismos y elementos naturales que contribuyen al control de las adventicias sin ningún tipo de repercusión tanto para el suelo como para los cultivos que coexistan con dichas plantas (Torres, Olivencia, y Cruz, 1985; Susan y Castiel, 2005).

En la actualidad el método más empleado es el químico, cuyo origen lo podemos situar en el 1882 cuando se empleó la "mezcla de burdeos" (combinación de cal y sulfato de cobre), como medio para acabar con el mildiu producido por *Plasmosporasvitícola* en viñedos franceses (Brent et al., 1985). Posteriormente, en 1939 Paul Muller y sus colaboradores descubrieron las importantes propiedades insecticidas del DDT (Torres, Olivencia, y Cruz, 1985).

Este incremento en el uso de plaguicidas se fomentó debido al incesante crecimiento de la población y la necesidad de proteger con mayor rigor los cultivos agrícolas (Montoro et al., 2005).

Actualmente, el uso de estos productos está perdiendo fuerza, debido a los múltiples daños que causan y se apuesta cada vez más por el ya comentado control biológico.

El objetivo primordial de este trabajo fin de grado consiste en evaluar dentro de las plagas que afectan a las malas hierbas, cuales pueden ejercer un control biológico.

Este grupo de plantas adventicias que se pretenden estudiar son: *Bidens pilosa* L., *Conyza sumatrensis* L., *Echium plantagineum* L., *Forsskaolea angustifolia* L., *Gnaphalium luteo-album* L., *Malva parviflora* L., *Medicago polymorpha* L. y *Parietaria judaica* L.

3 Objetivos del Proyecto:

Para poder comenzar con la investigación se deben de tener en cuenta los objetivos establecidos, logrando así un enfoque más claro de las líneas de estudio que se van a plantear.

Los principales objetivos que se pretenden abordar con la realización de este Trabajo de Fin de Grado son:

1. Realización de un estudio para el control de las plantas adventicias mediante el uso de diversos predadores o insectos parásitos como medio de control biológico.
2. Elaboración de un evolucionario/insectario de las distintas fases del ciclo de vida de los insectos escogidos para el estudio. Asimismo, gracias a la etapa adulta de estos, se procederá a su identificación.
3. Determinación de la capacidad de control biológico que tienen los diferentes insectos sobre las plantas adventicias seleccionadas.

4 Revisión Bibliográfica.

4.1 Concepto de planta adventicia:

El concepto de planta adventicia está sujeto a criterios antropocéntricos, como ser una planta que se ubica en un lugar no deseado, son oportunistas y crecen en lugares modificados por la mano del hombre. Este concepto está sujeto a criterio de cada persona o agricultor, porque una misma planta para un agricultor puede ser una mala hierba como para otra ser el cultivo elegido. Por ejemplo, en un campo de trigo, si aparece la amapola (*Papaver rhoeas*) puede ser una mala hierba, pero actualmente existen campos dedicados al cultivo de amapolas.

Se podría decir que en ciertos casos estas plantas desplazan a las especies existentes conllevando un costo económico, lo que hace que sean especies no deseadas (Samways, 1990; González-Barragán, A. Sombrero, y Benito, 2006).

La definición más aceptada de mala hierba viene dada por el autor Turgeon (1994) "Es una planta que crece fuera de lugar o donde no se desea".

Otros autores como Pujadas y Hernández (1988) lo definen como "Plantas que crecen siempre o de forma predominante en situaciones marcadamente alteradas por el hombre y que resultan no deseables por él en el lugar y momento determinados".

La sociedad española de Malherbología (SEMh) las define como "Cualquier planta que interfiera con los objetivos y necesidades del hombre".

También autores como Baker la define como "Una planta es una mala hierba, si no importa qué zona geográfica, sus poblaciones se desarrollan totalmente o de forma predominante en situaciones netamente perturbadas por el hombre (Baker, 1974).

Zimmermann (1976) las define como "Una mala hierba es una planta que coloniza hábitats alterados, que no es un componente habitual en la composición natural original del área geográficas en la que se encuentra, que es abundante, al menos localmente, que es nociva, destructiva o problemática, y que tiene poco valor económico (Ubillos, 1976).

No se tiene un concepto concreto de la definición de mala hierba o planta adventicia, pero se pueden entender como aquellas plantas que no representan un beneficio dentro de un sistema de cultivo, en el cual se desarrolla un cultivo concreto, es decir especies vegetales que surgen en medio del cultivo de interés agrícola.

4.2 Características biológicas de las plantas adventicias:

De las 250.000 plantas espermatofitas conocidas (García Torres & Fernández-Quintanilla, 1991), aseguran que solo el 3% son plantas adventicias. El grupo con menor índice de estas plantas son las pteridofitas y más del 40 % se encuentran dentro de la familia de las *Poáceas* y las *Asteráceas*(Fernández y Alii, 1993;F. Xavier Sans i Serra, 2016).

Las características que hacen que estas especies sean tan exitosas radican en (García Torres y Fernández-Quintanilla, 1989; Vega et al., 2014).

1.Su fácil dispersión. Normalmente sus semillas tienen un alto parecido con las de los cultivos con los que conviven. En este supuesto la separación de las semillas del cultivo de las semillas de las adventicias resulta muy complicada. También estas cuentan con la ventaja de que se adhieren al pelo de los animales lo que facilita su dispersión, o son capaces de extenderse por medio del agua de lluvia o riego(Vega et al., 2014).

2. Capacidad de persistencia. Su alta capacidad de mantenerse en un área hace de ellas una especie vegetal con difícil control. Esta capacidad la tienen gracias a(García Torres y Fernández-Quintanilla ,1989):

a) Elevada producción de semillas. Donde las condiciones climáticas son favorables a las plantas adventicias existentes, están son capaces de producir hasta 100.000 semillas por planta. Con tan alta capacidad reproductiva es de proveer que la perpetuación de la especie este casi garantizada.

Teniendo en cuenta el gran número de semillas, las plantas adventicias no crean problemas del tipo epidérmico, por el contrario, más bien son problemas del tipo crónico dada su persistencia ya que están siempre presentes en una misma zona.

b) Largo periodo de viabilidad. Las semillas son capaces de mantenerse durante largos periodos de tiempo en el suelo en un estado óptimo de germinación.

Se han registrado semillas que son capaces de mantenerse en latencia durante periodos de hasta 10 años. Por ello se produce la enorme reserva en los suelos de cultivo.

c) Germinación escalonada. Muchas plantas adventicias poseen la ventaja de poder germinar en varios periodos del año o en distintos años. Por lo tanto esto conformaría una forma de dispersión a largo plazo.

d) Plasticidad fisiológica. Esta plasticidad fisiológica les confiere la capacidad de adaptarse a numerosos contratiempos y adversidades, obteniendo así la forma de terminar su ciclo biológico aun cuando las condiciones no le son favorables. Destacar el hecho de que, tras un tratamiento químico, las plántulas que son capaces de sobrevivir, pueden producir semillas viables para los años siguientes, aumentando las reservas de semillas en el suelo.

3. Capacidad de Competencia. Es lógico establecer que estas especies deben competir de forma activa con las cultivadas por los recursos y por tanto crear estrategias que le confieran esa ventaja por encima del resto de plantas cultivadas, las estrategias más comunes son(DeBach, 1975;Garcia Torres y Fernández-Quintanilla, 1989) :

a) Elevada densidad. Para poder ser superiores al cultivo deben de aumentar su densidad obteniendo así una ventaja competitiva.

b) Nacencia sincronizada con el cultivo. Las plantas adventicias poseen la capacidad de germinar a la par con las semillas del cultivo que las rodea o incluso germinar previo a las semillas de los cultivos de interés. Se ha demostrado que la primera planta capaz de germinar será la que dominará en el lugar de cultivo.

c) Vigor. Por norma general las plantas adventicias tienen un rápido desarrollo y un gran vigor en un breve espacio de tiempo. Sobre todo, en especies perennes cuya reproducción es vegetativa. Porque sus estructuras de reserva le permiten desarrollarse antes que las plántulas de cultivo.

d) Morfología y fisiología. Muchas plantas adventicias poseen estructuras morfológicas y filológicas que les confieren ventajas a la hora de competir. En muchas ocasiones se ven favorecidas por el gran desarrollo radicular que poseen.

Muchas especies son capaces de producir sustancias tóxicas que hacen que el otro cultivo no sea capaz de desarrollarse.

e) Capacidad de rebrote. Existen especies de plantas adventicias con yemas capaces de emitir raíces y tallos, esta capacidad hace que cuando se intenten controlar con labores como desbrozados, estas vuelvan a brotar, y además de propagar las semillas si en el momento del desbrozado la planta se encuentra en la fase de producción de semillas.

4.3 Competencia por el agua, la luz y los nutrientes.

Las plantas normalmente van a competir por los recursos que se encuentren en menor medida en el suelo. Por lo tanto se debe estudiar en qué medida se compiten por los recursos más importantes para toda especie vegetal (García Torres y Fernández-Quintanilla, 1989).

4.3.1 Competencia por la Luz.

En el comienzo del cultivo este factor no es tan limitante dado que la mayoría de semillas son capaces de germinar en la oscuridad. Pero una vez la plántula emerge, estas aumentan su tamaño de forma progresiva y comienzan a darse sombra unas a otras. En este instante es cuando comienzan a competir por los recursos de la luz para alcanzar su desarrollo óptimo.

La competencia de este factor va a estar limitada por el tipo de especie vegetal.

Las plantas trepadoras son las especies con mayor capacidad para competir por este recurso, por el contrario, las rastreras son las especies con menor recursos para competir.

Otro factor que hará que compitan por la luz en mayor o en menor medida es su capacidad o necesidad lumínica. Cuando plantas con elevados requerimientos en luz no lo tienen, se produce una morfología anómala denominada ahilamiento.

Esta consiste en que las plantas emiten tallos muy largos pero muy finos, lo que hace que adquieran una constitución muy débil y la hora de soportar adversidades climáticas no son capaces (Castilla,2013).

4.3.2 Competencia por el agua.

En cuanto a este recurso, es de suma importancia dividirlo en dos partes, una será en condiciones de secano y otra en condiciones de regadío. Se propone esta división porque la competencia por el recurso agua será mayor en condiciones de cultivo en secano, ya que esta se encontrará en menor cantidad que en regadío. En este caso las raíces serán las encargadas de determinar que especie dominará sobre la otra, ya que previamente a la emergencia de la plántula se forman las primeras raicillas.

También la capacidad de competir por el recurso dependerá de la especie vegetal y por tanto de su grado de aprovechamiento del agua y su grado de desarrollo(Fernández-Quintalla y Saavedra, 1991).

4.3.3 Competencia por los nutrientes.

Por lo general, la disponibilidad en el suelo de recursos nutritivos es escasa en la mayoría de cultivos y a pesar de este hecho debe de ser compartida entre plantas adventicias y cultivadas. Teniendo en cuenta esto, todos aquellos nutrientes que sean empleados por las plantas adventicias, ya no estarán disponibles para las especies cultivadas causando deficiencias nutricionales que deberán ser solventadas tras aparecer los primeros síntomas que evidencian este hecho.

Por tanto, la capacidad de absorción de nutrientes por parte de las plantas adventicias se verá afectado por su sistema radicular en primer grado y por su desarrollo en segundo grado. Existen especies de adventicias con un desarrollo radicular mucho más elevado que el de las especies cultivadas por lo que dominarán en ese instante las adventicias, se podría decir que llegando casi a bloquear el sistema radicular de las cultivadas.

Numerosas especies de adventicias se adelantan a los cultivos porque aparte de poseer un sistema radicular más agresivo, sus estructuras subterráneas se arraigan antes que las de los cultivos y comienza la absorción de nutrientes antes que las plantas cultivadas, para cuando estas se desarrollan los nutrientes ya están mermados.

Para equilibrar la balanza en favor de las especies cultivadas se ha demostrado que empleando ciertos tipos de abonos podemos favorecer el desarrollo de las especies de interés frente a las adventicias. Con un abono alto en nitrógeno, se ha demostrado que se reduce el desarrollo de adventicias tales como *Polygonum aviculare* L. (Fernández-Quintalla, Torres, y Saavedra, 1991; Castilla, 2013).

4.3.4 Producción de alelopatías.

Se encuentra bastante extendido el hecho de que existen ciertas plantas adventicias capaces de emitir sustancias tóxicas dañinas para otros cultivos. Los principales compuestos que causan estos daños son fenoles, alcaloides, terpenos o compuestos derivados de actividades secundarias de los metabolismos de las plantas adventicias. Su producción puede darse tanto en hojas como en raíces y pasar al suelo de diversas formas.

Con la lluvia, tras producir la sustancia toxica, llueve y esta se incorpora al suelo provocando la intoxicación del resto de cultivos, o con la caída de hojas con la toxina, al pasar al estado de descomposición también es una vía de incorporación de la toxina al suelo (García Torres y Fernández-Quintanilla, 1991).

Existen autores que aseguran la idea de que si se toman estos exudados creados por ciertas plantas que se cultivan y lo producen como mecanismo de defensa, se pueden llegar a crear herbicidas que contribuyan a equilibrar el número de plantas cultivadas con las plantas adventicias (Fernández-Quintalla y Saavedra, 1991).

4.3.5 Efectos de la competencia.

Los efectos de la competencia van a depender directamente de las especies de plantas adventicias, de la climatología de la zona, el periodo durante el cual están compitiendo, la densidad de cada especie, los compuestos del suelo, etc.

Los cultivos cuando se ven afectados por las malas hierbas acusan respuestas rápidamente. El principal y más importante efecto de la competencia por los recursos es el bajo rendimiento que se produce en el cultivo (Castilla, 2013).

4.4 Clasificación de las plantas adventicias.

Las plantas adventicias se pueden clasificar de acuerdo a diferentes criterios. Principalmente se han seleccionado los tres más relevantes en función de las características más importantes para el estudio, como son el hábitat, la morfología que presentan y su ciclo de vida(F. Xavier Sans i Serra, 2016).

4.4.1 Clasificación atendiendo a su hábitat.

1. **Arvenses.** Se trata de las especies que proliferan en los cultivos ya sean herbáceos o leñosos, y los jardines. Cada tipo de cultivo lleva asociado una especie de adventicias atendiendo a los requerimientos de su hábitat.

Ese hábitat viene definido por las fechas de siembra del cultivo o la fenología y las condiciones del suelo y clima. A mayor labranza del suelo mayor será el número de especies anuales(F. Xavier Sans i Serra, 2016).

2.**Ruderales.** Ocupan áreas creadas por el hombre y anexos de estos. Son especies adaptadas a zonas marginales, bordes de carreteras, bordes de cultivos, terrenos valutos...

Con un laboreo escaso existen muchas especies que son capaces de proliferar en el cultivo (González-Barragán, A.Sombrero, y Benito, 2006).

3.**Invasoras de praderas o pastos.** Existen multitud de especies que poseen la capacidad de introducirse en los pastos naturales o artificiales y que están constantemente sometidos a siegas como, por ejemplo, el pastoreo o un campo de golf.

Por lo que se trata de especies perennes adaptadas a estos entornos, y son más abundantes las adventicias anuales en aquellas zonas en las que la duración del cultivo es corto con especial incidencia el primer año desde la implantación del cultivo(C. Díaz-Ambrona, 1997).

4.Malas hierbas forestales. Dentro de este grupo tenemos gran abundancia de especies. Ya que existen especies herbáceas y matorrales consideradas como adventicias. Porque según el concepto de adventicia es toda planta que te interfiera o moleste a otros cultivos de interés(F. Xavier Sans i Serra, 2016).

4.4.2 Clasificación atendiendo a su morfología.

1. **Antófitos.** A este grupo pertenecen las plantas fanerógamas que se pueden dividir en dos subgrupos importantes, las monocotiledóneas y las dicotiledóneas. Este grupo de especies vegetales produce flores(García Torres y Fernández-Quintanilla, 1989).

2. **Pteridofitos o criptógamas,** son aquellas especies vegetales que no emiten flores. Poseen un cuerpo gametofítico taloide, el esporofito y el prótalo. En esta división se encuentran los Helechos, que son la especie vegetal que más problemas causa en la agricultura de las zonas más altas y con elevada humedad(José y Ariza, 2013).

4.4.3 Clasificación por su ciclo vital.

1.Anuales.

Las especies vegetales anuales son aquellas capaces de completar todo su ciclo de vida en un año. Dentro de estas a su vez se pueden clasificar en anuales de invierno o anuales de verano, esto es así en los climas templados donde las temperaturas no tienen cambios excesivamente bruscos.

Las anuales de invierno completan su ciclo en primavera por el contrario las anuales de verano completan su ciclo en otoño.Cabe destacar que dependiendo del tipo de cultivo que se realice se favorecerá la aparición de un tipo de plantas adventicias diferente.

Así se tiene que en cultivos anuales, la mayoría de plantas adventicias serán de ciclo anual, así en cultivos intensivos la mayoría serán de ciclos cortos y floraciones rápidas(Fernández-Quintalla y Saavedra, 1991).

2. Bianuales.

Las especies vegetales bianuales requieren de un periodo de dos años para completar su ciclo de vida. El primer año, toda su actividad se destina al desarrollo vegetativo y el segundo año por el contrario toda su actividad se destina a la producción de flores y semillas.

Requieren pasar por una etapa de reposo durante el invierno para poder completar el ciclo el segundo año y emitir las semillas (F. Xavier Sans i Serra, 2016).

3. Perennes.

Las perennes son aquellas que son capaces de volver a brotar a partir de una raíz que persiste en el suelo o de un retoño, dichas estructuras se mantienen en el suelo a lo largo del invierno y cuando se dan las condiciones ideales son capaces de brotar de nuevo (Gascón, 1928).

4. Parasitas.

Existen especies de plantas adventicias que poseen la capacidad de vivir de otras especies cercanas, obteniendo los nutrientes del parasitismo de la otra planta. Estas plantas sin duda son de las más evolucionadas ya que se deben sincronizar con el ciclo biológico de la planta parasitada para garantizar su existencia. Se puede destacar como especie característica parasitaria el *Oronbache spp.* "jopo" en varios cultivos de arvejas (Castilla, 2013).

4.4.3.1 Repercusión del control de las plantas adventicias.

El uso de productos fitosanitarios deriva en la creación de plagas resistentes a los productos aplicados convencionalmente, generar residuos tóxicos con repercusiones legales, destrucción de fauna auxiliar beneficiosa y un alto coste en el tratamiento con productos fitosanitarios. Para lidiar con ello se propone la lucha integral que se podría definir como un conjunto de actuaciones que conllevan la menor repercusión en el entorno, fomentando reducir la cantidad de residuos en el suelo (Badii y Abreu, 2006).

La mayoría de las investigaciones que se realizan en el campo de la malherbología tienen por objetivo cuantificar los daños negativos provocados por las plantas adventicias, pero actualmente la agricultura biológica se centra en el estudio de los posibles efectos positivos de estas plantas.

Por ello hay autores que dividen la forma en la cual interactúan dichas plantas adventicias en dos formas posibles, efectos positivos en el medio y efectos negativos. Debido a que ya se han comentado anteriormente los efectos negativos que causan se hará hincapié en los efectos positivos (Levins, 1986).

Efectos positivos

Como efectos positivos cabe destacar, que son útiles como reservorios de plagas y a su vez también son reservorios de insectos beneficiosos para los cultivos. Estas también protegen el suelo de la erosión tras la recolección de las cosechas, además de que con la actividad biológica llevada a cabo por las raíces en el suelo se obtienen una mejora en la estructura del mismo. Si en lugar de eliminar dichas plantas desde que son pequeñas plántulas, se dejan crecer hasta un estado vegetativo juvenil se pueden utilizar como abono en verde (F. Xavier Sans i Serra, 2016).

Teniendo en cuenta dichas características, hay autores que proponen un principio ecológico y un método de gestión, así se tiene (Altieri, M.A y Liebman, 1988):

Principio Ecológico	Método de Gestión
Reducir la cantidad de semillas emitidas e incrementar la desaparición de semillas del suelo	Prevención, solarización, eliminación antes de la producción de semillas
Favorecer el desarrollo rápido de la especie de interés	Continuo laboreo del suelo, y siembra en fechas adecuadas para su rápida germinación
Disminuir el crecimiento de las adventicias	Mulching, laboreo, escardas
Minimizar la captura intra específica del cultivo	Reducir al máximo la separación entre líneas
Modificar el medio creando suelos no útiles para las adventicias	Rotaciones de cultivos
Optimizar los recursos para los cultivos	Asociaciones de cultivos beneficiosos

4.5 Concepto de control biológico.

Para poder entender la forma en la que se pretende llevar a cabo el control de las plantas adventicias se debe de tener en cuenta la definición de lo que denominamos control biológico. Para ello se van a destacar diferentes definiciones de varios autores.

Mercedes Verdeguer (2014), define el control biológico de plantas adventicias como " El control biológico de las malas hierbas consiste en utilizar los enemigos naturales de las mismas para disminuir su población a niveles que no produzcan daños"; También propone la idea de que " las plantas se convierten en plaga y se les denomina " malas hierbas cuando proliferan en lugares no deseados debido a que sus enemigos naturales resultan inefectivos o inexistentes" (P. Vega et al., 2014).

Autores como A. Gutiérrez-Ramírez et al, proponen "El concepto de control biológico involucra la acción de organismos benéficos sobre organismos plaga"(Gutiérrez-Ramírez, Bermúdez, C.Santillán-Ortega &, Ortiz-Catón, & OJ.Camberos-Campos &, 2013).

Van Driesche et al definen el control biológico como " El uso de poblaciones de enemigos naturales para reducir poblaciones de plagas a densidades menores, ya sea temporal o permanentemente"(Driesche, Hoddle, y Center, 1995).

De Bach define el control biológico como "La potenciación de o utilización de los enemigos naturales de una plaga para reducir su población"(Susan y Castiel, 2005).

La autora, María Ángeles Mendiola define el control biológico de plantas adventicias como "El control biológico consiste en utilizar la influencia de determinados factores bióticos, los enemigos naturales sobre las plantas y sus relaciones de competencia, en beneficio de los cultivos, intentando reducir las poblaciones de plantas no deseadas a niveles económicos aceptables"(Ubillos, 1976).

Por lo que se puede proponer como concepto de control biológico de plantas adventicias, como el uso de organismo como por ejemplo insectos, que en un momento dado pueden ejercer un control sobre otros organismos considerados plagas como son las plantas adventicias. Se debe de considerar que los insectos entrarían dentro del grupo de lo que denominamos "plaga", pero a unos niveles adecuados ejercerían el control biológico de las plantas adventicias.

4.6 Origen del control biológico.

Desde que los primeros pobladores comenzaron a cultivar el suelo tuvieron que combatir con las especies autóctonas que surgían provocando competencia con los cultivos e interfiriendo con los mismos. Debido al carácter crónico de invasión que poseían, la necesidad de su control ha estado siempre presente en la mente del agricultor. Teniendo en cuenta esto y el aumento de las poblaciones y la necesidad de conservar las plantas en un estado óptimo respetando el medio natural surge lo que actualmente denominamos control biológico. Este tiene su origen en antiguos

agricultores chinos, que observaron como las hormigas terminaban con muchas plagas en cítricos (Badii y Abreu, 2006).

Previamente a la idea de un control biológico se empleó como método de control principal a parte de las labores habituales, el control químico de forma desmesurada y sin control alguno. Tras varios años de descontrol en el empleo de este sistema se puede decir que a través del Libro escrito por Rachel Carsons, *Las Primaveras Silenciosas*, comenzó un gran movimiento de concienciación de las poblaciones. Gracias a dicha publicación comenzó la búsqueda de métodos alternativos al control con químicos.

Así mismo se podría decir que Erasmos Darwin en el 1800 observa como una avispa (*Ichneumonidae*) es capaz de acabar con larvas de parasitoides en el cultivo de coles. Pero no es hasta el 1888 con Charles Valentine Riley que se habla del verdadero inicio del control biológico.

Algunos autores (Badii y Abreu, 2006), sitúan el origen del control biológico en el siglo XIX, como medio para restaurar el equilibrio en la naturaleza a través del uso de insectos o sus meta bolitos, pudiendo de esta forma controlar el resto de organismos considerados como una plaga. Con este tipo de control se busca reducir el uso de productos tóxicos para la naturaleza y garantizar la conservación del medio.

En la agricultura contemporánea cada vez se propone más la reducción de productos fitosanitarios en el mercado, ya sea por diversas razones en un plazo corto de tiempo por ejemplo el bromuro de metilo, empleado de una forma masiva en el control de patógenos del suelo, en multitud de cultivos porque se trata de un producto de amplio espectro será retirado.

La retirada de este producto se basa en estudios que han demostrado lo perjudicial que resulta para la capa de ozono (Martha Mulumba y Kuijpers, 2008).

El uso del control químico en ciertos sistemas no resulta tan efectivo y económico como si aplicáramos el control biológico. Hay que destacar que el control biológico presenta efectos más específicos que el químico (Susan y Castiel, 2005).

Por el contrario, se tiene la lucha integral natural o biológica, la cual utiliza organismos del tipo parasitoides, depredadores o patógenos que reducen las poblaciones de organismos no beneficiosos sin ninguna repercusión ambiental. Estas formas de control son posibles llevarla a cabo porque la mayoría de plagas cuentan con enemigos naturales asociados de forma natural, que aumentando la cantidad de dichos enemigos se controla la plagas(Hernández et al., 1988).

4.7 Evolución del control biológico.

El control biológico no es un método estático, debido a que a menudo aparecen nuevas plagas y nuevas plantas adventicias y aparecen nuevos cultivos en el mercado con nuevas modificaciones agronómicas. Dado que se producen estos cambios se hace necesario aumentar los requisitos exigidos a los enemigos naturales. Según el autor (Samways, 1990) Michael J. "Un agente de biocontrol efectivo debe ser capaz de asimilar tanto los cambios presentes como los que posiblemente se produzcan en el futuro", es decir el enemigo natural debe ser capaz de evolucionar con el medio y con las nuevas exigencias. Por lo tanto, en caso de que los enemigos naturales escogidos no tengas esa capacidad, se debe de elegir otros que sean más efectivos en cuanto a cumplir con dichas exigencias.

Hay que tener en cuenta que no es posible conocer con antelación cuanto de afectivo es un agente de control biológico sin previamente liberarlo. Dado que va a depender de numerosos factores externos e internos(Samways, 1990).

Como factores externos destacar el clima, el tipo de cosechas, la edad de la cosecha, y los métodos de cultivos característicos de cada zona, la competencia con otros enemigos existentes y su susceptibilidad a ser parasitados(Fernández-Quintalla y Saavedra, 1991).

Como factores internos destacan la genética de cada insecto, al introducir insectos como agentes de control se produce una gran diversidad genética. Esto facilitara su capacidad de adaptarse a las condiciones de su entorno(Fernández-Quintalla y Saavedra, 1991; J Dorado, Del Monte, y López-Fando, 1997).

Es importante estudiar qué enemigos naturales existen y su rango de daño posible, ya que un mismo enemigo natural puede servir como agente de control en diferentes lugares del mundo, si se dan las condiciones. Como ejemplo se tiene *Rodolia Cardinalis* un coccinélido que es capaz de controlar a la cochinilla acanalada, *Icerya purchasi*, en aproximadamente 20 países. Sin embargo existen enemigos que son capaces de establecerse en un ámbito, pero al cabo de un tiempo se mueren como por ejemplo el enemigo natural *Plaesius javanus*, se trata de un escarabajo que se introdujo para el control del coleóptero *Cosmopolites sordidus* (Samways, 1990).

En definitiva resulta de vital interés conocer la entomofauna regional nativa e introducida, para poder diseñar y crear programas de manejo biológico de plagas, implementando las estrategias de manejo de la fauna beneficiosa con un bajo impacto y un buen manejo, respetuoso con el resto de cadenas tróficas (Gutiérrez-Ramírez et al., 2013).

A continuación, se proponen algunos ejemplos de control biológico a través del uso de diferentes organismos.

Autores como F.J. Baute et al. (2005) proponen llevar a cabo un control biológico de la planta aloctona considerada como invasora en otros lugares del mundo, *Lantana camara* con el uso de *Orthezia insignis*, homóptero adaptado a las condiciones climáticas de la Isla de Tenerife, donde se desarrolló el ensayo, que tiene como fin conocer parte del ciclo de vida del insecto que realiza el control biológico y su morfología (Baute Delgado, Sobrino Vesperinas, y Siverio, 2005).

José Dorado y César Fernández-Quintanilla, proponen otro ejemplo para control de malas hierbas en el cultivo de maíz, que consiste en preemergencia y pos emergencia del maíz realizar una etapa de sequía en el cultivo, lo que llevara a dicho cultivo a aumentar su sistema radicular impidiendo que el sistema radicular de las plantas adventicias se desarrollen en plenitud (José Dorado y Fernández-Quintanilla, 2017).

Otros autores también proponen el uso de *Dactylopius ceylonicus* y *Cactoblastic cactorum*, para el control de *Opuntia stricta* Haw. var. *stricta* (Tunera) en zonas como Australia y Florida (Hosking, Sullivan, y Welsby, 1994; Bennett y Habeck, 1992).

4.8 Características del método de control biológico en las plantas adventicias.

Principales diferencias que caracterizan el método de control biológico (Rosenthal, Maddox, y Brunetti, 1984):

- No elimina por completo la adventicia si no se cree conveniente, únicamente reducir su número.
- Tener un bajo coste
- Es un método selectivo dado que existen plagas asociadas a huéspedes.
- Suele ser un control permanente, es decir una vez se sueltan los enemigos naturales estos se mantienen y controlan la plaga, por ello no se deben eliminar las plantas por completo, dado que tanto la plaga como el enemigo natural conviven en ella.

4.9 Criterios establecidos para los métodos de control biológico en las plantas adventicias.

Los métodos para controlar adventicias se pueden clasificar atendiendo a estos criterios (Wapshere et al., 1989; Rosenblat, 1984):

- 1- Método clásico, basado en introducir los enemigos naturales acorde a los huéspedes existentes.
- 2- Aumento de las poblaciones locales de enemigos, mediante una suelta masiva tras su incubación.
- 3- Método de conservación basado en reducir el número de parásitos, reducir las enfermedades que puedan terminar con los enemigos naturales y disminuir el número de depredadores de enemigos naturales.

4- Método de amplio espectro, manipulación sobre el nivel de ataque de los enemigos naturales sobre las poblaciones a fin de evitar la erradicación total de las plantas, a través de métodos artificiales.

4.10 Otros métodos biológicos de control de malas hierbas.

Lo que se conoce como enfermedad, consiste en la relación entre la planta hospedante y un agente causante denominado patógeno. Su interacción da lugar a enfermedades parasitarias o bióticas o enfermedades no parasitarias conocidas como fisiopatías (Fortí et al., 2014).

Las enfermedades parasitarias están ocasionadas por organismos como hongos, bacterias, nematodos, tiroides, virus y protozoos (Fortí et al., 2014).

Estos organismos viven a expensas de la planta parasitada, por lo que producen una disminución en el desarrollo llegando incluso a impedir la reproducción de la planta. Como consecuencia del debilitamiento provocado en la planta surgen muchas otras enfermedades (Fortí et al., 2014).

Según el autor Fortí (2014) " La patogenicidad puede definirse como la alteración que ocasiona un parásito sobre una o varias de las funciones esenciales de la planta, donde con frecuencia el parasitismo tiene una importante función" (Fortí et al., 2014).

Estos organismos por tanto deben estar perfectamente adaptados al huésped y las condiciones ambientales de vida del huésped. Existiendo de esta manera diferentes grados de parasitismo (Fortí et al., 2014; Vega et al., 2014).

-Parásitos obligados, requieren de la planta hospedante para crecer y reproducirse.

- Saprofitos facultativos, estos pueden vivir de forma saprofiticamente durante toda su vida o de forma puntual.

-Parásitos facultativos, estos organismos viven en la materia orgánica descompuesta, pero en condiciones adversas pueden alimentarse de la planta viva.

-Saprofitos, se alimentan de la materia orgánica u organismos en descomposición.

Algunos ejemplos del uso de este tipo de control de adventicias se muestran a continuación.

La investigadora Barbara Chulzpropone el uso de hongos para el control biológico de la especie *Cirsium arvense*(Schulz y Boyle, 2005).

El investigador Hans-Börje Jasson et al. proponen el uso de hongos nematófagos para el control biológico de nematodos (Nordbring-Hertz, Jansson, y Tunlid, 2001).

Otros autores proponen el uso del virus baculovirus SfVPN como agente de control biológico de la enfermedad producida en el maíz denominada *Spodoptera frugiperda* (cogollero del maíz)(Vázquez, Zedman, y Tressierra-Ayala 2006).

4.11 Características de los insectos empleados en el control biológico de las plantas adventicias.

Para lograr un buen control biológico de las plantas adventicias con el uso de insectos, se deben de conocer las características deseables de los insectos empleados en ese control. Deben cumplir los siguientes requisitos (Samways, 1990):

1. Ser posible reproducirlos en masa y su adaptación a la vida en campo.
2. Deben ser capaces de localizar donde se ubica el mayor número de hospedantes y ser capaces de reducir su número.
3. Albergar la mayor especificidad posible para así aumentar el grado de control y su efectividad.
4. Actuar rápidamente cuando exista mucha cantidad de hospederos y tener una rápida respuesta cuando estos aparezcan de nuevo.
5. Ser capaces de sobrevivir en la zona de suelta después de reducir el nivel de plaga.
6. Fauna autóctona o económica para bajar los costes del método y así promoverlo entre los agricultores y demás interesados.
7. Es muy importante que el enemigo natural empleado en el control de las adventicias, una vez se acaben estas no se traslade a los cultivos de interés.

En este caso sería de gran ayuda colocar enemigos naturales o se debería de plantear el uso de otros que no ataquen a los cultivos.

4.12 Conceptos generales de los insectos.

En la actualidad se puede decir que los insectos son la clase con mayores especies descritas y por describir hasta el momento. Se estima que se han descubierto alrededor de 1 millón de individuos y que faltan alrededor de 30 millones aun por describir (Ibarrola, 2019).

Todos los artrópodos tienen en común, que su cuerpo dividido en segmentos con apéndices que poseen formas y funciones muy variadas, además de poseer un exoesqueleto duro, que usan para protegerse y evitar la pérdida de agua en especies terrestres (Fortí et al., 2014).

El autor Pérez (2014), propone que el cuerpo de los artrópodos " está formado por tres tagma o regiones. El tagma anterior o cabeza tiene como función principal la recepción de estímulos del exterior y la ingestión del alimento. La zona media o tórax tiene función locomotora, ya que alberga las patas y alas y los músculos que las mueven. Por último, el tagma posterior o abdomen contienen la mayor parte de órganos del animal, que realizan, entre otras, las funciones de digestión, excreción, reproducción y puesta"(Fortí et al., 2014).

La cabeza, posee las estructuras necesarias para percibir las sensaciones y las responsables de la alimentación. Formada por 4 apéndices con funciones definidas, las antenas que se encargan de la parte sensorial, las mandíbulas, los palpos maxilares y labiales (Fortí et al., 2014).

Las piezas bucales, van a depender del tipo de alimentación de cada insecto. Los más comunes de los insectos plaga son los que se proponen a continuación:

1. Insecto con el aparato bucal masticador.

Los poseen los insectos que toman alimentos sólidos, poseen mandíbulas muy potentes, "largas, agudas y formando una pinza que permite sujetar la presa"(Fortí et al., 2014).

Según el autor Vega (2014) el daño que provocan "Consisten en roturas marginales, irregulares, por una o ambos lados de la hoja, con pequeños o grandes agujeros, con presencia de hilos sedosos, con minas, galerías o túneles lineales y circulares, con cortes y enrollamientos de la lámina foliar. Si el daño es severo la defoliación puede ser muy importante".

2. Insectos con el aparato bucal picador-chupador o rascador chupador y por ácaros.

Este tipo de aparato bucal es común de los dípteros, hemípteros, tisanópteros, y está formado por un tubo compuesto de un labro y el labio, este último le sirve para proteger a los órganos puntiagudos o estiletes que están en el interior (Fortí et al., 2014).

El autor Vega (2014) propone que el daño que causan "Consiste en pequeñas lesiones epidérmica de alimentación con decoloración por ingestión de la clorofila, posterior entrada de aire que da aspecto brillante, posterior necrosis con aspecto plateado o bronceado que puede terminar con la caída de las hojas o marchitez de éstas. Se pueden producir deformaciones, agallas o ampollas, erineas, manchas necróticas, etc."

3. Insectos con el aparato bucal chupador.

Es característico de los lepidópteros y es de tipo probóscide, formado por una larga trompa que se enrolla en espiral cuando permanece en reposo y con ella liban el néctar de las flores que polinizan (E. García, Romo, y Sarto, 2015). En el caso de los lepidópteros el aparato bucal de los adultos sería chupador, pero el de sus larvas se engloba en el aparato bucal masticador (Fortí et al., 2014).

El tórax, se encuentra formado por 3 segmentos empleados en la locomoción denominados, protórax, mesotórax y metatórax. Cada uno de ellos les acompañan 2 patas y en el mesotórax y metatórax se ubican los pares de alas(Fortí et al., 2014).

El abdomen,es el tagma que posee las vísceras y las estructuras encargadas de la reproducción sexual, denominada genitalia externa(Fortí et al., 2014).

Aparato reproductor,en el macho desarrollan la función de formar, madurar, almacenar los espermatozoides y transferirlos a la hembra de la cópula.

En la hembra la función es madurar sus ovocitos o huevos, almacenar el esperma del macho, con la posibilidad de escoger el momento de la fecundación de los huevos y llevar a cabo la puesta (Fortí et al., 2014).

El tipo de reproducción en insectos, más común es la reproducción sexual, con producción de gametos masculinos y femeninos, fecundación y puesta de huevos de la hembra. El autor Pérez (2014). " Se caracterizan porque hay un intercambio de material genético entre el padre y la madre y los descendientes son, desde el punto de vista genético, ligeramente distintos a los progenitores". Otra forma de reproducción es a través de la partenogénesis, en este caso el gameto femenino no es fecundado. Por lo tanto el nuevo individuo es genéticamente idéntico al de la madre (Fortí et al., 2014).

Como ya se ha comentado los insectos poseen su cuerpo cubierto una estructura denominada tegumentos. Este tegumento se renueva cada vez que el insecto realiza una muda. Esto es así porque el tegumento al ser una estructura rígida no permite al insecto a travesar los distintos estadios de desarrollo y aumentar su tamaño.

A lo largo de su vida el insecto a traviesa por lo denominado como metamorfosis.

Tras la eclosión del huevo el individuo que surge difiere en gran medida del adulto.

Por lo que se suceden los estados larvarios para alcanzar la forma adulta. Previo al estado de adulto se produce el estado de pupa que sería el último estadio larval, (Fortí et al., 2014).

4.13 Caracterización genómica de insectos.

Para poder entender de forma más clara el proceso de caracterización de genómica de los insectos o lo que es lo mismo el DNA Barcoding, previamente se debe tener ciertas nociones a cerca del DNA. El DNA se puede decir que es una de las moléculas imprescindible para la vida, que está formada por dos hélices. Cada una de ella lleva una cadena de polímeros conformada por millones de nucleótidos. Cada nucleótido está formado por un azúcar (desoxirribosa), una base nitrogenada que puede ser adenina (A), timina (T), citocina (C) o guanina (G), y un grupo fosfato.

Denominamos por tanto secuencia al orden que llevan los nucleótidos dentro de la cadena de DNA.

Los métodos que se utilizan para analizar ese orden se denominan secuenciación(Valdemar, Díaz, y Flores 2011;Campion y Tec, 2004).

El DNA Barcoding (código de barras del ADN), se describe como una técnica que permite identificar organismos partiendo de fragmentos de ADN genómico. La secuencia de consenso estandarizada se le denomina código de barras del ADN" porque este posee gran similitud con el código de barras de una etiqueta"(Jinbo, Kato, y Ito, 2011).

Dada la gran variabilidad de insectos y su creciente importancia en el ámbito agrícola ha provocado el aumento del interés a cerca del código de barras del ADN(Jinbo, Kato, y Ito, 2011).

Como consecuencia de que existan pocas personas especializadas en el análisis taxonómico se crea en 2004 esta idea del código de barras, que permite su uso a todo tipo de usuarios. Para ello se propone el uso de datos moleculares en lugar de datos morfológico para la identificación de taxones(Blaxter, 2003).

"Herbert et al. (2003a, b) propusieron una técnica que utiliza un conjunto de cebadores para amplificar una región de 648 pares de bases (pb) de la subunidad 1 de la oxidacitocromo- mitocondrial(*COI*) gen para asegurar una identificación rápida y precisa de una amplia gama de muestras biológicas. Ellos llamaron a esta técnica "ADN código de barras" "(Jinbo, Kato, y Ito 2011). Tras la propuesta de los investigadores el proyecto del Código de barras de la vida inicio un proceso para realizar el código de barras como un estándar global que permita identificar eucariotas usando la secuenciación.

Actualmente y gracias a este proyecto se ha recopilado un numero de código de barras de 430.000, lo que suponen unas 50.000 especies identificadas(Silva-Brandão et al., 2009).

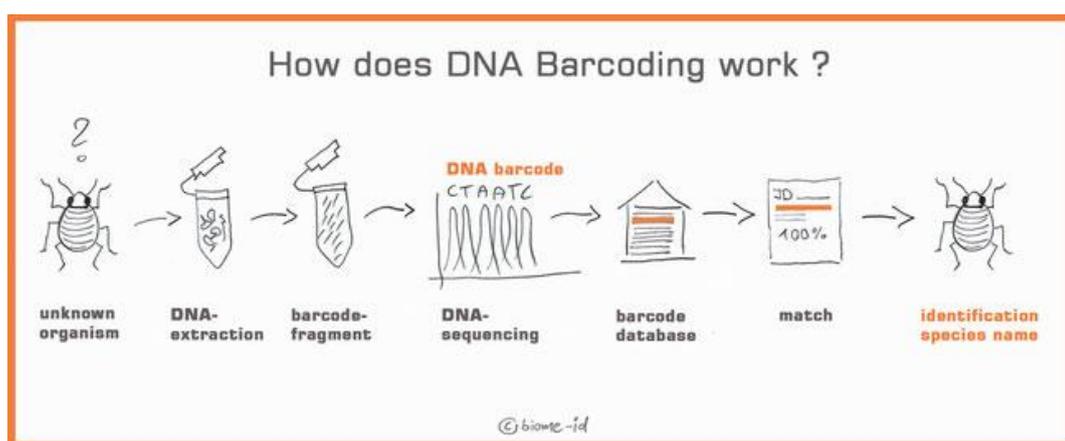
Para elaborar y obtener la identificación de una especie a través del código de barras, esta identificación estará sujeta al número de individuos ya registrados en la base de datos. Por tanto, la forma más fiable de obtener una identificación correcta es basar

esta identificación en una identificación previa tipo. Siendo los primeros investigadores en emplear este formato Brown et al. (2003)(Brown, Miller, y Horak, 2003).

La realización de la identificación de especies a través del código genético presenta dos limitaciones fundamentales. La primera es que, para extraer DNA, en insectos cuyo tamaño es ínfimo se ven perjudicadas partes morfológicas, que representan una pérdida de información para la identificación morfológica. La segunda limitación es que las muestras deben ser frescas o estar en unas condiciones de conservación óptimas para realizar el proceso. Debido a que se degradan con el calor, la oxidación y el gas de fumigación(Zimmermann et al., 2008).

Una de las mayores ventaja que representa este método es la identificación de posibles plagas y prevenir su establecimiento en una zona no contaminada, lo que se traduce en una disminución de gastos para los agricultores, además de evitar futuros problemas de erradicación de la plaga(Bonants et al., 2010).

Al igual que con el código de barras se pueden identificar plagas, también es posible el establecimiento de agentes de control biológico. El interés por los agentes de control biológico han aumentado de forma exponencial debido a que existe una gran comercialización mundial, que conlleva el traslado de insectos desde sus lugares nativos a otros en los que la fauna existente no es capaz de erradicar, entrando en juego el importante papel del estudio de insectos como agentes de control biológico(Neumann et al., 2010; Symondson, 2002).



(Autor: Copyright Biomed-id)(Molecular Species Identification Solutions, n.d.)

4.14 Descripción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La PCR o Reacción en cadena de la polimerasa, es una técnica científica desarrollada por un bioquímico estadounidense Kary Mullis en 1985. Con esta técnica lo que se consigue es ampliar pequeñas porciones de ADN para hacer lo más visibles y poder realizar los análisis necesarios en laboratorio, también se utiliza para la identificación del material, es decir a través de esta técnica y su posterior análisis se puede conocer el nombre de una determinada especie (David, 2011).

Actualmente este método está ampliamente desarrollado y existen varias formas de llevar a cabo esta técnica (Cigudosa, 2004; Greif, 2014):

PCR anidada: es una de las formas que mayor amplificación del material se consigue.

PCR in situ: con esta forma se obtiene el ADN en el mismo lugar donde se toma sin tener que procesar la muestra.

PCR múltiple: con una única muestra se pueden obtener varios trazos de ADN.

PCR con transcriptasa inversa: en este formato se usan cadenas de ARN para detectar moldes de ADN por medio del empleo de la enzima transcriptasa inversa.

PCR en tiempo real o cuantitativa: para este modelo se requiere de un componente fluorescente que permite medir la luz, a mayor cantidad de luz mayor es la cantidad de ADN detectado.

Para poder entender de forma más clara el proceso y sus apartados se definirán a continuación una serie de términos:

ADN: se trata de una molécula formada por la sucesión de nucleótidos en la cual se encuentra escrita la información necesaria para la vida de los distintos seres vivos.

Amplificación génica: se trata de ampliar el número de copias de un fragmento de ADN existente en una molécula.

Bases genéticas: componen el ADN y se organizan en pares.

Cebador o "PRIMER": secuencia de nucleótidos que se unen de forma complementaria a una cadena única de ácidos nucleídos iniciándose entonces la síntesis de la cadena existiendo el ADN polimerasa y nucleótidos.

Ciclo térmico: conjunto de reacciones que se suceden hasta que se obtiene calor.

Hibridación: unión espontánea y complementaria de ácidos nucleídos.

Marcador génico: segmento de ADN con una localización física de fácil identificación en un cromosoma y cuya herencia se puede rastrear.

Nucleótido: conjunto que forma las cadenas de ADN, en pares de bases, esto compuesto por una base más un azúcar y una molécula de ácido fosfórico.

Oligonucleótido: cadena de ADN formado por un número pequeño de pares de bases.

Polimerasa: es una enzima que tiene la capacidad de replicar el ADN, partiendo de un primer el ADN polimerasa añade nucleótidos complementarios a la cadena molde extendiendo la nueva cadena de ADN en dirección 5'-3'.

El sistema empleado para realizar la PCR son el BioRaidiCyclerTM y los termocicladores MJ Researchinc. Las funciones de estos es la amplificación del ADN y estas se realiza en 3 pasos consecutivos:

Primer paso es la desnaturalización de la molécula de ADN que se va a copiar. Para ello se aumenta la temperatura consiguiendo con ello la separación de las dos cadenas que forman parte de la doble hélice de ADN.

El segundo paso consiste en el apareamiento o hibridación de los cebadores u oligos al ADN molde. Es necesario disminuir la temperatura de la reacción, de tal forma que las pequeñas secuencias de ADN (de cadena sencilla) se unan a sus complementarias de ADN diana.

El tercer paso es la elongación de las cadenas definidas por los cebadores. Para lograr esto se debe aumentar la temperatura de nuevo. Cada extremo 3-OH, de los oligos apareados a las cadena directa y reserva serán extendidos a las cadenas hijas correspondientes. Con esto duplicamos el número inicial de moléculas de ADN.

Los pasos descritos se repiten un n veces, duplicando el número de las cadenas delimitadas por los oligos en cada ciclo. Es una fórmula exponencial y estas cadenas sintetizadas se pueden emplear como moldes futuros en ampliaciones.

La PCR Estándar se puede dividir en 3 partes:

- 1- Secuenciación: con la PCR se busca conseguir la cantidad adecuada de ADN molde para su secuenciación.
- 2- Estudio evolutivo: la PCR sirve como método para amplificar genes de organismos ya extinguidos y poder compararlos con genes semejantes actuales.
- 3- Huellas dactilares del ADN: una de las aplicaciones por las cuales este método tiene un gran interés es la determinación de huellas dactilares genéticas. Con este método es posible comparar diferentes muestras y comprobar si pertenecen al mismo organismo o no.

5 Materiales y Métodos.

5.1 Descripción de especies vegetales e insectos.

Para poder entender mejor y conocer mejor estas especies de plantas consideradas como plantas no útiles o inservibles, y poder establecer de forma adecuada y correcta el control biológico que se pretende con el proyecto, se estudian características como las que se aportan a continuación, de las 10 especies escogidas y los insectos propuestos como agentes de control.

En primer lugar, se describirán las especies vegetales y posteriormente las especies de insectos.

5.2 Especies vegetales.

5.2.1 *Bidens pilosa* L. (1753).



Fig. 1 Planta adulta.

Familia: Asteraceae(Gärtner, Meyer, y Scherbius, 1802).

Género: Bidens(González, 2009).

Tipo Biológico: Terófito erecto(Castroviejo y Pascual, 1999).

Nombre común: Amor seco(González, 2009).

Fenología: Tiene lugar entre primavera y verano(García Gallo et al., 1993).

Descripción: Especies originaria de California, E.U.A., hasta la zona de Centroamérica. Es una planta herbácea anual, erecta, que alcanza los 60cm de altura, ramificada, con los peciolos y los raquis de las hojas pubescentes.

Las hojas imparipinnadas, con forma ovados y el margen dentado.

Las inflorescencias en capítulos de 5-15mm de diámetro, con las flores externas liguladas, blancas y estériles y las internas tubulosas, amarillas y hermafroditas.

El fruto es un aquenio fusiforme, de 6-8mm, con pelos retrorsos y con 2-3 aristas con pelos retrorsos(Sanz Elorza, Sobrino Vesperinas, y Dana Sánchez, 2005).

Distribución en Canarias: Hasta el momento se ha descrito su presencia en La Palma, El Hierro, Tenerife, Las Palmas de Gran Canaria, Fuerteventura, La Gomera y Lanzarote(Gobierno de Canarias, 2004).

5.2.2 *Conyza sumatrensis* L. (1753).



Fig. 2 Planta adulta.

Familia: Asteraceae(Gärtner, Meyer, y Scherbius, 1802).

Género: Conyza(González, 2009).

Tipo Biológico: Terófito erecta(José y Ariza, 2013).

Nombre común: Conyza(González, 2009).

Fenología: La floración y fructificación se produce principalmente entre los meses de invierno y primavera (García Gallo et al., 1993).

Descripción: Es una especie originaria de Sudamérica, considerada una especie aloctona invasora en Australia, Tasmania, Nueva Zelanda, Sudáfrica, Norte de África, Madagascar, Zaire, América Central, Europa, Asia y la Macaronesia. Planta herbácea, anual, de hasta 2,5 m de altura, robusta, ramificada a partir de la inflorescencia y pubescente (González, 2009).

Sus hojas verdaderas inferiores oblongas, alternas y densamente pubescentes y dentadas. Hojas caulinares estrechamente lanceoladas, generalmente dentadas, con los nervios laterales notorios, márgenes en general con cilios blancos y largos. Las inflorescencias en capítulos agrupados en panícula larga, no glandulosa. Capítulos muy numerosos, cada uno con 120-200 flores externas femeninas, liguladas y 10-20 flores internas hermafroditas, tubulosas (González, 2009).

El fruto en aquenio , provisto de vilano de hasta 6 mm de color blanco amarillento(Sanz Elorza, Sobrino Vesperinas, y Dana Sánchez, 2005).

Distribución en Canarias: Se ha observado su presencia en las Islas de El hierro, Tenerife, La Palma, Las Palmas de Gran Canarias y La Gomera(Gobierno de Canarias, 2004).

5.2.3 *Echium plantagineum* L. (1753).



Fig. 3 Planta adulta.

Familia: Boraginaceae(Gärtner, Meyer, y Scherbius, 1802).

Género: Echium (González, 2009).

Nombre común: Viborera morada (González, 2009).

Fenología: Su floración y fructificación se produce entre los meses de febrero a junio (González, 2009).

Descripción:Se trata de una planta anual con flores de color violeta normalmente. Es originaria de el Mediterráneo y el Norte de África. Se considera una especie venenosa si es consumida por ciertos animales, como por ejemplo caballos(Carretero, 2004).

Sus hojas basales dispuestas en roseta, pecioladas, oblongo-elípticas u ovadas, con nervios laterales muy prominentes; las hojas superiores son alternas, sentadas, de 2-10cm de largoooblongo-lineares, oblanceoladas o lanceoladas y cubiertas de pilosidad homogénea en el haz y especialmente en los bordes (González, 2009).

Su inflorescencia es en panícula laxamente ramificada y sus brácteas más cortas que el cáliz, ovado lanceoladas.

El cáliz dividido hasta la base, más o menos acrescente, con la corola de color azul-violeta o rojiza, anchamente infundibuliforme, marcadamente zigomorfa, glabra, salvo algunos pelos largos sobre los nervios y en los lóbulos. El androceo con 2 (-3) estambres exertos, los demás incluidos (normalmente 3) de filamentos largamente pelosos. Las anteras maduran antes que el estigma, lo que se denomina protandria (Valdés, Díez M. J., y Fernández, 1987).

Distribución en Canarias: Se ha observado su presencia en las islas de : El Hierro, La Palma, La Gomera, Tenerife y Las Palmas de Gran Canaria (Gobierno de Canarias, 2004).

5.2.4 *Forsskaolea angustifolia* L. (1753).



Fig. 4 Planta adulta.

Familia: Urticaceae (Gärtner, Meyer, and Scherbius, 1802).

Género: Forsskaolea (González, 2009).

Tipo biológico: Caméfito (José y Ariza 2013).

Nombre común: Ratonera (González, 2009).

Fenología: Se produce entre las estaciones de otoño- primavera(García Gallo et al., 1993).

Descripción: Se trata de una especie de habito anual originaria de Santiago del Teide(Tenerife). Pero dependiendo de las condiciones ambientales se puede comportar como perenne o como especies arbustiva en cuyo caso puede alcanzar los 2 metros de altura. Los tallos nuevos poseen colores rojizo-purpúreos e hispídos. (González, 2009).

Sus hojas son de tipo caduco o sub persistente, con disposición alternas o subverticiladas (estípulos laminares). Lámina lanceolado-subromboidea, casi laciniada y armada por espinas marginales y pelos rígidos, verde o glauco-verde en la cara superior y blanquecina por debajo (González, 2009).

Posee inflorescencias axilares sésiles, verdoso-rosadas. Sus flores unisexuales en fascículos cimosos, incluidos en un involucre tubular campanulado con 4-6 brácteas, soldadas y densamente tomentosas. Las flores masculinas numerosas que rodean a las femeninas con perianto tubular de 3mm a 5mm dentado, con un estambre, sin ovario rudimentario. Las femeninas de 1-5 en el centro del involucre, sin perianto, ovario tomentoso, estigma filiforme, papiloso- hispido.

Su fruto son aquenios ovoides comprimidos, lanudos, incluidos en el involucre(Kunkel, 1976).

Es una planta de tamaño medio, pero excepcionalmente puede alcanzar los 2 metros de altura. Sus hojas son alternas, lanceoladas, con los bordes dentados de color verde por el haz y blanquecinas pubescentes por el envés. En su tallo posee espinal. Sus flores son pequeñas de color ligeramente rosadas y su inflorescencia son axilares (González, 2009).

Distribución en Canarias: Presente en Tenerife, La Palma, La Gomera, El Hierro, Las Palmas de Gran Canaria, Lanzarote y Fuerteventura(Gobierno de Canarias, 2004).

5.2.5 *Gnaphalium luteo-album* L. (1753).



Fig. 5 Planta adulta.

Familia: Compositae(Gärtner, Meyer, y Scherbius, 1802).

Género: Gnaphalium(González, 2009).

Tipo biológico: Terófito erecto(Castro viejo y Pascual, 1999).

Nombre común: Borriza(González, 2009).

Fenología: La floración y fructificación se producen en los mese de febrero a mayo(González, 2009).

Descripción: Tiene su origen por la zona euroasiático, pero de región desconocida (González, 2009).

Es una planta, anual capaz de alcanzar los 60 cm de altura, con tallos erectos o ascendentes, simples o con ramificaciones horizontales, provistos de indumento lanoso (Valdés, Díez M. J., y Fernández 1987)

Las hojas son alternas, oblongas, linear-oblanceoladas, lanceoladas, lineares, estrechamente obovadas o espatuladas, enteras, planas, decurrentes, de 1 a 6 cm, con ápice obtuso a agudo, borde revuelto y con indumento de color blanco o grisáceo por las dos caras (Valdés, Díez M. J., y Fernández 1987)

Su inflorescencia es en ccapítulos aglomerados en la terminación de los tallos o ramillas, de 6-16 mm, sésiles, ovoides y forman grupos de 4 a 12. Posee brácteas involucrales amarillentas, glabras y obtusas, las externas anchamente ovadas y las internas oblongas (Valdés, Díez M. J., y Fernández 1987)

Sus flores son amarillas y en ocasiones teñidas de púrpura en el ápice, todas flosculosas, las externas femeninas y filiformes, y las centrales hermafroditas. Su fruto es un aquenio de hasta 0,7 mm, tuberculado, glabro o peloso pardo, con un vilano de 2 a 2,5 mm. (Valdés, Díez M. J., y Fernández 1987).

Distribución en Canarias: está presente en las islas de: Tenerife, La Gomera, El Hierro, La Palma, Lanzarote, Fuerteventura, Y Las Palmas de Gran Canarias(Gobierno de Canarias, 2004).

5.2.6 *Malva parviflora* L. (1753).

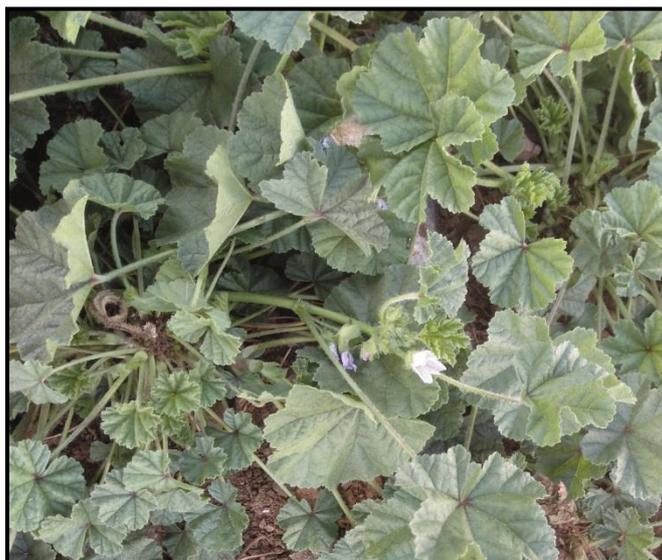


Fig. 6 Planta adulta.

Familia: Boraginaceae(Gärtner, Meyer, y Scherbius, 1802).

Género: Malva(González, 2009).

Nombre común: Malva

Tipo biológico: Terófito(Castro viejo y Pascual, 1999).

Fenología: La floración y fructificación se produce durante los meses de primavera- verano(González, 2009).

Descripción: Es una especie anual, con flores blancas por lo general. Es originaria de Europa. Es una especie anual capaz de alcanzar los 75 cm de altura, con tallos ascendentes, glabrescentes o laxamente pubescentes, con pelos simples y estrellados (González, 2009).

Sus hojas son largamente pecioladas, suborbicular con 5 o 7 lóbulos poco profundos, crenado-dentados, de glabrescentes a esparcidamente pubescentes, con pelos simples o estrellados, con estípulas lanceoladas, enteras o dentadas, glabrescentes o esparcidamente pubescentes, generalmente ciliadas, persistentes (González, 2009).

Sus flores en fascículos axilares de 2-4 flores, subsésiles, con unos pedúnculos de hasta 1 cm en la fructificación, estrellado-pubescentes. Los pétalos son oblongo-ovados, emarginados, de unalarga, glabra, con colores azules o violetas pálidos, o blanquecinos(Valdés, Díez M. J., and Fernández, 1987; González, 2019).

Distribución en Canarias: Se encuentra ampliamente extendida en todas las Islas del Archipiélago(Gobierno de Canarias, 2004).

5.2.7 *Medicago polymorpha* L. (1791).



Fig. 7 Planta adulta.

Familia: Fabaceae(Gärtner, Meyer, y Scherbius, 1802).

Género: Medicago(González, 2009).

Tipo biológico: Terófito(José y Ariza 2013).

Nombre común: Carretón(González, 2009).

Fenología: La floración y la fructificación se producen entre los meses de febrero y junio (González, 2009).

Descripción: Es una especie originaria del Mediterráneo con los tallos muy ramificados, de 10-90 cm de longitud (González, 2009).

Sus hojas alternas trifoliadas, con folíolos de 1-2 cm de longitud, obovados, cuneados, redondeados y truncados en el ápice. Posee estípulas anchas en la base, laciniadas, con lacinias que alcanzan hasta 1/3 de su anchura.

Su inflorescencia es en racimo con 3-8 flores con el pedúnculo más largo o más corto que el pecíolo de la hoja contigua.

Las flores tienen el tubo del cáliz de ± 3 mm, con dientes glabros. La corola de color amarillo con el estandarte más largo que la quilla.

Su fruto tiene forma discoidal o subcilíndrico, glabro y por lo general espinoso (Castroviejo y Pascual, 1999).

Distribución en Canarias: Está ampliamente extendida en todas las Islas del Archipiélago (Gobierno de Canarias 2004; Morales 2012).

5.2.8 *Parietaria judaica* L. (1763).



Fig. 8 Planta adulta.

Familia: Urticaceae (Gärtner, Meyer, y Scherbius, 1802).

Género: *Parietaria* (González, 2009).

Tipo biológico: Caméfito procumbente-ascendente (Castroviejo y Pascual, 1999).

Nombre común: Hierba ratonera (González, 2009).

Fenología: Florece todo el año, siendo más pronunciada en la primavera y su fructificación tiene lugar en primavera-verano (González, 2009).

Descripción: Es una planta perenne, originaria del Mediterráneo. Su base es poco lignificada y sus tallos son densamente pubescentes, rastreros, ramificados de color rojizo. Puede alcanzar los 40 cm de altura (Molina, 2014).

Sus hojas se disponen de forma alterna, son largas y pecioladas, con el peciolo canaliculado y largo. La lamina es ovaliforme, acuminada o apiculada con nervadura marcada. Posee brácteas florales de color verde soldada en la base

Sus flores son pequeñas, rojizas y hermafroditas. Las femeninas escasas, con lóbulos lanceolados, agudos, conniventes, densamente pubescentes (Molina, 2014).

Su fruto es un aquenio, liso, de color negrozco brillante(Molina, 2014).

Distribución en Canarias: Se puede localizar en todas las Islas del Archipiélago, en las zonas de preferencia de la especie(Gobierno de Canarias, 2004).

5.3 Especies de insectosfitófagos.

5.3.1 *Hypera postyca*Gyllenhal(1813).



Fig. 9 Insecto adulto y larva.

Filo: Artrópoda(CSIC, 2008).

Clase: Insecta.

Orden: Coleóptero.

Familia: Curculionidae.

Género: Hypera.

Nombre común: Gorgojo de la alfalfa.

Morfología:

Huevos, poseen un color amarillo pálido y son depositados por la hembra dentro del tallo de la planta. Colocan unos aproximadamente 22 huevos. Capaces de alcanzar un tamaño de 0.6 mm de longitud (Gurrea P., 1981).

Larvas, se caracteriza por su color verde, su cuerpo en segmentos y por tener la capsula cefálica de color castaño oscuro con la línea dorsal blanca. Estas emergen al exterior por el orificio de puesta(Gurrea P., 1981).

Atraviesan 4 fases. Las de la primera fase alcanzan una longitud de 1.45 mm y su color es blanco ópalo. Su cuerpo está dividido en 12 segmentos con pelos. La larva de la segunda fase aumenta de tamaño hasta los 2.55mm de longitud, pero mantiene el color. En esta fase aumenta el número de pelos en todos los segmentos. La larva de la tercera fase presenta un cambio de color, pasa del blanco ópalo a verde claro y aumenta su tamaño hasta los 6.8 mm. La larva de la cuarta fase mantiene el color de la anterior, lo que cambia es su longitud que alcanza los 9 m, además posee una banda blanca que recorre el cuerpo por el medio en longitud. En la última fase las larvas pupan en el interior de un capullo que construyen a partir de las hojas (Sanz, 2015).

Capullo, es muy característico de la especie por su color blanco y el aspecto de encaje que muestra. Transcurren aproximadamente 27 días desde que la larva emerge

Pupa, cuando se forma tiene un color amarillo pálido, es una pupa muy característica ya que posee la forma del futuro adulto(Sanz, 2015).

Adulto, tiene un tamaño de aproximadamente 10 mm de longitud y su forma es ovalada- alargada. Las piezas bucales se localizan al final de la trompa. Una forma de diferenciar la hembra del macho es observando los segmentos del abdomen.

Tienen un color marrón oscuro los ejemplares viejos y su cuerpo está cubierto de escamas y pelos con destellos metálicos. Los ejemplares más jóvenes poseen tonos marrones más claros (Sanz, 2015).

Descripción: Puede alcanzar un tamaño de unos 5 mm de longitud y es originario del Norte de Europa. Tanto el adulto como la larva causan daños en el follaje, son de hábito diurno lo que facilita su visualización (Bland, 1981). Su aparato bucal es del tipo masticador.

Daño provocado: "Consisten en roturas marginales, irregulares, por una o ambos lados de la hoja, con pequeños o grandes agujeros, con presencia de hilos sedosos, con minas, galerías o túneles lineales y circulares, con cortes y enrollamientos de la lámina foliar. Si el daño es severo la defoliación puede ser muy importante" (Vega, 2014).



Fig. 10 *Medicago Polymorpha* L. (1791). Planta adulta con daño.

Distribución, se localiza en toda Europa, en el Norte de América y en todas las Islas del Archipiélago Canario (Gobierno de Canarias, 2004).

5.3.2 *Cosmopterix pulchrimella* Chambers(1875).



Fig. 11 Insecto adulto y larva.

Filo: Artrópoda(CSIC, 2008).

Clase: Insecta(Koster et al., 2019).

Orden: Lepidóptera(Lopez Vaamonde, Agassiz, y Augustin, 2010).

Familia: Cosmopterigidae(Lopez Vaamonde, Agassiz, y Augustin, 2010).

Género: *Cosmopterix*(Lopez Vaamonde, Agassiz, y Augustin, 2010).

Nombre común: Polilla bella(Koster et al., 2019).

Morfología:

Larva, suelen tener un color blanquecino casi grisáceo y la cabeza y la placa protorásica de color negro. Tiene su cuerpo dividido en segmentos de diferentes tamaños(Gebiola et al., 2015).

Pupa, se desarrolla dentro de la mina que construye como medio de protección es de color marrón oscuro y una vez se produce la metamorfosis se obtiene el adulto transcurridos aproximadamente 30 días otoño(Lopez Vaamonde, Agassiz, y Augustin, 2010).

Adulto, dependiendo del sexo su longitud esta en torno a 2-3 mm. Suelen tener un color negro con tonos marrones oscuros (Gebiola et al., 2015). Posee una característica banda anaranjada bordeada por líneas negras en la zona del mesotórax, que permite distinguir esta especie. Además posee cuatro líneas plateadas en la parte superior del cuerpo y líneas plateadas por el borde de las líneas negras que rodean a las naranjas (Koster et al., 2019).

Sus alas son membranosas y de colores brillantes. El adulto, coloca los huevos durante la época de primavera hasta otoño(Lopez Vaamonde, Agassiz, y Augustin, 2010).

Descripción: Los principales daños que se observan son ocasionados por sus fases juveniles, crean galerías en toda el área foliar. Es una polilla que tiene su origen en centro América. Fue descrita por primera vez por Chambers en el 1875. Su pieza bucal es una probóscide chupadora formada por las maxilas denominada espiritrompa(“NB Atlas” ,2017; Koster et al., 2019).

Daño provocado: en este caso el daño lo realiza la fase juvenil y "Consisten en roturas marginales, irregulares, por una o ambos lados de la hoja, con pequeños o grandes agujeros, con presencia de hilos sedosos, con minas, galerías o túneles lineales y circulares, con cortes y enrollamientos de la lámina foliar. Si el daño es severo las defoliación puede ser muy importante"(Vega,2014).



Fig. 12 *Parietaria judaica* L. (1763). Planta adulta con daño.



Fig. 13 *Forsskaolea angustifolia* L. (1758). Planta adulta con daño.

Distribución: Se ha descrito su presencia en la Isla de Tenerife principalmente. Aunque está ampliamente distribuida por toda Europa, las Azores y toda la zona del Mediterráneo (Lopez Vaamonde, Agassiz, y Augustin, 2010).

5.3.3 *Dialectica hedemanni* Rebel(1896).



Fig. 14 Insecto adulto y larva.

Filo: Artrópoda(CSIC, 2008).

Clase : Insecta(Koster et al., 2019).

Orden: Lepidóptera (Lopez Vaamonde, Agassiz, y Augustin, 2010).

Familia: Gracillariidae(Ellis, 2019).

Género: *Dialectica*(Ellis, 2019).

Nombre común: Polilla común(Ellis, 2019).

Morfología:

Larva, en su último estadio es de color rojo brillante. Esta aparece en el mes de primavera, se evidencia su presencia a partir del mes de marzo (Plataforma Belga de Biodiversidad ,2012).

Pupa, la pupación de la larva se realiza fuera de la mina (Ellis, 2019).

Adulto, puede alcanzar los 15 mm de tamaño, su cuerpo posee rayas blancas en forma transversal. El cuerpo es de color marrón al igual que sus patas. En sus alas traseras posee flecos de color marrón claro (Ellis, 2019).

Descripción: Es un micro lepidóptero originario de Tenerife. Su pieza bucal es una probóscide chupadora formada por las maxilas denominada espiritrompa. Sus larvas son los que causan la defoliación de las hojas(Plataforma Belga de Biodiversidad ,2012).

Daño provocado: en este caso lo ocasiona la fase juvenil, "Consisten en roturas marginales, irregulares, por una o ambos lados de la hoja, con pequeños o grandes agujeros, con presencia de hilos sedosos, con minas, galerías o túneles lineales y circulares, con cortes y enrollamientos de la lámina foliar. Si el daño es severo las defoliación puede ser muy importante" (Vega,2014).



Fig. 15 *Malva parviflora* L. (1758). Planta adulta con daño.

Distribución: Se localiza en Madeira y en las Islas de Tenerife, Las Palmas De Gran Canaria, La Palma y Lanzarote (Rebel, 1939).

5.3.4 *Dialectica scalariella*(Zeller 1950).



Fig. 16 Insecto adulto y larva.

Filo: Artrópoda(CSIC, 2008).

Clase: Insecta (Koster et al., 2019).

Orden: Lepidóptera(Johns y Hughes, 2002).

Familia: Gracillariidae(Johns y Hughes, 2002).

Género: *Dialectica*(Johns y Hughes, 2002).

Nombre común: Minador de hojas(Ellis, 2019).

Morfología:

Huevos, se colocan en la parte inferior de la hoja, son de alrededor de 0.32mm de tamaño y con forma de disco (Agassiz, 2005;Johns y Hughes, 2002).

Larva, tiene cinco fases, la larva en la primera etapa hace una galería de apenas 1 mm de ancho por debajo de la epidermis foliar, son muy característicos estos tipos de galerías de este primer estadio. Se alimentan de la sabia de la planta. La segunda etapa las larvas son de color verde y aumenta el ancho de las galerías a 7mm. Las larvas de la tercera etapa son similares a las de la segundo, salvo por el aumento en longitud que sufren, esta etapa e caracteriza porque las larvas se alimentan de la subepidermis y el mesofilo haciendo más evidente la presencia de la larva. La cuarta etapa la larva

desecha la forma anterior por una capsula de cabeza cilíndrica, tras esta muda las larvas se alimentan del mesofilo foliar. Por tanto la cuarta y quinta etapa prácticamente solo difieren en el tamaño larvario, causando el enrollamiento de la hoja y rotura de la hoja (Walsh', Woods, y Dodd', 1993).

Pupa, una vez finaliza el quinto estadio larvario le continua la pupa que crea un capullo de ceda de 8 mm de longitud por 5 mm de grosor, sobre de este capullo se crea otro más grande aun, pero la pupa se desarrolla en el más pequeño, posee una estructura denominada espiga que le sirve para romper el capullo y dar lugar a la forma adulta(Walsh', Woods, y Dodd', 1993).

Adulto, posee alas anteriores con anverso blanco y bordes gris oscuro que pasan de una forma recta a sinuosa. El tamaño del adulto es aproximadamente de unos 5mm(Agassiz, 2005;Johns y Hughes, 2002).

Descripción: Poseen dos pares de alas membranosos y su cuerpo y alas los tiene cubiertos de escamas. Su pieza bucal es una probóscide chupadora formada por las maxilas denominada espiritrompa. Sus larvas son los que causan la defoliación de las hojas(Agassiz, 2005;Johns y Hughes, 2002).

Daño provocado: en este caso lo ocasiona la fase juvenil, "Consisten en roturas marginales, irregulares, por una o ambos lados de la hoja, con pequeños o grandes agujeros, con presencia de hilos sedosos, con minas, galerías o túneles lineales y circulares, con cortes y enrollamientos de la lámina foliar. Si el daño es severo las defoliación puede ser muy importante" (Vega,2014).



Fig. 17 *Echium plantagineum* L.(1758). Plantula con daño.

Distribución: Se ha descrito su presencia en Inglaterra, en la Península Ibérica, Grecia, Croacia, en las Islas Canarias, en el norte de África, en el medio oeste de Turkmenistán, Australia y Nueva Zelanda. En Canarias se ha observado su presencia en las Islas de Tenerife y Gran Canaria(Gobierno de Canarias, 2004).

5.3.5 *Vanessa* sp.

De este género de lepidópteros se describen a continuación las 4 especies más abundantes en Canarias: *Vanessa atalanta*, *Vanessa cardui*, *Vanessa virginiensis* y *Vanessa vulcania*(García-Tejero, 1998). Destacando de todas ellas la *Vanessa atalanta* como especie principal escogida en este caso para el control biológico.

- *Vanessa atalanta* L. (1758):



Fig. 18 Mariposa adulta y larva.

Filo: Artrópodo (CSIC, 2008).

Clase: Insecta (Koster et al., 2019).

Orden: Lepidóptera (E. García, Romo, Y Sarto, 2015).

Familia: Nymphalidae (Dionisio, 2007).

Género: Vanessa (Dionisio, 2007).

Nombre común: Atalanta

Morfología:

Larva, crece durante la época de invierno. Una característica de este tipo de larva es que para protegerse del frío une varias hojas con la seda que produce. Las larvas atraviesan diferentes fases aumentando su tamaño (García-Tejero, 1998).

Pupa, por lo general son de color marrón claro y cuando ya se encuentran próximas a la eclosión el color se vuelve marrón oscuro (García-Tejero, 1998).

Adulto, posee ojos grandes compuestos, es capaz de producir dos generaciones en un año. Tiene vuelos muy rápidos con unos colores blancos en las partes apicales de las alas y franjas anaranjadas hacia la zona del medio, intercalando se con colores marrones y negros. Su tamaño oscila entre los 6 y 8 cm (García-Tejero, 1998).

Descripción: Es una mariposa que emigra desde el norte cuando las temperaturas son más cálidas en el sur. El apareamiento tiene lugar en los meses de otoño- invierno. Es una mariposa de habito diurno. Su aparato bucal es una especie de trompa denominada probóscide con el que chupa el néctar de las flores y el alimento. Su ciclo biológico atraviesa 4 fases (García-Tejero, 1998).

Daño provocado:La hembra de la especie *Vanessa atalanta* realiza la puesta en las inflorescencias, donde al eclosionar los huevos las pequeñas larvas se van alimentando de los capítulos, formando pequeños bolsones, para posteriormente nutrirse de los tallos y de las epidermis foliares, impidiendo la fructificación y formación de semillas, causando un control biológico importante.



Fig. 19 *Gnaphalium luteo-album* L. (1758). Planta adulta con daño.

Distribución en Canarias: Se localiza en todas las Islas del Archipiélago hasta una altitud máxima de 2000 metros sobre el nivel del mar(Gobierno de Canarias, 2004).

- *Vanessa cardui* L. (1758):



Fig. 20 Mariposa adulta.

Filo: artrópodo(CSIC, 2008).

Clase: Insecta (Koster et al., 2019).

Orden: Lepidóptera(Fernandez, 2006).

Familia: Nymphalidae(Fernandez, 2006;Vieira 2017).

Género: Vanessa(Fernandez, 2006).

Nombre común: Cardera(Canarias, 2019).

Morfología:

Huevos, tardan dos semanas en eclosionar. La hembra los coloca en aquellas planas en las que exista una abundante cantidad de néctar (Fernandez, 2006).

Larva, pasa más o menos 7 días alimentando se y luego se convierte en crisálida, dicha crisálida transcurridos 10 días da lugar al adulto (Fernandez, 2006;Vieira 2017).

Adulto, es de gran tamaño aproximadamente 9 cm y posee los bordes de las alas de color blanco y negro con círculos de color naranja (Fernandez, 2006).

Descripción: Su aparato bucal es una especie de trompa denominada probóscide con el que chupa el néctar de la flores para alimentarse (Fernandez, 2006).

Distribución en Canarias: Se ha observado en todas las Islas del archipiélago, sobre todo en zonas de climas cálido (Gobierno de Canarias,2004).

- *Vanessa virginiensis* Drury (1773):

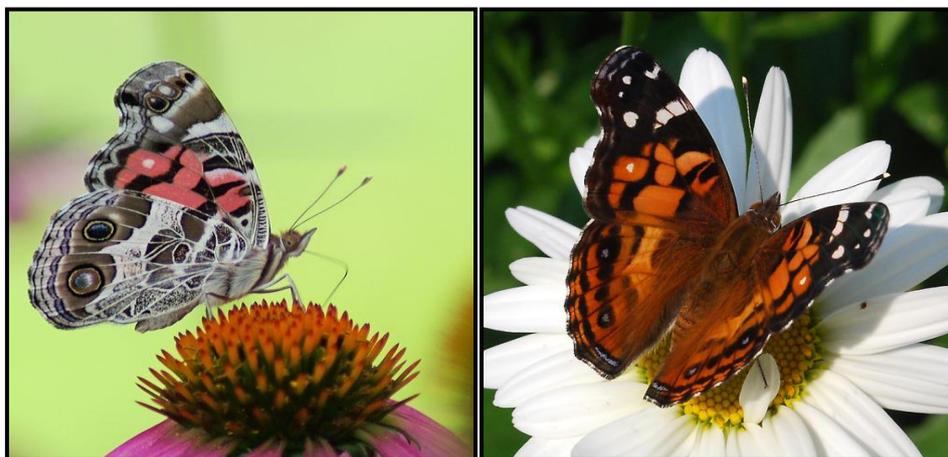


Fig. 21 Mariposa adulta por anverso reverso.

Filo: artrópodo(CSIC, 2008).

Clase: Insecta (Biopedia, 2012).

Orden: Lepidóptera(Vieira, 2017).

Familia: Nymphalidae(Vieira, 2017; Pereira, 2017).

Género: Vanessa(Vieira, 2017).

Nombre común: Vanesa americana(Gobierno de Canarias,2004).

Morfología:

Huevos, son de color blanco claro y la hembra los coloca de forma individual en diferentes plantas hospederas. Su tamaño máximo ronda los 7 cm y por su parte superior son de color naranja con rasgos castaños, los bordes de sus alas son negros con manchas blancas (Pereira, 2017).

Larvas, son de color oscura con manchas negras y espigas cortas. Su ciclo transcurre dentro de una red de seda que teje a su alrededor cogiendo varias hoja (Pereira, 2017).

Pupas, son de un color grisáceo y anidan dentro de la estructura creada por las larvas(Pereira, 2017).

Adulto, los huevos los deposita en brotes jóvenes y en el envés de la hoja(Vieira, 2017).

Descripción: Su aparato bucal es una especie de trompa denominada probóscide con el que chupa el néctar de la flores y el alimento (Pereira, 2017).

Distribución en Canarias: Se localiza principalmente en zonas montañosas, localizando se en las islas de: Tenerife, la Gomera, El Hierro, Las Palmas de Gran Canarias y La Palma(Gobierno de Canarias,2004).

- *Vanessa vulcania* Godart (1819):



Fig. 22 Mariposa adulta.

Filo: artrópodo(CSIC, 2008).

Clase: Insecta(Biopedia, 2012).

Orden: Lepidóptera(Mitca, 2019).

Familia: Nymphalidae(“Red naturaleza,” 2019)

Género: Vanessa(Mitca, 2019).

Nombre común: Vanessa indica Canaria (“Red naturaleza,” 2019)

Morfología:

Huevos, son de un tamaño pequeño circulares y su color, varia con la edad. Las puestas suelen ser muy numerosas (Canarias, 2019; Fernández, 2006).

Larva, pasa por varios estadios de cambio de muda, suelen ser alargadas con la cabeza dota de mandíbulas, son de color marrón oscuro o negras brillantes.

Tienen todo su cuerpo rodeado de púas como medio de defensa para los depredadores estas púas son visibles en la oruga de color verde oscuro y negro con manchas amarillentas con tonos claros(Canarias, 2019).

Crisálida, quedan suspendidas de las ramas o de hojas por un hilo de seda, suelen ser de color verde con toque metálicos y que cambian a colores oscuros previo a la eclosión(“Red Naturaleza”, 2019).

Adulto, su tamaño está entre los 54-60 mm de envergadura de alas. El haz de las alas inferiores posee un color marrón oscuro con el margen aserrado y una zona próxima al margen con manchas negras. En el principio de la área roja posee dos manchas de color azul y el envés de ala es de color marrón oscuro con el borde grisáceo(Canarias, 2019).

Descripción: Es una mariposa originaria de la Macaronesia, en Canarias es un endemismo de los bosque de Laurisilva (Fernández, 2006;Canarias, 2014).

Distribución en Canarias: Se localiza en las islas de Tenerife, La Gomera, La Palma, Las Palmas de Gran Canaria y El Hierro(Fernández, 2006).

5.3.6 *Nemorimyza maculosa* Malloch (1913).



Fig. 23 Insecto adulto y larva.

Filo: Artrópoda(CSIC, 2008).

Clase: Insecta (Biopedia, 2012).

Orden: Díptera(Universidad de Florida, 2019).

Familia: Agromyzidae(Universidad de Florida, 2019).

Género: Nemorimyza(Universidad de Florida, 2019).

Nombre común: Minero de hoja(Biopedia, 2012).

Morfología:

Huevos, son ovalados de color blanco claro y se vuelven más oscuros en fechas próxima a la emergencia. Su tamaño oscila entre 0.33 y 0.34 mm. Los huevos tardan dos días en eclosionar(Enríquez, Castillo, y Rodríguez, 2014).

Larva, tienen un color amarillo claro y miden aproximadamente 3 mm de largo, son las que provocan el daño creando túneles en las hojas. Por lo que son fáciles de observar las larvas(Weems et al., 1999). Pasa por tres estadios, con la principal diferencia del tamaño de la larva. Tardan aproximadamente 14 días en emerger.

Pupas, suelen tener un color marrón oscuro y la cabeza de color negro, su tamaño es de aproximadamente unos 2 mm. La larva para entrar en la fase de pupa sale de la galería y pupan en el suelo (Cabello, Barranco, y Torres, 1997)

Adulto, es de color negro brillante de pequeño tamaño, con alas casi transparentes, su tamaño ronda los 2.2- 2.7 mm. Las hembras colocan los huevos bajo la epidermis del tallo. Completan su ciclo biológico en 21 días aproximadamente (Cabello, Barranco, y Torres, 1997; Aguiar y Biscoito, 2006).

Descripción: Poseen un solo par de alas membranosas, las piezas bucales son del tipo chupador, en forma de probóscide.

Tienen protórax y metatórax pequeño y fusionados en un mesotórax de gran tamaño. Sufren una metamorfosis completa (Cabello, Barranco, y Torres, 1997). Es un díptero originario de Madeira.

Daño provocado: en este caso tanto el adulto como su fase larvaria provocan daños que "Consisten en pequeñas lesiones epidérmica de alimentación con decoloración por ingestión de la clorofila, posterior entrada de aire que da aspecto brillante, posterior necrosis con aspecto plateado o bronceado que puede terminar con la caída de las hojas o marchitez de éstas. Se pueden producir deformaciones, agallas o ampollas, manchas necróticas, etc." (Vega, 2014).



Fig. 24 *Bidens pilosa* L. (1758). Daño en plántula y adulta.



Fig. 25 *Conyza sumatrensis* L. (1758). Daño en planta adulta.

Distribución: Ampliamente distribuida por todos Los Estados Unidos con mayor incidencia en centro America, por los Países bajos , Eslovenia y Canarias(“Bases de Datos Global de La EPPO”, 2018).

5.4 Ubicación del Estudio.

En el desarrollo de la idea inicial de poder controlar plantas adventicias mediante insectos, se hace necesario conocer más acerca de los insectos y de las plantas que consideramos como perjudiciales. Para ello a lo largo de varios meses se recogieron muestras de plantas adventicias con los posibles agentes de control biológico.

La parte experimental del ensayo se llevó a cabo en el laboratorio ubicado dentro de la Escuela Politécnica Superior de Ingeniería Agraria, en la carretera General de Geneto. La parte de campo del ensayo lo podemos ubicar dentro de lo que sería todo el municipio de San Cristóbal de La Laguna, a lo largo de todo el municipio se fueron escogiendo y recogiendo las plantas necesarias en los distintos parque y jardines que se nombran a continuación.

Parque La Constitución, ubicado en la calle Quintín Benito.

Parque Pedro González, ubicado en la calle Concepción Salazar.

Parque Los Dragos, ubicado en la calle Pedro Zerolo.

Parque de San Benito, ubicado en la calle Leopoldo de la Rosa Olivera.

Parque Polvorín de Taco, ubicado en la calle La Cuesta- Taco s/n, Taco.

Parque Tecnológico y Científico Las Mantecas.

Parque El Roció, ubicado en la calle Rector José Escobedo y Glez. Abreu.

Rotonda Padre Anchieta.

Se escogieron dichos parques porque se contaba con la información previa de la localización de las especies vegetales en los parques propuestos. La información fue cedida por el Dr. Ingeniero Agrónomo Antonio Siverio Núñez.



Fig. 26. Ubicación a grandes rasgos de los distintos parques.

5.5 Identificación de la plaga.

Una vez se comienza la recolección de las plantas adventicias objeto de control, en campo se deben de observar el grado de infestación de dichas plantas. Para ello se establece un rango de control de las plantas por parte de los insectos, este rango va desde 1 que sería el menor grado de infestación hasta 5 que es el máximo grado de infestación. Se debe anotar este rango porque con este rango se determinará si los insectos son los enemigos naturales óptimos de esa especie vegetal.

Todos los enemigos naturales se recolectaron en el máximo número posible con el fin de aumentar la representación de la variabilidad genética. Dichos enemigos recolectados en el campo se les suministra alimento, espacio y aire para evitar su muerte en el traslado desde el campo hasta el laboratorio.

Una vez llegan los insectos al laboratorio se colocan en recipientes de cristal previamente desinfectados, se introducen en esos recipientes de cristal y se les añade comida. Para evitar la pérdida de estos insectos de los recipientes de vidrio se debe colocar una tapa, con un papel especial que permita la entrada de aire al recipiente.

Estos recipientes se colocan en un lugar en el cual no reciban la luz del sol directa, pero que este bien aireado y que no se moje. Tras esto se comprueba periódicamente el estado de los insectos y se les añade comida en el caso de que fuese necesario. El evolucionario como su nombre indica se mantiene hasta que los enemigos naturales recolectados alcanzan su estado adulto.

Una vez los insectos alcanzaban la forma adulta se recolectaron en micro tubos y se colocaron en la nevera para posteriormente enviarlos al laboratorio de análisis genético.

En el laboratorio las muestras son sometidas a 4 procesos:

Proceso número 1, extracción de ADN.

Proceso número 2, amplificación de ADN mediante PCR.

Proceso número 3, electroforesis

Proceso número 4, secuenciación

5.6 Protocolo de Extracción de ADN.

El primer protocolo es la extracción de ADN mediante la lisis de las moléculas, para ello se emplea el equipo de E.Z.N.A. Insects DNA Kit Protocols y a continuación se describirán todos los procedimientos y materiales necesarios para el desarrollo del protocolo.

1. Protocolo:

1.1. Materiales y equipamiento necesario:

1.1.1.1. Micro centrifuga capaz de alcanzar al menos 14.000 g.

1.1.1.2. Tubos de microcentrifuga de 2 ml de capacidad.

1.1.1.3. Baño de agua, incubadora o bloque de calor capaz de producir al menos 70°C.

1.1.1.4. Vortex.

- 1.1.1.5. Agua des ionizada estéril.
- 1.1.1.6. Cloroformo
- 1.1.1.7. Etanol al 100%
- 1.1.1.8. Nitrógeno líquido
- 1.1.1.9. Toallitas de papel.

1.2. Premisas previas: antes de comenzar el proceso se deben de realizar dos muestras en dos micro tubos, una de agua des ionizada y otra de lavado de ADN buffer, ambas se deben colocar en la cuba de calor a 70°C hasta su utilización posterior.

2. Procedimiento:

2.1. Moler 50 mg de muestra fresca tras sacar del nitrógeno líquido. Se muele dentro del propio eppendorf para evitar posibles contaminaciones de la muestra o mermas en la misma.

2.2. Se debe añadir 350micro litro de P1 Buffer, se coloca en el vortex para su mezclado.

2.3. Se incuba la muestra durante 30 minutos a 60°C. Se debe mezclar la muestra al menos dos veces durante la incubación invirtiendo el micro tubo.

2.4. A la muestra se añade 350micro litro de la solución de cloroformo (isoamyl cloroformo) y se coloca en el vortex unos segundos.

2.5. Centrifugar la muestra durante 2 minutos a 10.000g.

2.6. El lisato obtenido se traspasa a un nuevo micro tubo de 1.5 ml. Al coger la muestra con la pipeta solo se debe coger la parte más clara del lisato, teniendo cuidado de no coger la parte sólida. Se debe medir o contar la cantidad de lisato que se toma del primer tubo.

2.7. Se añade 2 micro litro RNase y un volumen de BL Buffer. Se coloca en el vortex a máxima potencia durante 15 segundos.

2.8. Incubar a 70° C durante 10minutos.

2.9. Añadir 300 micro litro de etanol al 100%. Se coloca en el vortex 15 segundo.

2.10. Colocar una HiBind DNA Mini Columna de 2 ml en un micro tubo.

2.11. Transferir toda la muestra a la mini columna.

2.12. Centrifugar la muestra durante 1 minuto a máxima potencia.

2.13. Desechar el filtrado y el pasar la muestra a un nuevo tubo de 2ml y desechar el tubo ya utilizado.

- 2.14. Añadir a la muestra 650 micro litro de DAN wash Buffer.
 - 2.15. Repetir las 3 últimas operaciones dos veces.
 - 2.16. Pasar la HiBind DNA Mini Columna a un nuevo micro tubo de 2 ml.
 - 2.17. Añadir a la muestra entre 500 micro litro de Elución Buffer.
 - 2.18. Centrifugar la muestra a máxima potencia durante 30 segundos.
 - 2.19. Descartar el filtrado y reutilizar el tubo.
 - 2.20. Añadir 700 micro litro de DNA Wash Buffer.
 - 2.21. Centrifugar a máxima potencia durante 1 minuto.
 - 2.22. Desechar el filtrado reutilizar el tubo.
 - 2.23. Repetir los pasos 2.20 y 2.21.
 - 2.24. Centrifugar la mini columna durante 2 minutos a máxima potencia hasta que se seque la columna.
 - 2.25. Transferir la muestra de la mini columna a un micro tubo limpio de 1.5 ml.
 - 2.26. Añadir 50-100micro litro de elución de buffer y agua des ionizada a 70°C.
 - 2.27. Reposar a temperatura ambiente 2 minutos.
 - 2.28. Centrifugar a máxima potencia 1 minuto.
 - 2.29. Repetir los pasos 2.26-2.28.
 - 2.30. Conservar el DNA a -20°C.
3. Con el proceso descrito anteriormente ya se tiene el ADN del insecto retenido en un micro tubo, el siguiente paso es la amplificación de dicha muestra para que en el proceso final de electroforesis sea posible visualizar el máximo de ADN.

5.7 Ampliación de ADN mediante PCR.

5.7.1 Materiales necesarios para realizar la PCR:

- Solución tampón para PCR.
- Agua.
- Nucleótidos (solución stock de 2.5mm).
- Cloruro de magnesio.
- Taq ADN Polimerasa (2.5 U/ micro litro).
- Cebadores (solución stock 100 micro litro, solución de uso 10 microlitro).
- Pipetas y puntas de pipetas.
- Tubos de PCR.
- Centrifuga para tubos de PCR.

5.7.2 Preparación pre-PCR.

En la PCR estándar es necesario preparar una mezcla de pre-PCR base compuesto por:

- Tampón de PCR.
- Agua mili-Q.
- Nucleótidos.
- Taq- ADN polimerasa.
- Cebadores.

Esta mezcla inicial no contiene el ADN molde, que se coloca por separado en tubos independientes.

El volumen total de mezcla pre-PCR va en función del número de reacciones de PCR que se tenga previsto llevar a cabo, siendo el volumen para una sola PCR 30 micro litro. Se prepara el número necesario de mezcla más dos de reserva. Una de ellas servirá como control negativo la cual lleva agua en lugar de ADN y la otra reacción extra sirve para evitar posibles problemas de pipeteo.

El volumen de ADN que llevara cada reacción a depender de la cantidad de ADN de partida, el volumen habitual es de 1 a 10 micro litro de ADN, a una concentración de entre 1-100mg/l. La cantidad de ADN será proporcional en este caso a la concentración de ADN, ya que se añade agua hasta alcanzar los 30 micro litro de volumen final.

5.7.3 Proceso de Amplificación.

1. Determinar el número de muestras objeto de amplificación y realizar las dos reacciones extras, se calcula el volumen de cada componente y se pipetea en tubos eppendorf de 1.5 ml. Se debe mezclar bien con la ayuda de la pipeta, continuación con el vortex y se coloca en hielo.
2. Es necesario preparar un tubo PCR de 0.2 ml para cada muestra y un tubo extra para las muestras de control.
3. Añadir el volumen de ADN requerido para tubo. En la muestra control negativo se añade el mismo volumen, pero de agua.
4. Añadir el volumen necesario de la mezcla madre del paso 1 a cada tubo PCR.
5. Cerrar los botes correctamente.
6. Se colocan en la centrifugadora para asegurarse de que todos los reactivos se acumulan en la parte inferior del tubo.
7. Los reactivos sobrantes se deben guardar a temperatura de 20° C.
8. Se colocan los tubos en el Termociclador.
9. Iniciar programa para comenzar el proceso de amplificación de inmediato.

10. Retirar las muestras del Termociclador una vez finalizado el programa.
11. El ADN amplificado se debe llevar a la zona post-PCR.
12. Para determinar el éxito de la PCR y su concentración se deben realizar el proceso de Electroforesis en "Gel de Agarosa".

5.8 Protocolo de Electroforesis.

Una vez realizado el protocolo anterior se pasa al protocolo de electroforesis, en este caso partimos de una muestra de ADN purificada y homogeneizada.

1. En primer lugar, se debe realizar una puesta a punto de las muestras, para ello se debe hacer:
 - 1.1. Se deben ajustar las concentraciones de ADN.
 - 1.2. Adición del tampón de carga, se usa un BUFFER mixto 6X (azul de Bromofenol y XyleneCyanol).

Los buffers de carga facilitan la visualización y sedimentación de los productos de PCR, en los pozos para lo cual se emplean distintos tipos de colorantes, cada uno de ellos exhibe un patrón de migración.

- 1.2.1.1. El glicerol se usa para dar densidad a las muestras concentradas en los pocillos haciendo que no se extienda por la cuba de electroforesis.
 - 1.2.1.2. XyleneCyanol es una marcadora de la cola de la electroforesis.
 - 1.2.1.3. Orange G, es el marcador del frente de avance de la electroforesis.

1.3. Procedimientos:

- 1.3.1.1. Se delimita el tamaño del recipiente donde se va a formar el gel y se encaja el formador de gel apretando por los laterales.
 - 1.3.1.2. Se coloca el peine, este dependerá del número de muestra que se realicen.
 - 1.3.1.2.1.1. El primer hueco se empleará para el marcador de peso molecular.

2. Preparación del gel de Agarosa.

- 2.1. Preparación del tampón.
 - 2.1.1.1. El pH es alcalino para que todos los grupos fosfatados del ADN estén ionizados y esté se mantenga cargado positivamente, pH=7,5.
 - 2.1.1.2. Pasamos a concentración de 1X, porque el producto viene en 50X.

2.1.1.3. Medimos en una probeta la cantidad TAE (1X) que se produjo en el paso anterior y la pasamos a una probeta de medio litro.

2.1.1.4. Enjuagar la probeta TAE(1X) 3 veces con agua Mili-Q y verter el contenido a la de medio litro para arrastrar todo el producto.

2.1.1.5. Enrasar con agua des ionizada hasta alcanzar el medio litro, lo que sería lo mismo que añadir 490 ml de agua Mili-Q

2.2. Preparación del Gel.

2.2.1.1. Su preparación más habitual es al 1%. A mayores concentraciones de agarosa las retículas son más pequeñas, es decir el ADN se encuentra en proporciones más pequeñas y por tanto facilita su separación. Para el ensayo se prepara 50 ml de gel de agarosa al 1%, se requieren 0.5 g de agarosa.

2.2.1.2. Procedimiento:

2.2.1.2.1.1. Se pesa la agarosa y se coloca en un vaso de precipitado

2.2.1.2.1.2. Se añade los 50 ml de TAE 1X y se calienta al microondas, hasta llegar a ebullición y una vez se produzca sacar del microondas.

2.2.1.2.1.3. Se añade el colorante de ADN (Gel Red) en el recipiente de agarosa Para hacer el caculo se debe tener en cuenta que está a 10.000X; pero funciona considerando que está a 20.000X. Para nuestro ensayo usamos 50ml de gel y queremos llevarlo a concentración 1x por lo que aplicamos la formula y se obtiene que se necesita 2.5 ml de Gel Red(1X).

2.2.1.3. Se vierte el Gel de agarosa y se espera hasta que solidifique, el tiempo estimado es de media hora.

2.2.1.4. Se comprueba que es correcto y con una pipeta tocamos ligeramente

2.2.1.5. Se retira el peine lo más perpendicular posible para evitar roturas en los posillos.

2.2.1.6. Se comprueba que el nivel de TAE es el deseado (1X) en la cubeta.

2.2.1.7. Se colocan las muestras en los posillos con la pipeta y se debe tener en cuenta que el primero y el ultimo van los marcadores de peso molecular o también llamados escaleras.

2.2.1.8. Se tapa la cubeta y se debe de tener en cuenta el lado positivo y el lado negativo para que la carrera salga correcta.

2.2.1.9. Se pone en marcha la cubeta y se ajusta el voltaje a 100V y un amperaje de 120-150 mA.

- 2.2.1.10. Se debe de ir observado el frente de avance de la electroforesis esto es posible gracias a los marcadores amarillos y azules.
- 2.2.1.11. Se finaliza el proceso cuando ya ha avanzado hasta la siguiente tanda de posillos, se apaga la cuba y se retira el Gel.
- 2.2.1.12. Se coloca el Gel en el transiluminador, que será lo que permita observar la electroforesis en el ordenador.

5.9 Protocolo de secuenciación.

La secuenciación o alineamiento son las comparaciones que se realizan de dos o más secuencias de DNA O proteínas. Esto nos permite resaltar las zonas similares de las secuencias, para posteriormente poder analizar la cadena de consenso y así poder identificar el individuo de una forma segura y correcta. El origen de la secuenciación comenzó con Walter Fiers en 1976 y colaboradores, pero no es hasta Sanger et al (1997a), cuando esta técnica resulta revolucionaria.

Para realizar el método de secuenciación existen dos formas a través del método manual o a través de método automático. Para el método automático no radiactivo existen dos posibilidades, la electroforesis con gel de poliacrilamida y la electroforesis capilar. En ambos métodos el ADN que va a ser secuenciado cumple la función de molde para la síntesis enzimática de un nuevo ADN que empezando por el lugar definido por el cebador. En la reacción se emplea una mezcla de desoxinucleótidos y didesoxinucleótidos con concentraciones que producen una probabilidad finita de que un desoxinucleótido se añada en el lugar del correspondiente desoxinucleótido en cada lugar de la cadena que se está sintetizando. Al añadir el desoxinucleótido se bloquea la elongación de la cadena provocando un conjunto de fragmentos de ADN con varias longitudes. La identidad del nucleótido que finaliza la cadena en cada posición se puede establecer realizando 4 reacciones de elongación separadas con un didesoxinucleótidos y un cebador que es el que señala a través de una fluorescencia. Resulta vital el marcado con fluorescentes para poder observar el ADN en la electroforesis. El conjunto de moléculas que se obtiene se clasifican en función del tamaño con electroforesis en geles de poliacrilamida.

Para determinar la secuencia se relaciona los fragmentos de la electroforesis con el desoxinucleótido que termina cada fragmento.

Empleando la electroforesis con geles de poliacrilamida se pueden hacer lecturas de bases más extensas, sin embargo, es un proceso que conlleva riesgos para la persona por trabajar con un producto tóxico además de ser un procedimiento largo y costos en cuanto a trabajo se refiere. Por otro lado, el método de electroforesis por capilaridad permite ir mucho más rápido porque es automático (Valdemar, Díaz, and Flores, 2011).

En este caso la decantación es por la secuenciación automática, a continuación, se describirá todo el proceso necesario y el protocolo que se debe seguir.

Se requieren de moldes para la secuenciación automática existen dos tipos, pero para el proyecto se empleó:

1. Fragmentos de PCR.
 - 1.1. Resultados de PCR de cadena simple, se obtienen de reacciones de PCR, con gran cantidad de un primer.
 - 1.2. Resultados de PCR de cadena doble, se obtienen de reacciones de PCR, que poseen la misma cantidad de cada primer.

2. Preparación del ADN molde.
 - 2.1. El primer paso es conseguir el ADN molde, que los resultados sean bueno o malos está directamente relacionado con pureza y optima cuantificación del ADN molde conseguido. Para tener un buen ADN molde se deben seguir unas pautas que se enumeran a continuación.
 - 2.1.1.1. La purificación del ADN plasmídico obtiene excelentes resultados empleando columnas minis.
 - 2.1.1.2. Para purificar al máximo la muestras esta se debe de pasar dos veces por las columnas limpias y retirar así cualquier impureza posible. El ADN se debe enjuagar con agua precalentada a 50°.

2.2. Segundo paso los productos de la PCR se deben limpiar para evitar errores en la secuenciación, en esta limpieza se pretende eliminar posibles trazas de subproductos, cebadores y otros contaminantes.

2.3. Para conseguir la precipitación del ADN se pueden emplear dos tipos de reactivos diferentes. Se puede hacer con acetato de amonio o con etanol y acetato sódico.

2.4. En los supuestos que se obtienen más de un producto en la amplificación se debe emplear el protocolo de electroforesis en gel de agarosa para así separar la banda de interés.

3. Protocolo propuesto para el kit de mini preparación de Qiagen en la purificación de ADN plasmídico.

3.1. Realizar la electroforesis al producto de la PCR llevada a cabo en gel de agarosa.

3.2. Cortar la banda requerida.

3.3. Cuantificar la porción de gel de agarosa.

3.4. Poner 3 veces el volumen de la solución QXI del kit de miniprep de Qiagen.

3.5. Para disolver el fragmento se coloca en agua a 50° por lo menos 10 minutos y mover la muestra cada dos minutos para que se caliente de forma homogénea.

3.6. Ya disuelta la muestra se añade 0.1 volumen de isopropanol puro, se deben mezclar por inversión.

3.7. Colocar la mezcla en las columnas que contiene el kit

3.8. Centrifuga el concentrado a 4000 rpm al menos 1 minuto.

3.9. Se debe lavar la muestra con 750 micro litro de solución PE contenida en el Kit y colocar de nuevo en la centrifugadora durante un minuto.

3.10. Para eliminar los restos de líquido que puedan quedar se centrifuga la muestra a 13000 r.p.m. al menos 1 minuto, como mínimo dos veces y en cada parada retirar el líquido que se obtenga.

3.11. Trasladar la columna a un nuevo tubo limpio y lavar el ADN con 25 micro litro de agua-miliQ, previamente calentada a 50°, centrifugar a 1300 r.p.m. durante un minuto y recolectar el ADN obtenido.

3.12. Por último, se debe hacer recuento de la cantidad de muestra obtenida del gel de agarosa y conservar a 4° durante un tiempo máximo de 4 días, en caso de que sea necesario una conservación más larga se debe hacer a -20°.

CARACTERIZACIÓN GENÓMICA Y/O MORFOLÓGICA DE INSECTOS ÚTILES EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE PLANTAS ADVENTICIAS



Fig. 27 Materiales empleados en los protocolos.

5.10 Caracterización genómica de los hiperparásitos propuestos del reino animal.

5.10.1 Chromas.

El Chromas es un programa informático que nos muestra las bases en un cromatograma (secuencia en forma de picos). Esto nos permite analizar las diferentes bases y ver si el programa ha sido capaz de identificar todas las bases o existen puntos de la base que no reconoce. Es importante analizar las bases en este programa, porque las bases que el programa no es capaz de identificar, el analizador es posible que si la reconozca dando se la posibilidad de añadirla.

En este programa se produce un proceso importante, el cambio de formato original a formato Fasta, es un formato universal empleado en el resto de software que son necesarios. Una vez se tiene el documento en formato FASTA, ya está listo para pasarlo al siguiente programa, el Clustal Omega (Fernando, 2014).

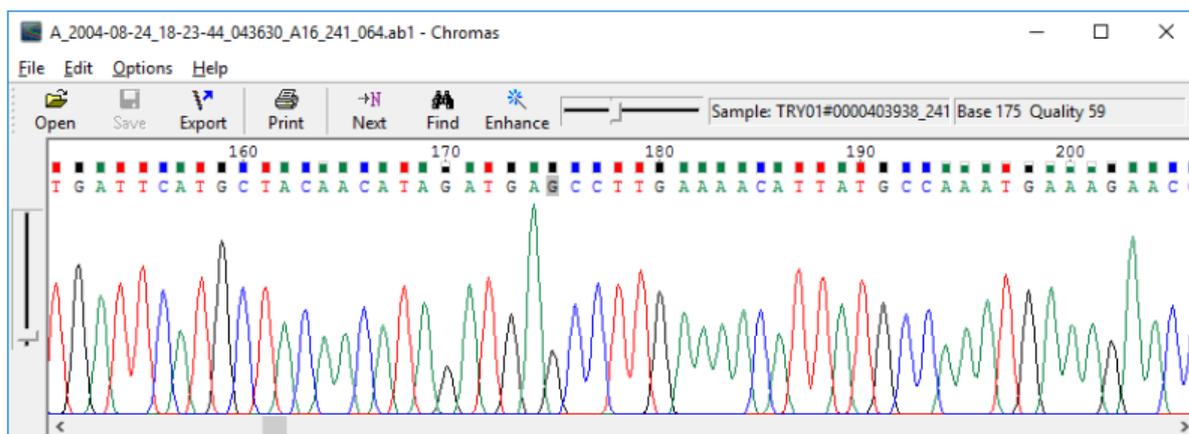


Fig. 28 ejemplo de cromatograma.

5.10.2 Clustal Omega.

El Clustal Omega, que es una herramienta que permite la secuenciación de 3 o más secuencias, nos permite comprobar que características se repiten. También nos permite comprobar que regiones son las que se mantienen en mayor cantidad y es una herramienta que facilita en gran medida el análisis filogenético.

Como, por ejemplo, las sustituciones que han ocurridos a lo largo de la evolución del tiempo o las relaciones evolutivas entre las secuencias.

A continuación, se explicará de forma breve como se usa el programa.

En primer lugar, se deben introducir los datos en el fichero con las secuencias y en el formato FASTA.

Segundo paso seleccionar el alineamiento o secuenciación, y escoger la opción de Alineamiento múltiple.

Para la salida de las secuenciaciones dispone de varios formatos, en este caso se selecciona para llevar, de esta forma los datos se envían al correo deseado.

El programa nos da unas puntuaciones de las comparaciones entre las secuenciaciones, y en la parte inferior de cada secuenciación se muestra una simbología en el caso de mostrar se asterisco, esto indica que existe coincidencia entre las dos cadenas de secuenciación comparadas. Si en su lugar muestra dos (:) puntos indica que existe una conservación fuerte, si se muestra un solo punto la conservación existente es débil y por ultimo si lo que aparece es un espacio, no existe coincidencia entre las cadenas (Sievers y Higgins, 2014).

5.10.3 Blast

El Blast es un programa informático que a través de la introducción de la cadena consenso obtenida en le Clustal Omega, podemos identificar el individuo objetó de estudio (Zhang, Schwartz, Wagner, & Miller, 2000).

1. Introducir la cadena consenso.
2. Establecer unos parámetros por defecto para el análisis.
3. Comenzar el análisis.
4. Obtener el nombre científico del individuo analizado.
5. Comprobar el grado de igualdad, la puntuación máxima y el quality, para determinar de todos los resultados obtenidos cual es el más acertado.
6. Acudir al Gen Bank para cerciorar la información y obtener bibliografía sobre los autores que propusieron esa secuencia para ese individuo.

5.10.4 Gen Bank.

El GenBank, es una base de datos disponible para todos los ciudadanos, que reúne una amplia colección de secuencias de nucleótidos, recogidas a partir de más de 300.000 especies. En esta base de datos no solo poseen la secuenciación de los nucleótidos, sino que además posee información bibliográfica, anotaciones funcionales y en el caso de tener una secuencia codificante es capaz de traducirlo de forma conceptual a proteína (Fraile, 2019).

La gestión y distribución del GenBank se encarga el Centro Nacional de Información Biotecnológico en los Estados Unidos. De forma conjunta con la ENA (*European Nucleotide Archive*) y el DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*).

El tamaño mínimo exigido para considerar una secuencia de nucleótidos es de aproximadamente 50, para poder garantizar la veracidad de los resultados.

Gracias a esta base de datos ha sido posible la identificación de los insectos que puedan ejercer un control biológico de las plantas adventicias seleccionadas.

5.11 Insectario.

Como ya se ha explicado con anterioridad en este el proyecto fin de grado, se realizó un evolucionario o insectario. A continuación, se darán los fundamentos de cómo se llevó a cabo.

1. Troceado de la planta recolectada en campo.
2. Ubicación en los botes correspondientes, previamente desinfectados en la autoclave.
3. Sellado de los recipientes con papel vegetal, que permite la respiración del insecto.
4. Recolección del adulto, para su posterior identificación y análisis.



Fig. 29 procedimiento requerido para insectario.

6 Resultados y discusiones.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos tras desarrollar el estudio de control biológico de plantas adventicias con insectos. Lo primero que se muestra son los resultados de realizar el análisis genómico a 1 especie de insecto desconocido. Los siguientes resultados son los que se obtienen en campo tras la observación de la plaga insitu y tras el cultivo de las plantas en el evolucionario/ insectario, para obtener las formas adultas y proceder a su identificación.

6.1 Análisis Genómico.

Se ha realizado el análisis genómico a 1 insecto totalmente desconocido. Para el análisis genómico se utilizaron los protocolos anteriores de identificación y se obtuvieron los siguientes resultados.

6.1.1 Resultados de la muestra *Hypera postica* Gyllenhal (1813):

Resultado obtenido de la secuenciación en sentido anverso y reverso (5'-3' y 3'-5') estas bases alineadas se obtienen del secuenciador para posteriormente poder realizar una comparativa en el software Clustal Omega

```
CCCTCCACCAGCAGGATCAAAAAGGAAGTATTAATATTTTCGATCTGTAA  
AAGNNNNNNNNNGCTCCAGCAAGTACGGGTAATGATAAAAGTAANAAA  
TAGCAGTAATTTTACTGCTCAGATAAATAAAGCTATTTTGTCTAAAGATAT  
ACCAGAAGGTCGTATATTTAACACAGTTGAAATAAAGTTAATAGCACCTAA  
AATAGAAGATACACCAGCTATATGCAAATAAAAATTGCTAAATCAACAGA  
AGATCCTTCATGGGCAATATTTCTTGATAAAGGTGGGTAAACTGTTTCATCCT  
GTTCTGCTCCTCTATCAACTATTCTTCTTATTAAGAAGTGATAAAGAAG  
GGGAAGAAGCCAAAATCTTATATTATTAACGAGGAAAAGCTATATCAG  
GGGCTCCAATATTAGTGGTACTAGTCAATTTCCAATCCTCCAATTATAAT  
TGGTATAACTATAAAAAAATTATAATAAATGCATGAGCTGTAACAATCGT  
GTTATAAATTTGGTCATTTCCAATTAAGATCCAGGATTTCTTAATTCTGTA  
CGAATTAATAATTCTTAAGCTTGTTCCGACTGTTCTGCTCATGTCCCAAAA  
TAAAATATAAAGTTCCAATATCTTTATGATTTGTTGACCA
```

TTAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCAAATAAATGTTGATATAAAAATTGG
GTCCCCTCCACCAGCAGGATCAAAAAGGAAGTATTAATATTTTCGATCTGTT
AAAAGTATTGTAATAGCTCCAGCAAGTACGGGTAATGATAAAAAGTAATAAA
ATAGCAGTAATTTTTACTGCTCAGATAAATAAAGCTATTTTGTCTAAAGATA
TACCAGAAGGTCGTATATTTAACACAGTTGAAATAAAGTTAATAGCACCTA
AAATAGAAGATACACCAGCTATATGCAAATAAAAATTGCTAAATCAACAG
AAGATCCTTCATGGGCAATATTTCTTGATAAAGGTGGGTAAACTGTTTCATCC
TGTTCCCTGCTCCTCTATCAACTATTCTTCTTATTAAGAAGTGATAAAGAA
GGGGGAAGAAGCCAAAATCTTATATTATTTAAACGAGGAAAAGCTATATCA
GGGGCTCCCAATATTAGTGGTACTAGTCAATTTCCAAATCCTCCAATTATAA
TTGGTATAACTATAAAAAAAATTATAATAAATGC

Una vez se realiza el análisis de las secuencias en el programa informático Clustal Omega se obtiene la secuencia de consenso. Esta posee las partes comunes de las dos anteriores. La secuencia consenso resulta necesaria para el programa Blast.

AAATAAATGTTGATATAAAAATTGGGTCCCCTCCACCAGCAGGATCAAAAA
GGAAGTATTAATATTTTCGATCTGTTAAAAGTATTGTAATAGCTCCAGCAAGT
ACGGGTAATGATAAAAAGTAATAAATAAGCAGTAATTTTTACTGCTCAGATA
AATAAAGCTATTTTGTCTAAAGATATACCAGAAGGTCGTATATTTAACACAG
TTGAAATAAAGTTAATAGCACCTAAAATAGAAGATACACCAGCTATATGCA
AACTAAAATTGCTAAATCAACAGAAGATCCTTCATGGGCAATATTTCTTGA
TAAAGGTGGGTAAACTGTTTCATCCTGTTCCCTGCTCCTCTATCAACTATTCTC
TTATTAAGAAGTGATAAAGAAGGGGGAAGAAGCCAAAATCTTATATTAT
TTAAACGAGGAAAAGCTATATCAGGGGCTCCCAATATTAGTGGTACTAGTC
AATTTCCAAATCCTCCAATTATAATTGGTATAACTATAAAAAAAATTATAAT
AAATGCATGAGCTGTAACAATCGTGTTATAAATTTGGTCATTTCCAATAAA
GATCCAGGATTTCTAATTCTGTACGAATTAATAATTCTTAAGCTTGTTCCGA
CTGTTCCCTGCTCATGTCCCAAAAAATAAATAAAGTTC

Una vez se obtiene la secuencia concenso acudimos al programa informático Blast, de este programa se obtienen diferentes informaciones que se mostrarán a continuación.

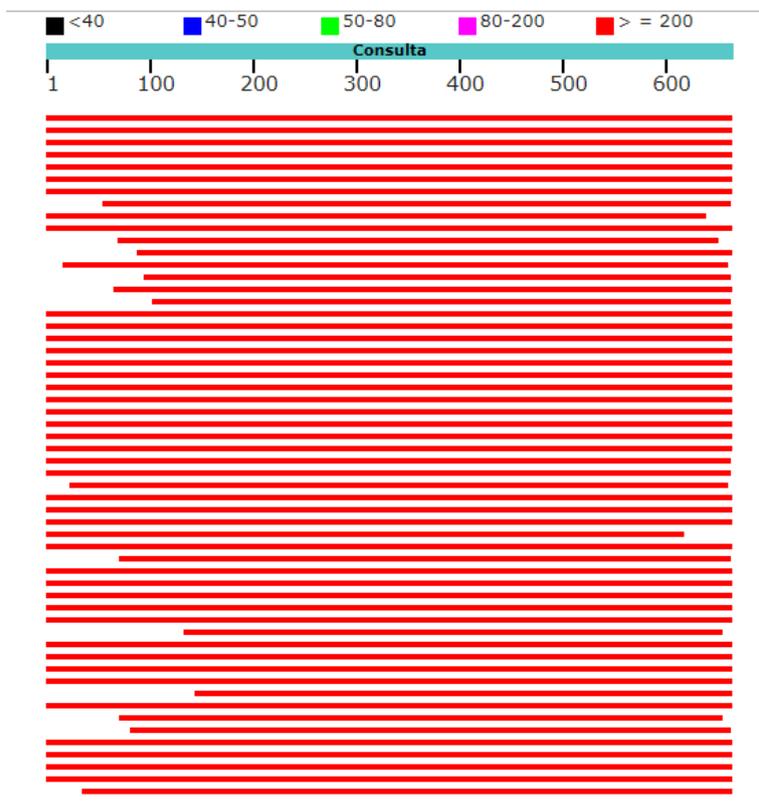


Fig. 30 Comparativa de secuencias.

El cuadro anterior muestra el grado de similitud entre la muestra propuesta y la que se encuentra en la base de datos. El color rojo indica que el nivel de similitud es muy alto. Se está empleando en la comparación 600 pares de bases.

A continuación, se muestra el alineamiento de las bases de la muestra con las bases de la base de datos. Se muestra que existen un 99,4 % de igualdad entre las bases y el recubrimiento es del 99%.

CARACTERIZACIÓN GENÓMICA Y/O MORFOLÓGICA DE INSECTOS ÚTILES EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE PLANTAS ADVENTICIAS

Vale *Hypera postica* NSMK: IN-0046500 gen de la subunidad I (CO1) del citocromo c oxidasa, cds parciales; mitocondrial
 ID de secuencia: [KU188401.1](#) Longitud: 658 Número de coincidencias: 1

Rango 1: 1 a 658 [Gráficos](#) [GenBank](#)

	Puntuación	Esperar	Identidades	Brechas	Hebra
	1182 bits (640)	0.0	652/658 (99%)	0/658 (0%)	Mas menos
Consulta 1 AAATAAATGTTGATATAAAATTGGGTCCCTCCACCAGCAGGATCAAAAAAGGAAGTATT 60					
Sbjct 658 AAATAAATGTTGATATAAAATTGGGTCCCTCCACCAGCAGGATCAAAAAAGGAAGTATT 599					
Consulta 61 AATATTTTCGATCTGTTAAAAGTATTGTAATAGCTCCAGCAAGGACGGTAATGATAAAAG 120					
Sbjct 598 AATATTTTCGATCTGTTAAAAGTATTGTAATAGCTCCAGCAAGTACGGGTAATGATAAAAG 539					
Consulta 121 TAATAAAATAGCAGTAATTTTACTGCTCAGATAAAATAAGCTATTTTGTCTAAAGATAT 180					
Sbjct 538 TAATAAAATAGCAGTAATTTTACTGCTCAGATAAAATAAGCTATTTTGTCTAAAGATAT 479					
Consulta 181 ACCAGAAGGTCGTATATTTAACACAGTTGAAATAAAGTTAATAGCACCTAAAATAGAAGA 240					
Sbjct 478 CCCAGAAGGTCGTATATTTAACACAGTTGAAATAAAGTTAATAGCACCTAAAATAGAAGA 419					
Consulta 241 TACACCAGCTATATGCAAACTAAAAATTGCTAAATCAACAGAAGATCCTTCATGGGCAAT 300					
Sbjct 418 TACACCAGCTATATGCAAACTAAAAATTGCTAAATCAACAGAAGATCCTTCATGGGCAAT 359					
Consulta 301 ATTTCTTGATAAAGGTGGGTAAACTGTTTCATCTGTTCTGCTCCTCTATCAACTATTCT 360					
Sbjct 358 ATTTCTTGATAAAGGTGGGTAAACTGTTTCATCTGTTCTGCTCCTCTATCAACTATTCT 299					
Consulta 361 TCTTATTAAGAAGGTGATAAAGAAGGGGAAGAAGCCAAAATCTTATATTATTTAAACG 420					
Sbjct 298 TCTTATTAAGAAGGTGATAAAGAAGGGGAAGAAGTCAAAATCTTATATTATTTAAACG 239					
Consulta 421 AGGAAAAGCTATATCAGGGGCTCCCAATATTAGTGGTACTAGTCAATTTCCAAATCCTCC 480					
Sbjct 238 AGGAAAAGCTATATCAGGGGCTCCCAATATTAGTGGTACTAGTCAATTTCCAAATCCTCC 179					
Consulta 481 AATTATAATTGGTATAACTAT aaaaaaaaa TTATAATAATGCATGAGCTGTAAACATCGT 540					
Sbjct 178 AATTATAATTGGTATAACTATAAAAAAATTATAATAATGCATGAGCTGTAAACATCGT 119					
Consulta 541 GTTATAAATTTGGTCATTTCCAATTAAGATCCAGGATTTCTAATTCTGTACGAATTA 600					
Sbjct 118 GTTATAAATTTGGTCATTTCCAATTAAGATCCAGGATTTCTAATTCTGTACGAATTA 59					
Consulta 601 AATTCCTAAGCTTGTCCGACTGTTCTGCTCATGTCCCAAAAATAAAATATAAAGTT 658					
Sbjct 58 AATTCCTAAGCTTGTCCGACTGTTCTGCTCATGTCCCAAAAATAAAATATAAAGTT 1					

Fig. 31 Comparativa entre secuencias.

Por último, del GENBANK, la base de datos mundial, obtenemos datos como autores que proponen secuencias del insecto que se está analizando y se compara. También es posible saber si la secuencia con las que se compara se encuentra publicadas en revistas o portales científicos.

Los autores de la cadena con la que se compara son: Jung, SW, Min, HK, Kim, Y.-H, Choi, HA, Lee, SY, Bae, YJ y Paek, WK. (GENBANK, 2019).

Se encuentra publicado en: Título: Una biblioteca de códigos de barras de ADN de la colección de referencia de escarabajos (Insecta: Coleóptera) en el Museo Nacional de Ciencias, CoreaDIARIO J Asia Pac Biodivers 9 (2), 234-244 (2016).

6.2 Daños de los fitofagos.

Bidens pilosa L.



Fig. 32 *Bidens pilosa* L. (1758). Daño.

Efectos del control biológico ejercido por la fase juvenil de *Nemorimyza maculosa* Malloch (1913). El daño lo realiza la larva de esta especie, la larva crea minas en el limbo de la hoja, alimentando se del mesófila de la hoja. El daño producido afecta a la capacidad de la planta para realizar la fotosíntesis, por lo que en el momento de la formación y emisión de semillas se observaran mermas en estas.

Estos mismos daños ha sido previamente descritos para plantas de la misma familia que la propuesta en el proyecto y con el mismo agente de control biológico en Argentina, por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Buenos Aires, Argentina (Valladares, Salvo, y Saini, 2011).

Conyza sumatrensis L.



Fig. 33 *Conyza sumatrensis*L. (1758). Daño.

Efectos del control ejercido por la fase juvenil de *Nemorimyza maculosa* Malloch (1913). El daño lo realiza la larva de esta especie, la larva crea minas en el limbo de la hoja, alimentándose del mesófilo de la hoja. El daño producido afecta a la capacidad de la planta para realizar la fotosíntesis, por lo que en el momento de la formación y emisión de semillas se observaran mermas en estas.

Estos mismos daños ha sido previamente descritos para plantas de la misma familia que la propuesta en el proyecto y con el mismo agente de control biológico en Argentina, por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Buenos Aires, Argentina (Valladares, Salvo, y Saini, 2011).

Echium plantagineum L.



Fig. 34 *Echium plantagineum* L. (1758). Daño.

Efectos del control biológico ejercido por la fase juvenil de *Dialectica scalariella* Zeller (1950). El control biológico lo ejerce la larva del lepidóptero, minando la superficie superior del limbo, creando galerías de longitud variable con recorridos normalmente sinuosos. Como consecuencia de las galerías que crean la hoja se va contrayendo llegando en ocasiones a enrollar la hoja sobre sí misma.

Los efectos del control biológico ejercido por el insecto sobre esta especie vegetal también ha sido descrito en lugares como Francia, La Península Ibérica, Italia, La Península Balcánica, en UK, y en Turquía (Özaslan et al., 2016; Ellis, 2019).

Forsskaolea angustifolia L.



Fig. 35 *Forsskaolea angustifolia* L.(1758). Daño.

Efectos del control biológico ejercido por las fases juveniles de *Cosmopterix pulchrimella* Chambers (1875). El control biológico localiza la oruga de esta especie creando minas con recorridos sinuosos en el limbo de las hojas, normalmente siguiendo el nervio central. Crean un pequeño capullo en el interior de la mina como forma de protección, lo que tiene como consecuencia la contracción de la hoja. Esta defoliación del limbo afecta a la tasa fotosintética de la planta, por lo tanto, a la hora de emitir semillas esta se ve mermada en defoliaciones severas. Pero esto a su vez no impide la emisión de semillas.

La “polilla bella” destaca por su preferencia por especies vegetales de la familia Urticaceae, y se ha descrito los daños que ocasiona sobre las plantas de la familia nombrada en el Reino Unido y en el Sur de Europa (Ellis, 2018).

Gnaphalium luteo-album L.



Fig. 36 *Gnaphalium luteo-album*L. (1758). Daño.

Efecto del control biológico ejercido por la fase juvenil de *Vanesaatalanta* L.

El control biológico lo realiza la oruga de la especie, alimentándose del limbo de las hojas y del tallo e impidiendo el transcurso de la savia desde las raíces a las hojas. Como consecuencia de este control que ejerce la *Vanessa atalanta* L. la planta es incapaz de emitir semillas, por lo que se trata uncontrol biológico verdadero.

Se conoce que en la zona del litoral de Huelva se han descrito los mismos efectos en *Gnaphalium luteo-album* L. originados por las distintas especies de *Vanessa* sp. propuestas(Dionisio, 2007). También se han descrito en lugares como Azores y Madeira(Casanovas, García, y Aránega 2015; García y Moreno, 2011).

Malva parviflora L.



Fig. 37 *Malva parviflora* L. (1758). Daño.

Efecto del control biológico ejercido por la fase juvenil de *Dialectica hedemanni* Rebel (1896). El control biológico lo realiza la oruga de esta especie creando una galería que posteriormente se convierte en una mancha transparente que atraviesa la hoja por completo, esta defoliación del limbo afecta a la tasa fotosintética de la planta, por lo tanto, a la hora de emitir semillas esta se ve mermada en defoliaciones severas. Pero esto a su vez no impide la emisión de semillas.

Autores como A.M. Franquinho Aguiar han descrito la presencia de *Dialectica hedemanni* Rebel (1896) sobre de *Malva parviflora* L. y los síntomas descritos en Madeira (Aguiar y Biscoito, 2006).

Medicago polymorpha L.



Fig. 38 *Medicago polymorpha* L. (1791).Daño.

Efectos del control biológico ejercido por la fase juvenil de *Hypera postica* Gyllenhal (1813). El control biológico lo realiza la oruga de esta especie, aunque el adulto también se alimenta de las hojas en menor medida. Las fases larvarias se alimentan del limbo de la planta. Esta defoliación del limbo afecta a la tasa fotosintética de la planta, por lo tanto, a la hora de emitir semillas esta se ve mermada en defoliaciones severas. Pero esto a su vez no impide la emisión de semillas.

La presencia de esta especie y los daños que causan han sido descritos con anterioridad en la Península Ibérica, por diversos autores, como por ejemplo P. Gurrea (Gurrea P., 1981). En Florida se ha descrito la presencia del artrópodo sobre de la especie vegetal descrita (Bloem, Mizell, y O'Brien, 2002).

Parietaria judaica L.

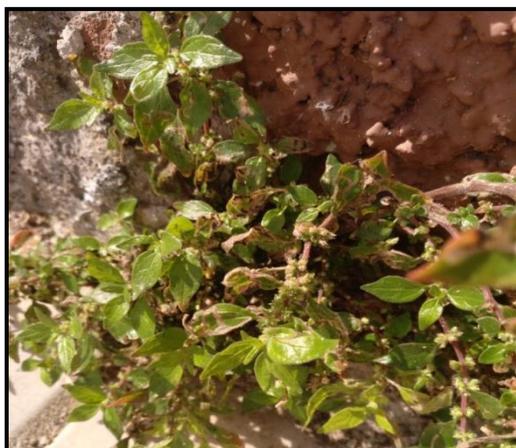


Fig. 39 *Parietaria judaica* L. (1763). Daño.

Efectos del control biológico ejercido por la fase juvenil de *Cosmopterix pulchrimella* Chambers (1875). El control biológico realiza la oruga de esta especie creando minas con recorridos sinuosos en el limbo de las hojas, normalmente siguiendo el nervio central. Esta defoliación del limbo afecta a la tasa fotosintética de la planta, por lo tanto, a la hora de emitir semillas esta se ve mermada en defoliaciones severas. Pero esto a su vez no impide la emisión de semillas.

En lugares como Gran Bretaña, Irlanda, Bélgica se ha descrito la presencia de la polilla y sus efectos sobre la *Parietaria judaica* L. (Pitkin et al., 2019; Meert, 2017).

6.3 Rango de Daño.

Tras los resultados obtenidos podemos establecer los siguientes rangos de control realizados por los distintos insectos sobre las distintas plantas adventicias consideradas:

Hypera postica Gyllenhal (1813) (Fig. 9) realiza un nivel de daño (Fig. 10) del rango 2-3 (según la escala establecida) sobre *Medicago polymorpha* L.

Cosmopterix pulchrimella Chambers (1875) (Fig. 11) realiza un nivel de daño (Fig. 12 y 13) del rango 2-3 (según la escala establecida) sobre *Forsskaolea angustifolia* L. y sobre *Parietaria judaica* L.

Dialectica hedemanni Rebel (1896) (Fig. 14) realiza un nivel de daño (Fig. 15) del rango 3-4 (según la escala establecida) sobre *Malva parviflora* L.

Dialectica scalariella Zeller (1950) (Fig. 16) realiza un nivel de daño (Fig. 17) del rango 3-4 (según la escala establecida) sobre *Echium plantagineum* L.

Vanessa sp. (Fig. 18) realiza un nivel de daño (Fig. 19) del rango 5 (según la escala establecida) sobre *Gnaphalium luteo-album* L.

Nemorimyza maculosa Malloch (1913) (Fig. 23) realiza un nivel de daño (Fig. 24 y 25) del rango 2-3 (según la escala establecida) sobre *Bidens pilosa* L. y *Conyza sumatrensis* L.

* Puntuación/ rango: 1 menor puntuación, 5 máxima puntuación.

7 Conclusiones.

Como conclusiones al proyecto fin de Grado realizado en el término municipal de San Cristóbal de La Laguna se obtiene que:

1. Se evidencia que se puede lograr un control biológico de ciertas plantas adventicias con el uso de fauna auxiliar existente en el medio.
2. La especie *Vanessa atalanta* L. realiza un control biológico completo sobre *Gnaphalium luteo-album*, cuando hay interacción entre la planta y el insecto, ya que se impide la emisión de semillas.
3. El resto de insectos realizan un control biológico relativo y sin llegar a ser completo, debido a que la planta es capaz de completar su ciclo biológico.

Conclusions.

As conclusions to the final Degree project carried out in the municipality of San Cristóbal de La Laguna, it is obtained that:

1. It is evident that biological control of certain adventitious plants can be achieved with the use of auxiliary fauna existing in the environment.
2. The species *Vanessa atalanta* L. performs a complete biological control over *Gnaphalium luteo-album*, when there is interaction between the plant and the insect, since the emission of seeds is prevented.
3. The rest of insects perform a relative biological control and without being complete, because the plant is able to complete its biological cycle.

8 Agradecimientos.

Expresar mis agradecimientos al SEGAI por su contribución y colaboración en el presente proyecto.

Agradecer le también a mi familia su apoyo incondicional el cual ha hecho posible la finalización de este proyecto, ya que sin su ayuda y paciencia no hubiera sido posible.

Debo agradecer también a mis compañeras y amigas Jennifer, Lucia y Miriam, por su apoyo en los peores momentos, todos esos momentos de risa y sus charlas de motivación.

Agradecer a mi tutor de proyecto A. Siverio por su paciencia y sus infinitas tutorías de correcciones, al profesor E. Vesperinas y M. Cornelia, así como a todo el personal colaborador de los laboratorios de la universidad que ha hecho posible la creación de esta idea.

Por último, agradecer a mi pareja, por su apoyo, su comprensión y su colaboración en este proyecto.

9 Bibliografía.

- Agassiz, D. J. (2005). *DIALECTICA SCALARIELLA* (ZELLER,1850)(Lep.: Gracillariidae) nueva en las Islas Británica.117, 95–96.
- Aguiar, A. M. F., & Biscoito, M. (2006). *Systematic catalogue of the entomofauna of the Madeira Archipelago and Selvagens Islands*. ISBN: 6103544947.
- Altieri, M.A & Liebman, M. (1988). *Weed Management in Agroecosystems: Ecological Approaches*.
- Badii, M. H. &, & Abreu, J. L. (2006). Control biológico una forma sustentable de control de plagas (Biological control a sustainable way of pest control). In *International Journal of Good Conscience* (Vol. 1).
- Badii, M. H., & Abreu, J. L. (2006). Control biológico una forma sustentable de control de plagas (Biological control a sustainable way of pest control). In *International Journal of Good Conscience* (Vol. 1).
- Baker, H. G. (1974). The evolutions os weed. Retrieved August 12, 2019, from Annual Reviews website: <https://medlineplus.gov/spanish/osteoporosis.html>
- Bases de Datos Global de la EPPO. (2018). Retrieved July 12, 2019, from Nemorimyza maculosa website: <http://es.cryptocurrencyprofits.com/que-es-una-criptomoneda/>
- Baute Delgado, F., Sobrino Vesperinas, E., & Siverio, A. (2005). *Distribución del Homóptero “Orthezia insignis” en la Isla de Tenerife y su potencial en el control biológico de la planta invasora “Lantana camara”*.
- Bennett, F. D., & Habeck, D. H. (1992). *Cactoblastics cactorum: A successful weed control agent in the Caribbean, Now A pest un Florida?*.
- Biopedia. (2012). Clasificación de los Insectos. Retrieved July 11, 2019, from <https://medlineplus.gov/spanish/osteoporosis.html>
- Bland, R. G. (1981). Antennal sensilla of the adult alfalfa weevil, *Hypera postica* (Gyllenhal) (Coleoptera: Curculionidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 10(3), 265–674.

- Blaxter, M. (2003). Molecular systematics: counting angels with DNA. *Naturaleza*, 421, 122–124.
- Bloem, S., Mizell, R. F., & O'Brien, I. y C. W. (2002). Trampas antiguas para los gorgojos nuevos: nuevos registros para Curculionids (Coleoptera: Curculionidae), Brentids (Coleoptera: Brentidae) y Anthribids (Coleoptera: Anthribidae) de Jefferson Co., Florida. In *El entomólogo de Florida* (Vol. 85).
- Bonants, P., Groenewald, E., Rasplus, J. Y., Maes, M., de Vos, P., Frey, J., ... Mostert, L. (2010). QBOL: A new EU project focusing on DNA barcoding of quarantine organisms. *EPPO Bulletin*.
- Brent, K. J., Raphael, S., Lane, N., & Hollomon, D. W. (1985). *FUNGICIDE RESISTANCE: THE ASSESSMENT OF RISK*.
- Brown, J. W., Miller, S. E., & Horak, M. (2003). STUDIES ON NEW GUINEA MOTHS. 2. DESCRIPTION OF A NEW SPECIES OF XENOTHICTIS MEYRICK (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE: ARCHIPINI). In *PROC. ENTOMOL. SOC. WASH* (Vol. 105).
- Cabello, T., Barranco, P., & Torres, M. (1997). *Plagas de los cultivos: guía de identificación*.
- Campion, R. de N., & Tec, J. C. C. (2004). *Secuenciación de ácidos nucleicos*.
- Canarias, G. de. (2014). Vanessa vulcania. Retrieved August 22, 2019, from Canal de Área de Tecnología Educativa website: http://www3.gobiernodecanarias.org/medusa/mediateca/ecoescuela/?attachment_id=2413
- Canarias, G. de. (2019). media teca. Retrieved July 20, 2019, from Gobierno de Canarias website: http://www3.gobiernodecanarias.org/medusa/mediateca/ecoescuela/?attachment_id

=2413

- Carretero, J. L. (2004). *Flora arvense española*. ISBN 84-932056-6-4.
- Casanovas, J. G., García, R., & Aránega, J. B. (2015). Nuevos datos sobre la biología y distribución de *Vanessa virginiensis* (Drury, 1770) (Nymphalidae, Lepidoptera) en el Archipiélago Canario. *Revista de La Academia Canaria de Ciencias: = Folia Canariensis Academiae Scientiarum*, 27(1), 307–314.
- Castroviejo, S., & Pascual, H. (1999). Flora iberica . Plantas vasculares de la Península Iberica e Islas Baleares. Retrieved from *Flora iberica* 7(1): 417.423
- Cigudosa, J. C. (2004). *CURSO DE PRIMAVERA PATOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER Conceptos básicos sobre ADN y ARN Técnicas de amplificación (PCR y variantes) Aplicaciones principales*.
- CSIC. (2008). Iberfauna. Retrieved May 14, 2019, from *Cosmopterix pulchrimella* website: <http://www.ntnamericas.com/es/>
- David, A. (2011). Khan Academy. Retrieved August 22, 2019 website <https://doi.org/10.12968/prtu.2011.1.2.52a>
- DeBach, P. (1975). *Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas*. México: CECSA.
- Díaz-Ambrona, C. G. H. (1997). *Evaluating the sustainability and food security of peasant farming systems in the Mesoamerican highlands View project MODELO TEÓRICO AGRO-FORESTAL PARA LA SIMULACIÓN DE SISTEMAS ADEHESADOS View project*. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/28273146>
- Dionisio, M. (2007). Lepidópteros de los Espacios Naturales Protegidos del Litoral de Huelva (Macro y Microlepidoptera). *Boletín de La Sociedad Andaluza de Entomología*, 2, 1–148.
- Dorado, J, Del Monte, J. P., & López-Fando, C. (1997). *Congreso 1997 de la Sociedad Española de Malherbología*.
- Dorado, Jose, & Fernández-Quintalla, C. (2017). Principales malas hierbas y su gestión

- en cereales de invierno y maíz. Retrieved August 6, 2019, from Intermpresas net website: <https://medlineplus.gov/spanish/osteoporosis.html>
- Driesche, R. G. Van, Hoddle, M. S., & Center, T. D. (1995). *Control de plagas y malezas por enemigos naturales*. (1st ed.; E. R. Cancino, J. C. Blanca, & J. M. ALVAREZ, Eds.)
- Ellis, W. N. (2018). *Cosmopterix pulchrimella* Chambers, 1875. Plant Parasites of Europe. Retrieved July 15, 2019 from Fanalago website: <https://bladmineerders.nl/parasites/animalia/arthropoda/insecta/lepidoptera/ditrysia/gracillarioidea/gracillariidae/gracillariinae/>
- Ellis, W. N. (2019). Plant Parasites of Europe. Retrieved July 15, 2019 from Fanalago website: <https://bladmineerders.nl/parasites/animalia/arthropoda/insecta/lepidoptera/ditrysia/gracillarioidea/gracillariidae/gracillariinae/dialectica/dialectica-scalariella/>
- Enríquez, L., Castillo, J., & Rodríguez, S. (2014). *Biología y Comportamiento de Amauromyza Maculosa*.
- F. Xavier Sans i Serra. (2016). *MÓDULO VIII-1-BIOLOGÍA, ECOLOGÍA Y CONTROL DE MALAS HIERBAS*.
- Fernández-Quintalla, C., & Saavedra, M. (1991). Fundamentos sobre malas hierbas y herbicidas. In *sidalc.net*. Retrieved July 8, 2019 website: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=UNC.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expression=mfn=005156>
- Fernández-Quintalla, C., Torres, L. G., & Saavedra, M. (1991). Fundamentos sobre malas hierbas y herbicidas. *Sidalc.Net*. Retrieved July 8, 2019 website: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=UNC.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expression=mfn=005156>
- Fernández, A. C., & Alii. (1993). *Las hierbas adventicias. Su manejo* pdf.
- Fernandez, J. M. (2006). *LOS LEPIDÓPTEROS DIURNOS DE LAS ISLAS CANARIAS*.

- Fernando, G. A. (2014). *Programas CHROMAS, DNA Star, EZ-TAXON, MEGA y CLUSTAL* pdf.
- Fortí, J. A., Vega, P. B., Pérez, F. F., Lopez, J. A. M., & Lluch, J. M. O. (2014). *AGENTES BIÓTICOS NOCIVOS*. Miguel Hernández, Universidad de Almería, Universidad Politécnica de Valencia y Universidad Politécnica de Cartagena.
- Fraile, I. R. (2019). *¿Qué es Genbank?* pdf.
- García-Tejero, F. D. (1998). *Plagas y enfermedades de las plantas cultivadas*. Mundi-Prensa.
- García, E., Romo, H., & Sarto, V. (2015). Orden Lepidóptero. *Revista IDE@-SEA*, N^o, 65, 1–21.
- García Gallo, A., Acebes Ginovés, J., Vera Galván, M., Marrero Gómez, M., & Pérez de Paz, P. (1993). Avance del atlas cartográfico de los endemismos canarios. *Itinera Geobotanica*, (7), 169–374.
- García Torres, L., & Fernández-Quintanilla, C. (1989). *Fundamentos sobre malas hierbas y herbicidas*.
- García Torres, L., & Fernández-Quintanilla, C. (1991). *Fundamentos sobre malas hierbas y herbicidas*.
- García, V., & Moreno, J. A. (2011). *Catálogo regional de especies amenazadas de Extremadura*.
- Gärtner, P. G., Meyer, B., & Scherbius, J. (1802). *Flora der Wetterau* (P. von Verlegt & H. Guilhauman, Eds.).
- Gascón, A. (1928). *Las malas hierbas*. *Servicio de Publicaciones Agrícolas* pdf
- Gebiola, M., Bernardo, U., Ribes, A., & P Gibson, G. A. (2015). An integrative study of *Necremnus Thomson* (Hymenoptera: Eulophidae) associated with invasive pests in Europe and North America: taxonomic and ecological implications. *Zoological*

Journal of the Linnean Society, 173(2), 352–423. <https://doi.org/10.1111/zoj.12210>

Gobierno de Canarias, C. de M. A. y O. T. (2004). *Lista de Especies Silvestres de Canarias. Hongos, Plantas y Animales terrestres*. (Consejería; I. I. Zamora, J. L. M. Esquivel, N. Z. Pérez, & M. A. Hernández, Eds.).

González-Barragán, M. I., A.Sombrero, & Benito, A. de. (2006). Control de plantas adventicias en laboreo de conservación en una región semiárida. *Revista de La Asociación Española de Agricultura de Conservación/Suelos Vivos*, 28.

González, M. L. G. (2009). Flora vascular de Canarias. Retrieved August 25, 2019, from http://www.floradecanarias.com/imagenes_disponibles.html

González, M. L. G. (2019). Flora Vascular de Canarias. Retrieved July 23, 2019, from Malva parviflora L. website: http://www.floradecanarias.com/malva_parviflora.html

Greif, G. (2014). *PCR: Reacción en cadena de la polimerasa*. Retrieved from www.karymullis.com

Gurrea P. (1981). *Ciclo biológico de Hypera variabilis Herbst (col.: curculionidae) en la España central*.

Gurrea P. (1981). *Ciclo biológico de Hypera variabilis Herbst (col.: curculionidae) en la España central*.

Gutiérrez-Ramírez, A. &, Bermúdez, A. R. &, C.Santillán-Ortega &, Ortiz-Catón, M. &, & OJ.Camberos-Campos &. (2013). CONTROL BIOLÓGICO COMO HERRAMIENTA SUSTENTABLE EN EL MANEJO DE PLAGAS EN EL ESTADO DE NAYARIT, MÉXICO. *Revista Bio Ciencias*, 102–112.

Hernández, C., Espino De Paz, ;, Hernández García, A. ;, & Espinosa, B. (1988). *LA LUCHA INTEGRADA, UNA NUEVA ESTRATEGIA PARA COMBATIR LAS PLAGAS*. La Laguna (Tenerife): Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación.

- Hosking, J. R., Sullivan, P. R., & Welsby, S. M. (1994). Biological control of *Opuntia stricta* (Haw.) Haw. var. *stricta* using *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) in an area of New South Wales, Australia, where *Cactoblastis cactorum* (Berg) is not a successful biological control agent. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 48(3), 241–255.
- Ibarrola, M. (2019). Animales: Cazadores de especies: así de descubren 180 animales nuevos cada año en España. *El Confidencial*. Retrieved July 12, 2019 website https://www.elconfidencial.com/tecnologia/2019-07-12/ciencia-biologia-especies-naturaleza_2108227/
- Jinbo, U., Kato, T., & Ito, M. (2011). *Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology ns_449 107..124*. <https://doi.org/10.1111/j.1479-8298.2011.00449.x>
- Johns, C. V., & Hughes, L. (2002). Interactive effects of elevated CO₂ and temperature on the leaf-miner *Dialectica scariella* Zeller (Lepidoptera: Gracillariidae) in Paterson's Curse, *Echium plantagineum* (Boraginaceae). *Global Change Biology*, 8(2), 142–152. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2486.2002.00462.x>
- Ariza F., (2013). *Formas vitales, estratificación y fenología*.
- Koster, S. J. C., Baldizzone, G., Deutsch, H., Huemer, P., & van Nieukerken, E. J. (2019). The Eastern Palaearctic *Cosmopterix feminella* Sinev, 1988, introduced in Italy: taxonomy, biology and a new synonymy (Lepidoptera, Cosmopterigidae). *Nota Lepidopterologica*, 42(1), 49–61.
- Kunkel, G. (Ed.). (1976). *Biogeography and Ecology in the Canary Islands*.
- Lopez Vaamonde, C., Agassiz, D., & Augustin, S. (2010). *Fauna Europaea View project Afromoths View project*.
- Mulumba M., M. S., & Kuijpers, L. (2008). Montreal protocol on substances that deplete the ozone layer. In *Technology and Economic Assessment Panel*. Retrieved

from http://42functions.net/Assessment_Panels/TEAP/Reports/HTOC/HTOC-Assessment-Report-2010.doc

- Meert, R. (2017). *Cosmopterix pulchrimella* (*Lepidoptera* : *Cosmopterigidae*) *nieuw voor België*.
- Mitca. (2019). Mariposa Vanessa. Retrieved July 20, 2019, from Gobierno de Canarias website: <https://medlineplus.gov/spanish/osteoporosis.html>
- Molecular Species Identification Solutions. (n.d.). biome-id. Retrieved June 19, 2019, from <https://www.biome-id.com/english/molecular-services/dna-barcoding/>
- Molina, R. T. (2014). Herbarium. Retrieved July 23, 2019, from http://www.plantasyhongos.es/herbarium/htm/Parietaria_judaica.htm
- Montoro, Y., Moreno, R., Gomero, L., & Reyes, M. (2005). *CARACTERÍSTICAS DE USO DE PLAGUICIDAS QUÍMICOS Y RIESGOS PARA LA SALUD EN AGRICULTORES DE LA SIERRA CENTRAL DEL PERÚ*.
- Morales, D. A. (2012). *Informe de malas hierbas*. Cabildo de Tenerife.
- NBN atlas. (2017). Retrieved June 18, 2019, from *Cosmopterix pulchrimella* website: <http://www.ntnamericas.com/es/>
- Neumann, G., Follett, P. A., Hollingsworth, R. G., & De León, J. H. (2010). High host specificity in *Encarsia diaspidicola* (Hymenoptera: Aphelinidae), a biological control candidate against the white peach scale in Hawaii. *Biological Control*, *54*, 107–113.
- Nordbring-Hertz, B., Jansson, H.-B., & Tunlid, A. (2001). Nematophagous Fungi. In *Encyclopedia of Life Sciences*. Retrieved 29/08/2019. Website: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470015902.a0000374.pub3>
- Özaslan, C., Bolu, H., Cengiz, F. C., & RAY, P. (2016). *A new host and natural enemies of *Dialectica scalariella* (Zeller) (Lepidoptera: Gracillariidae) in Turkey*.

- Peralta, J., & Royuela, M. (2015). Control de malas hierbas. Retrieved August 26, 2019, from Universidad Publica de Navara website: <https://www.unavarra.es/herbario/htm/control.htm>
- Pereira, M. (2017). *Vanessa virginiensis*. Retrieved July 18, 2019, from Área de Conservación Guanacaste website: <http://www.ntnamericas.com/es/>
- Pitkin, B., Ellis, W., Plant, C., & Edmunds, R. (2019). *Cosmopterix pulchrimella* Chambers, 1875 [Lepidoptera: Cosmopterigidae]. Retrieved August 22, 2019, from The leaf and stem mines of British flies and other insects. website: http://www.ukflymines.co.uk/Moths/Cosmopterix_pulchrimella.php
- Plataforma Belga de Biodiversidad. (2012). Global Taxonomic Database Of Gracillariidae (Lepidoptera). Retrieved July 24, 2019, from Dialectica hedemanni website: <http://www.gracillariidae.net/species/show/1645>
- Rebel, H. (1939). *Dritter Beitrag zur Lepidopterenfauna der Canaren. 1*). Retrieved from www.biologiezentrum.at
- Red naturaleza. (2019). Retrieved July 20, 2019, from *Vanessa vulcania* website: <http://www.ntnamericas.com/es/>
- Rosenthal, S. S., Maddox, D. M., & Brunetti, K. (1984). Biological methods of weed control. *Biological Methods of Weed Control.*, (No.1).
- Samways, M. J. (1990). *Control biológico de plagas y malas hierbas*. Oikos-tau.
- Sanz Elorza, M., Sobrino Vesperinas, E., & Dana Sánchez, E. (2005). Aproximación al listado de plantas vasculares alóctonas invasoras reales y potenciales en las Islas Canarias. *Lazaroa*, (26), 55–66.
- Sanz, M. P. G. (2015). *Estudio morfológico, biológico y ecológico de “Hypera Variabilis Herbst” en la España Central*. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.
- Schulz, B., & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research*, Vol. 109, pp. 661–686.

- Sievers, F., & Higgins, D. G. (2014). Clustal Omega. *Current Protocols in Bioinformatics*, Vol. 2014, pp. 3.13.1-3.13.16.
- Silva-Brandão, K. L., & Lyra. (2009). Barcoding Lepidoptera: current situation and perspectives on the usefulness of a contentious technique. *Entomología Neotropical*, 38, 441–451.
- Susan, V. R., & Castiel, A. F. (2005). *CAPÍTULO. CONTROL BIOLÓGICO DE PLAGAS Y ENFERMEDADES DE LOS CULTIVOS.*
- Symondson, W. O. C. (2002). Molecular identification of prey in predator diets. *Molecular Ecology*.
- Torres, M. C. M., Olivencia, A. O., & Cruz, A. B. R. (1985). *LAS PLANTAS ADVENTICIAS COMO BIOINDICADORES EN LA ZONA LITORAL ALMERIENSE* (p. 97). p. 97.
- Ubillos, M. A. M. (1976). *Visión general sobre las malas hierbas.*
- Universidad de Florida. (2019). *Nemorimyza maculosa*. Retrieved July 10, 2019, from Landsacape Pets website: <http://www.ntnamericas.com/es/>
- Valdemar, L. M. M., Díaz, A. S., & Flores, R. C. (2011). *Secuenciación de fragmentos de ADN.*
- Valdés, B. (Benito), Díez M. J., & Fernández, I. (1987). *Atlas polínico de Andalucía Occidental*. Instituto de Desarrollo Regional, Universidad de Sevilla, Excma. Diputacion de Cadiz.
- Valladares, G., Salvo, A., & Saini, E. (2011). Moscas minadoras del girasol y sus enemigos naturales. *RIA. Revista de Investigaciones Agropecuarias.*, 180–188.
- Vázquez, J., Zedman, J. L., & Tressierra-Ayala, Á. (2006). CONTROL BIOLÓGICO DEL “cogollero del maíz.” *Folia Amazónica*, 13(1–2), 25.
- Vega, P. B., García, T. C., Cenjor, R. L., Gea, A. M. O., Santamalia, E. R., Aznar, R. V., & Sancho, M. V. (2014). *ASIGNATURA : CONTROL BIOLÓGICO.*

- Vieira, V. (2017). *Vanessa virginiensis* (Drury, 1773) in the Azores islands (Lepidoptera: Nymphalidae).
- Walsh', P. G., Woods, W. M., & Dodd', J. (1993). COMPARISON OF THE LIFE STAGES AND A FIELD GUIDE FOR DZALECTZCA SCALARZELLA (ZELLER) (LEPIDOPTERA: GRACILLARIIDAE) AND STOMOPTER YX ZSOCELZXANTHA (LOWER) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE). In *J. Aust. ent. Soc* (Vol. 32).
- Weems, H. V, Dekle, G. W., Weems, H., & Dekle, G. (1999). *Blotch Leafminer, Amauromyza maculosa* (Malloch) (Insecta: Diptera: Agromyzidae) 1. Retrieved from <http://entomology.ifas.ufl.edu/creatures>.
- Zhang, Z. &, Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences.
- Zimmermann, J., Hajibabaei, M., Blackburn, D. C., Hanken, J., Cantin, E., Posfai, J., & Evans, T. C. (2008). DNA damage in preserved specimens and tissue samples: A molecular assessment. *Frontiers in Zoology*.

