

## ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO *in vitro* PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE *Eichhornia* *crassipes* CON *Neochetina* (Coleoptera: *Curculionidae*)

## PADRONIZAÇÃO DE UM PROTOCOLO *in vitro* PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DE *Eichhornia* *crassipes* COM *Neochetina* (Coleoptera: *Curculionidae*)

## STANDARDIZATION OF AN *in vitro* PROTOCOL FOR THE BIOLOGICAL CONTROL OF *Eichhornia* *crassipes* WITH *Neochetina* (Coleoptera: *Curculionidae*)

DIANA MILENA MUÑOZ-SOLART<sup>1</sup>, LICETH ALEJANDRA ANTE<sup>2</sup>

### RESUMEN

*Las malezas acuáticas representan un gran problema en los cuerpos de agua, el control biológico con Neoquetinos es una alternativa para su erradicación. Este estudio muestra la estandarización de un protocolo in vitro para el control biológico de Eichhornia crassipes (buchón de agua) con Neochetina bruchi y Neochetina eichhorniae, en condiciones de temperatura (24 y 26°C), humedad, ventilación, iluminación y tiempo. El experimento se realizó en vasos de plástico para facilitar el apareamiento de las especies. Se trabajó con 20 parejas de insectos del género Neochetina, distribuidas equitativamente en los vasos, cada vaso con 15 g (tres porciones de lámina foliar de 5 g); se contó marcas de alimentación cada ocho días durante todo el ciclo biológico (11 semanas in vitro). Los resultados muestran alimentación eficiente en los organismos de ambas especies con respecto al*

**Recibido para evaluación:** 30 de Noviembre de 2016. **Aprobado para publicación:** 12 de Marzo de 2017.

1 Corporación Universitaria Autónoma del Cauca, Facultad de Ciencias Ambientales y Desarrollo Sostenible, Grupo de Investigación en Tecnología y Ambiente (GITA), Magister en Biología, Popayán, Colombia.

2 Corporación Universitaria Autónoma del Cauca, Facultad de Ciencias Ambientales y Desarrollo Sostenible, Ingeniera Ambiental y Sanitaria, Popayán, Colombia.

*tiempo. N. bruchi mostró mayor eficiencia en el control biológico durante la etapa experimental, con mayor significancia estadística ( $p < 0,05$ ) a partir de los 48 días en alimentación, comparada con N. eichhorniae. Considerando el ciclo biológico se logró establecer tiempos de desarrollo por fase in vitro para cada especie. La especie N. bruchi fué más eficiente en adaptación y generación de marcas de alimentación que la N. eichhorniae con un  $p < 0,05$  in vitro.*

## RESUMO

*Plantas aquáticas são um grande problema em corpos d'água, controle biológico com Neoquetinos é uma alternativa para a erradicação. Este estudo mostra a padronização de um protocolo in vitro para o controle biológico de Eichhornia crassipes (aguapé) com Neochetina bruchi e Neochetina eichhorniae sob condições de temperatura (24 e 26 ° C), umidade, ventilação, iluminação e tempo. A experiência foi realizada em copos de plástico para facilitar o acoplamento das espécies. Nós trabalhamos com 20 casais de insetos do gênero Neochetina, distribuídos nos óculos, cada vidro com 15 g (três porções de 5 g lâmina de folha); marcas de alimentos em oito dias contados ao longo do ciclo de vida (11 semanas in vitro). Os resultados mostram alimentação eficiente em ambas as espécies de organismos ao longo do tempo. N. Bruchi mostrou maior eficácia no controle biológico durante a fase experimental, com maior significância estatística ( $p < 0,05$ ) a partir de 48 dias de alimentação, em comparação com N. eichhorniae. Considerando o ciclo biológico é sucesso em estabelecer o tempo de desenvolvimento de fase in vitro para cada espécie. N. bruchi espécies foi mais eficiente marcas de adaptação e de geração de energia a N. eichhorniae com  $p < 0,05$  in vitro.*

## ABSTRACT

*Aquatic weeds represent a major problem in water bodies, biological control with Neoquetinos is an alternative for their eradication. This study shows the standardization of an in vitro protocol for the biological control of Eichhornia crassipes (water buchon) with Neochetina bruchi and Neochetina eichhorniae, under conditions of temperature (24 and 26°C), humidity, ventilation, lighting and time. The experiment was carried out in plastic vessels to facilitate the mating of the species. Twenty pairs of insects of the genus Neochetina were distributed evenly in the vessels, each vessel with 15 g (three parts of 5 g leaf); Feed marks were counted every eight days throughout the life cycle (11 weeks in vitro). The results show efficient feeding in the organisms of both species with respect to the time. N. bruchi showed greater efficiency in the biological control during the experimental stage, with a higher statistical significance ( $p < 0,05$ ) from 48 days in feed, compared to N. eichhorniae. Considering the biological cycle it was possible to establish development times per phase in vitro for each species. The N. bruchi species was more efficient in adapting and generating food marks than N. eichhorniae with a  $p < 0,05$  in vitro.*

## PALABRAS CLAVE:

Control biológico, Neochetina bruchi, Neochetina eichhorniae, Ciclo biológico, Maleza acuática, In vitro.

## PALAVRAS-CHAVE:

Controle biológico, Neochetina bruchi, Neochetina eichhorniae, Ciclo biológico, Plantas aquáticas, in vitro.

## KEYWORDS:

Biological control, Neochetina bruchi, Neochetina eichhorniae, Biological cycle, Aquatic weed, in vitro.

## INTRODUCCIÓN

Algunas especies vegetales son consideradas malezas acuáticas, debido a la fácil adaptación en el proceso de evolución biológica.

La especie vegetativa *E. crassipes* es considerada entre las 100 especies más invasoras del mundo por la Unión Mundial para la Naturaleza (UICN) [1], al ser introducida intencional o accidentalmente fuera de su ámbito natural, es considerada maleza acuática por su rápido crecimiento, reproducción, y dispersión mediante diferentes mecanismos en el agua, lo cual ha permitido su extensión, introduciéndose en diferentes partes del mundo [2,3]. La intensidad de propagación por el medio acuático, puede resultar en la duplicación del área infestada cada 6 a 15 días [4].

A nivel nacional se ha encontrado Buchón de agua en lagos, ríos, y grandes embalses en departamentos como Cundinamarca y Antioquia, afectando la calidad y volumen de sus aguas [5,6], las cuales son utilizadas como potencial eléctrico para la región; considerando ésta situación un problema, ya que en el momento no existe un control adecuado y oportuno de la planta, se ha realizado por método químico mediante aplicación de herbicida, método manual, mecánico, empleo de maquinaria acuática (cosechadora), botes para desplazamiento y manipulación de barreras, así como extracción y secado en las orillas del embalse. Las anteriores acciones implicaron grandes inversiones y pocos resultados. La situación se agravó con la proliferación de vectores que afectaron la salud pública de la comunidades aledañas [4].

Para mantener el buchón de agua en niveles que no ocasionen alteraciones ambientales en los cuerpos de agua, se sugiere como alternativa viable el control biológico con especies identificadas como enemigos naturales, que para el caso del presente estudio corresponde a los insectos del género *Neochetina*, los cuáles resultan eficientes respecto a otras especies que han sido estudiadas, por su alta especificidad en alimentación, *N. eichhorniae* junto con *N. bruchi*, están siendo utilizadas como agentes de control biológico de *Eichhornia crassipes* en áreas nativas y no nativas [5,6,7,8,9]. Según referentes encontrados hasta el momento, en Colombia se cuenta con poca información respecto al tema, no existen protocolos de establecimiento de especies para control biológico de malezas acuáticas de carácter invasivo.

Teniendo en cuenta la problemática, la estandarización del protocolo de control biológico del Buchón de agua por medio de insectos se considera muy pertinente a nivel local y/o nacional; debido a que este problema existe en diferentes entornos. Además de constituirse como una alternativa diferente a la forma convencional para su control, por lo tanto el control biológico del *E. crassipes* (Buchón de agua), por medio del uso de insectos de especie *N. eichhorniae* y *N. bruchi*, es fundamental al permitir reducir los niveles de propagación de la planta, permitiendo mejorar y conservar el recurso hídrico.

En éste contexto, el presente estudio tiene como objetivo estandarizar un protocolo de eficiencia *in vitro* para el control biológico de *E. crassipes* con las especies *N. eichhorniae* y *N. bruchi*, de ésta manera ofrecer una alternativa innovadora, viable, económica para el control de malezas acuáticas y mejora de las condiciones ambientales del entorno como de la calidad de vida de la población aledaña a fuentes Hídricas. Para lograr el objetivo, se evaluaron las siguientes variables reportadas en referencias [3,10,11]; marcas de alimentación en lámina foliar, deterioro y/o reducción de la planta en relación al tiempo, establecimiento de tiempo de duración de cada fase del ciclo biológico de las dos especies de *Neochetina*.

## MÉTODO

El diseño experimental se basó en un diseño de bloques aleatorizados con repeticiones, el experimento se orientó en vasos de plástico para facilitar el apareamiento de las especies. Se trabajó con 20 parejas de insectos del género *Neochetina*, distribuidas equitativamente en los vasos. Las variables fueron de tipo nominal y cuantitativo; la prueba estadística aplicada fue prueba de *chi-cuadrado-análisis independiente*; al considerar que los datos son no paramétricos y no se ajustaron a la curva de normalidad. El análisis estadístico se realizó con el paquete BioEstat V5,0.

### **Determinación de las condiciones *in-vitro* para la adaptación de los estadios que conforman el ciclo biológico del género *Neochetina***

**Cultivo de *E. crassipes* en tinas de plástico.** En el laboratorio de bioensayos de la Corporación Universitaria Autónoma del Cauca, se instaló reservorio con plantas de buchón de agua. La recolección se realizó mensualmente en la quebrada la Monja del barrio nuevo Japón (Popayán-Cauca). Las plantas se instalaron

**en diez recipientes de plástico con capacidad de 5L, distribuyéndose equitativamente en cada uno de ellos.** Semanalmente se efectuó la revisión del cultivo del buchón, para su respectiva desinfección [12].

**Obtención y caracterización de la colonia de especie *Neochetina*.** Los insectos de género *Neochetina* se encontraron en unos estanques de agua en el municipio de Villa Rica-Cauca (Latitud: 3,128742; longitud: -76,442665), luego de ser capturados, se llevaron al laboratorio de bioensayos de la Corporación Universitaria Autónoma del Cauca, se proporcionó calor mediante un calefactor que generó una temperatura *in vitro* entre 20 y 24°C, para facilitar su adaptación, según protocolo sugerido en referencias [3,10,13].

En el laboratorio de microscopía electrónica de la Universidad del Cauca, mediante el uso de un estereoscopio Nikon Modelo C-DSS 115 con cámara digital sight Ds-2 Mv; se identificó las características morfológicas generales de los insectos, tales como como cabeza, tórax, abdomen, élitros y patas, para confirmar especies y género (hembra y macho).

**Manutención de la colonia de las especies *Neochetina* sobre el Buchón de agua (*Eichhornia crassipes*).** En el laboratorio de Bioensayos de la Corporación Universitaria Autónoma del Cauca, se realizó el establecimiento para analizar la adaptación de los insectos, teniendo en cuenta condiciones como temperatura, humedad, iluminación, alimentación y conservación de las especies en su hábitat. El desarrollo experimental se realizó en 20 vasos plásticos de siete onzas cada uno con su respectiva colonia de especímenes, a una temperatura entre 20 y 24°C con la implementación de tres bombillas tipo incubadora, lo cual gradualmente se fue disminuyendo hasta lograr la adaptación a condiciones ambientales de Popayán (Cauca), temperatura entre 18 y 24°C [14].

**Ciclo biológico de las especies *Neochetina* a 20-24°C.** Se caracterizó cada una de las fases del ciclo biológico de las dos especies para determinar su tiempo de duración en condiciones *in vitro*, las cuales se describen a continuación.

**Cópula.** Se garantizó que los vasos tuvieran algodón húmedo en el fondo, tres láminas foliares de buchón, dos en las paredes del vaso y una sobre el algodón, se realizó un corte transversal de peciolo de 3 cm de longitud, tapa en lycra para permitir el ingreso del aire. Durante la ovoposición se observaron las hembras por medio del

microscopio estereoscópico, se colocó el trozo de peciolo de 3 cm con corte transversal en una caja de petri para que la hembra ovopositará en este corte.

**Incubación.** Con una pinza entomológica se extrajeron los huevos del tejido esponjoso del peciolo. Se contaron uno a uno a medida que se fueron ubicando en un nuevo corte de peciolo sano. Se revisó el corte transversal del peciolo examinando el estado en el que se encontraban los huevos colocados por la hembra hasta su eclosión.

**Desarrollo Larval.** Se reconocieron en el desarrollo larval de éste género tres instares: *Primer y Segundo Instar*: Las larvas se midieron para conocer su tamaño. Se realizó cambio del tejido vegetal, cada cinco días, para evitar daño por descomposición del tejido esponjoso del peciolo o en su defecto por contaminación por el excremento que poco a poco dejaba la pareja de insectos. *Tercer Instar*. Las larvas se conservaron en el corte del peciolo alrededor de 15 días para su alimentación. Luego se trasladaron a la corona y algunas al estolón de las plantas de buchón en los acuarios, método sugerido en [2, 3,15].

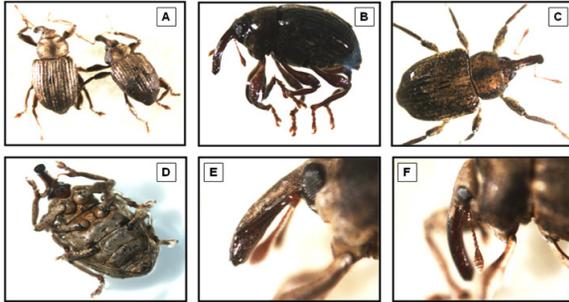
**Evaluación de la eficiencia de *N. bruchi* y *N. eichhorniae* en el control biológico del Buchón de agua en condiciones de laboratorio.** Se tuvo en cuenta como principal criterio de eficiencia, que indica control biológico el número de insectos, número de marcas de alimentación sobre las plantas, se cuantificó y analizó el número de plantas afectadas en relación con el tiempo cada ocho días, se tuvo en cuenta una por una las mordeduras de la lámina foliar y del peciolo que habían realizado los insectos para su alimentación [2]. Número de marcas de alimentación por área en lámina foliar. Se cuantificó teniendo en cuenta que cada lámina foliar presenta un diámetro promedio de 150 mm<sup>2</sup> y un peso promedio de 5 g.

## RESULTADOS

### Obtención y caracterización de la colonia de especie *Neochetina*

Los 122 organismos de las dos especies de *Neochetina* colectadas en Villa Rica (Cauca) con temperatura entre 26 y 28 °C, fueron adaptados paulatinamente a condiciones de Popayán (Cauca), con temperatura entre 18 y 24°C, lograndose un porcentaje de adaptación de especies en 15 días del 92% del total de insectos.

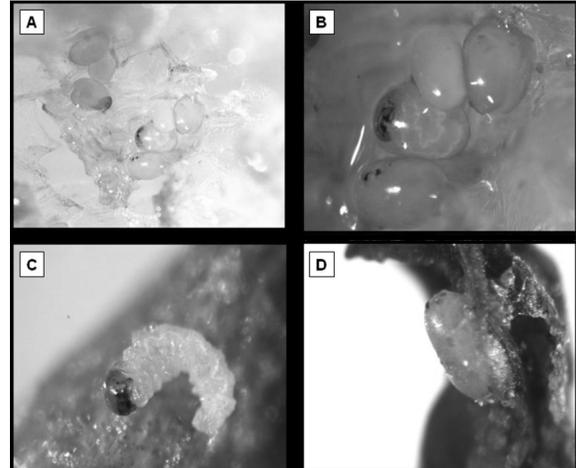
**Figura 1.** Identificación Morfológica del género *Neochetina*. (A) Hembra y macho de la especie *N. bruchi* en vista ventral, (B) Hembra de la especie *N. eichhorniae* en vista lateral, (C) Vista ventral del macho, (D) Hembra en vista dorsal, (E) Trompa macho, (F) Trompa hembra. Fotografías tomadas por el estereoscopio Nikon Modelo C-DSS 115 con cámara digital sight Ds-2 Mv, Laboratorio de microscopia electrónica-Universidad del Cauca.



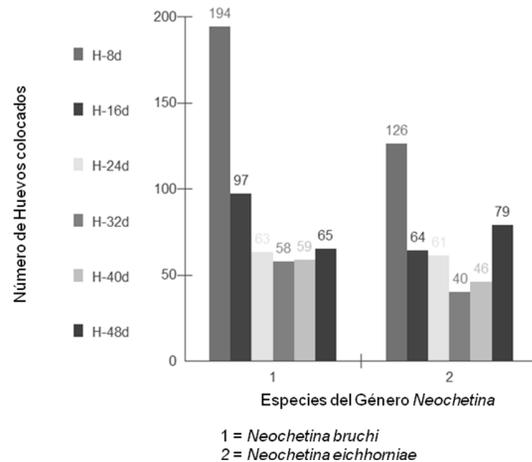
Después del tiempo de adaptación se realizó el análisis de características morfológicas (Figuras 1) con el estereoscopio especializado del laboratorio de microscopia electrónica de la Universidad del Cauca. Se identificó la especie, sexo y morfología, teniendo en cuenta características del rostrum indicando que: la especie de *N. bruchi* son de color pardo claro y la especie de *N. eichhorniae* son de color pardo oscuro. Los machos se caracterizan por tener un rostrum corto, cilíndrico y casi recto, más ancho y robusto desde la inserción de la antena hasta el ápice; está ligeramente comprimido, curvado hacia abajo y brillante (Fig. 1); mientras que el rostrum de las hembras, es más grande, uniformemente curvado y casi todo es cilíndrico, ancho y robusto desde la base hasta el ápice; brillante y glabro desde el frente de los ojos hasta el ápice; las hembras de las dos especies siempre fueron más grandes y voluminosas llegando a medir entre 4,52 mm y 4,64 mm. Con relación a los machos, estos fueron más cortos y pequeños con una medida de 4,05 mm a 4,20 mm.

**Caracterización del ciclo biológico de *N. eichhorniae* y *N. bruchi* en condiciones *in vitro*.** En cuanto a la Oviposición, como se muestra en las Figuras 2 y 3, a los ocho a diez días se generó el mayor número de oviposiciones para los dos especies, que al compararse, se muestra un  $p < 0,005$ , lo que soporta la diferencia significativa en el proceso de desarrollo entre *N. bruchi* y *Neochetina eichhorniae*, considerándose *N. bruchi*, más eficiente en ovipositar bajo condiciones *in vitro*.

**Figura 2.** Incubación y Eclosión de huevos de *Neochetina*. (A) Incubación de huevos en tejido esponjoso del peciolo, (B) Huevos cerca de eclosionar, (C) Larva recién emergida del huevo, (D) Huevo desarrollado.

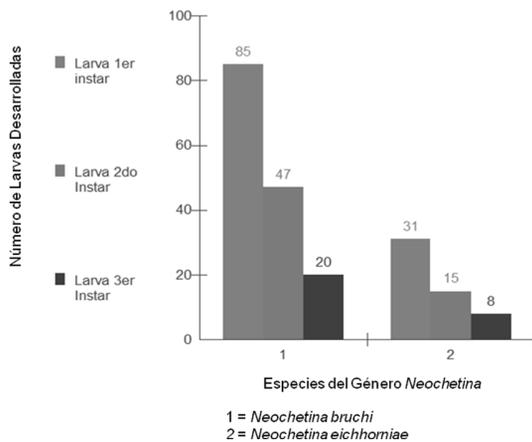


**Figura 3.** Número de Huevos de los insectos del género *Neochetina*.



Los resultados de la Figura 4 en relación al desarrollo larval, evidencian una diferencia significativa  $p = 0,0025$  en el número de larvas de cada uno de los tres instares y en el desarrollo del proceso entre las dos especies *N. bruchi* y *Neochetina eichhorniae*  $p < 0,005$ ; en relación con el tiempo las larvas fueron disminuyendo tanto en una especie como en la otra, de acuerdo a cada instar, mostrando disminución en relación con el tiempo. *N. bruchi* presentó mayor eficiencia en el desarrollo larval. En relación a desarrollo de las pupas, se realizó en las raíces de las plantas de los acuarios bajo una temperatura ambiental natural de la

**Figura 4.** Número de Larvas Desarrolladas en cada Instar.

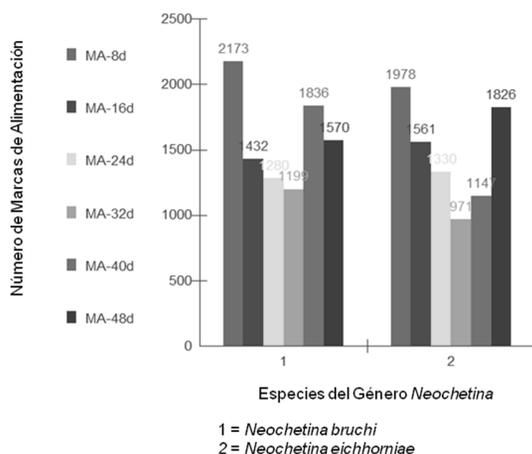


ciudad entre 18 y 24°C. Principal factor al cual se debe la disminución paulatina de los diferentes procesos de desarrollo de los insectos [1].

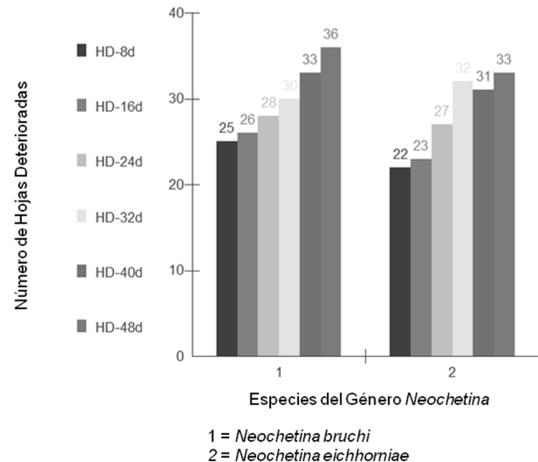
**Evaluación del comportamiento y la eficiencia del género *Neochetina* para el control biológico del Buchón de agua en condiciones de laboratorio**

De las 20 parejas de *Neoquetinos*, los resultados muestran un  $p < 0,005$  de significancia estadística, entre marcas de alimentación de *N. bruchi* y *Neochetina eichorniae* durante 48 días, mostrándose mayor eficiencia de alimentación en la especie *N. bruchi* (Figura 5). De acuerdo al gráfico se puede determinar que las dos especies en los primeros ocho días, consumieron más lámina foliar con relación a los siguientes días, esto pudo ser causa de estrés generado en

**Figura 5.** Número de marcas de alimentación en lámina foliar.



**Figura 6.** Número de Hojas Deterioradas con relación al Tiempo.



los organismos en el transcurso de acondicionamiento a su nuevo habitat y nuevas condiciones ambientales. La especie que mayor marcas y deterioro generó en las hojas fué *N. bruchi*.

La Figura 6, muestra una significancia estadística  $p = 0,0023$  en cuanto la relación entre el Número de hojas deterioradas y tiempo, es decir que existe una relación directamente proporcional entre dichas variables en las dos especies del género *Neochetina*, relación que confirma la hipótesis, a mayor tiempo mayor número de hojas deterioradas, nuevamente *N. bruchi* muestra mayor eficiencia con un número total de 36 hojas dañadas por marcas de alimentación.

Los resultados expresados en el Cuadro 1, muestran una diferencia significativa entre el área dañada en la lámina foliar entre las dos especies, evidenciándose como la especie más eficiente la *N. bruchi* al deteriorar mayor área promedio en hoja del Buchón de agua (*Eichhornia crassipes*).

Los resultados relacionados con análisis morfofisiológico y conteo que se realizó en el laboratorio de microscopia electrónica de la Universidad del

**Cuadro 1.** Área total dañada (mm<sup>2</sup>) en hoja del Buchón de agua (*Eichhornia crassipes*).

Especies	Área dañada (mm <sup>2</sup> ) Hoja (150 mm <sup>2</sup> / vaso)	Valor p
<i>N. bruchi</i> (N=20)	148,32 + 8,38	<0,005
<i>N. eichorniae</i> (N=20)	127,53 + 6,25	

Cauca, coinciden con los criterios morfológicos de caracterización de Neochetinos reportados en referentes [1, 5, 6, 7, 16] permitiendo identificar y cerciorar las características generales de las dos especies *N. bruchi* y *N. eichhorniae*, colectadas por medio de fotografías ventrales, laterales y dorsales de los organismos.

En las diferentes fases del ciclo biológico de las dos especies se presentó un desarrollo adecuado en relación con el tiempo, en cuanto a la Ovoposición, el incremento de número de ovoposiciones se debió al estrés que se genera por el cambio a entorno *in vitro*, los insectos en su afán de preservación de su especie, ovopositaron en mayor cantidad durante los primeros días, luego mantuvieron un número de ovoposiciones promedio en los días restantes, como se ha evidenciado en otros estudios [17,18]. Comparando las dos especies, se muestra un  $p < 0,005$ , considerándose *N. bruchi*, más eficiente en ovopositar bajo condiciones *in vitro*, esto debido a su adaptación más eficiente bajo estas condiciones, presentándose el mismo comportamiento como lo reportan en el documento de biología y comportamiento de las especies del género *Neochetina* [2,19].

La diferencia significativa  $p < 0,005$ , en el desarrollo larval de cada uno de los tres instares y la disminución en el desarrollo del proceso se evidenció en las dos especies *N. bruchi* y *N. eichhorniae*, mostrando dificultades para adaptarse [3], como se reporta en otros estudios [2, 3, 20, 21, 22], en donde se trabaja con un métodos *in vitro* e *in situ*, en estos estudios sugieren el control del proceso a largo plazo (dos a cuatro años) hasta lograr su adaptación completa, por lo tanto se analizan factores de desarrollo por más tiempo y en plantas completas de buchón de agua sin alteración de su hábitat; así que se sugiere para próximos estudios continuar con la adaptación y el monitoreo *in situ*.

En el estudio, el desarrollo de las pupas se realizó en las raíces de las plantas de los acuarios bajo una temperatura ambiental natural de la ciudad entre 18 y 22°C. Principal factor al cual se debe la disminución paulatina de los diferentes procesos de desarrollo de los insectos [13]. Comparado con otros estudios en los que las pupas se tuvieron en un invernadero de control biológico durante 30 días, después de transcurrido este tiempo emergieron los nuevos organismos, mientras que en éste estudio emergieron pocos organismos [3,13].

De las 20 parejas de *Neochetinos*, los resultados muestran un  $p < 0,005$  de significancia estadística, entre marcas de alimentación de *N. bruchi* y *N. eichhorniae* durante 48 días, mostrándose mayor eficiencia de alimentación en la especie *N. bruchi*. Las dos especies en los primeros ocho días *in vitro* consumieron más lámina foliar con relación a los siguientes días, esto se debió al estrés generado en los organismos en el trascurso de acondicionamiento a su nuevo habitat y nuevas condiciones ambientales. La especie que mayor marcas y deterioro generó en las hojas fue *N. bruchi*, constituyéndose como la especie más eficiente para realizar estudios en campo de control biológico de buchón de agua en condiciones *in vitro*, ya que de acuerdo a referencias como [2,13, 21,23,24,25,26,27,28] se obtiene buenos resultados con esta especie al trabajar en temperaturas entre 20 y 25°C, pero también es muy resistente a temperaturas más bajas entre los 15 y 20°C; como se presentó en nuestro estudio: temperatura in-vitro inicial entre 20 y 24°C, paulatinamente se fue disminuyendo y finalmente se dejó solo la temperatura ambiental de Popayán entre 18 y 20°C.

En cuanto la relación número de hojas deterioradas y tiempo, la diferencia significativa generada en los resultados, confirma la hipótesis, es decir que existe una relación directamente proporcional entre dichas variables en las dos especies del género *Neochetina*, A mayor tiempo mayor número de hojas deterioradas, debido a los procesos de adaptación natural para ambas especies; *N. bruchi* mostró mayor eficiencia de adaptación en cuanto un número total de 36 hojas dañadas por marcas de alimentación y en cuanto al área promedio en hoja del Buchón de agua (*Eichhornia crassipes*), este comportamiento eficiente se debió a la mayor capacidad de adaptación de *N. bruchi* a las condiciones climáticas e *in vitro* a la que fue expuesta, ya que *N. bruchi* se considera un excelente controlador biológico a temperatura más bajas que *N. eichhorniae* [10].

Al analizar los resultados del estudio se puede evidenciar diferencias en la eficiencia de control biológico de los agentes controladores *N. bruchi* y *N. eichhorniae*, las dos especies presentan en su momento comportamientos diferentes, no hay competencia de alimentación entre ellos, resultados que se comparan y se soportan con estudios reportados por el Control biológico de maleza acuática [2,29,30,31], en los cuáles se logra reducir en un 85% la presencia del buchón de agua en los cuerpos hídricos, en nuestro estudio se redujo de un 90 a 95% el área afectada por marcas de alimentación.

## CONCLUSIONES

Se estableció un protocolo *in vitro* para el control biológico de buchón de agua con *N. eichhorniae* y *N. bruchi*.

La especie *N. bruchi* fue más eficiente al mostrar un mejor resultado de adaptación, en los diferentes estadios de desarrollo de los insectos; copula, ovoposición, desarrollo larval, que *N. eichhorniae* realizó, esto se debió a que *N. bruchi* se adapta a temperaturas entre 18 y 22°C y *N. eichhorniae* a temperaturas un poco más altas entre 24 y 28°C.

Existe una relación directamente proporcional entre marcas de alimentación y tiempo (48 días), es decir a mayor tiempo, mayor número de marcas de alimentación en ambas especies de *Neochetina*. Se identificó que especialmente las parejas de la especie *N. bruchi* logró dañar 148,32 mm<sup>2</sup>/ la lámina foliar durante 48 días.

Teniendo en cuenta éste protocolo de adaptación *in vitro*, se puede aplicar control biológico *in situ* para controlar la proliferación excesiva de las malezas acuáticas en los cuerpos hídricos por medio del control biológico generaría un gran impacto socio-económico, ya que la relación costo/beneficio es muy favorable, reduciendo los problemas generados en las centrales eléctricas, en los canales de irrigación, en las represas, minimizando los índices de inundaciones, favoreciendo la pesca y navegación y mejorando las condiciones del desarrollo y el bienestar de la población.

Con este tipo de investigaciones se puede incentivar a la comunidad académica e investigativa y a las entidades que controlan y vigilan el ambiente (Corporaciones autónomas, entre otros) en nuestro país, a adelantar más estudios relacionados respecto al control biológico de malezas acuáticas, reduciendo el uso de plaguicidas y maquinaria pesada la cual afecta significativamente a los cuerpos hídricos.

## AGRADECIMIENTOS

A la Corporación Universitaria Autónoma del Cauca, por el apoyo para la ejecución del proyecto. Al Doctor Jorge Tabares, por su colaboración con la ubicación de los insectos en Colombia. Al Doctor Jimmy Guerreo por colaboración para el análisis estadístico. Al Biólogo Miller Guzmán, por la colaboración en el análisis morfológico de las especies.

## REFERENCIAS

- [1] VERDEJO, E., PALMERÍN, J., AIBAR, J., CIRUJEDA, A., TABERNER, A. y ZARAGOZA, C. Plantas invasoras: El lirio de agua, *E. crassipes* (Martius) Solms & Laubanch. (Madrid): Ministerio de Agricultura, Pesca y alimentación, secretaria general técnica, 2006, 8 p.
- [2] BOJÓRQUEZ, G. y AGUILAR, J. Control biológico de maleza acuática. México D.F. (México): 2014, 14p
- [3] MARTÍNEZ, O. Biología y comportamiento de *N. eichhorniae* (Warner) (Coleoptera: *Curculionidae: Eirrhiniinae*) en condiciones de laboratorio [Tesis Maestro en Ciencias]. Montecillo (México): Colegio de posgraduados, Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, Campus Montecillo, 2011, 84 p.
- [4] INSUASTY, A. What is happening with the water in the el Aburra Valley? *Ágora U.S.B.*, 16(1), 2016, p. 2-5.
- [5] MARTÍNEZ, O., ESTRADA, E., EQUIHUA, A. y VALDEZ, J. Morfología de *N. eichhorniae* (warner) (coleoptera: *curculionidae*). *Acta Zoológica Mexicana*, nueva serie, 2014, p. 247-267.
- [6] NEWETE, S., ERASMUS, B., WEIERSBYE, I., CHO, M. and BYRNE, M. Hyperspectral reflectance features of water hyacinth growing under feeding stresses of *Neochetina* spp. and different heavy metal pollutants. *International Journal Of Remote Sensing*, 35(3), 2014, p. 799-817.
- [7] CORDO, H.A. New agents for biological control of water hyacinth. Buenos Aires (Argentina): 1999, p. 68-74.
- [8] CENTER, T, HILL, M., CORDO, H. and JULIEN, M. Waterhyacinth. En: Van Driesche, R. G.; Blossey, B.; Hoddle, M.; Lyon, S.; Reardon, R. (Eds.). *Biological control of invasive plants in the eastern United States*. USDA-Forest Service, Forest Health Technology Enterprise Team. Morgantown. West Virginia (Estados Unidos): 2002, 413 p.
- [9] MARTÍNEZ, M., CELESTE, F. y POI, A. Preferencia alimentaria de *N. eichhorniae* (Coleoptera: *Curculionidae*) en plantas acuáticas de diferente valor nutritivo Food preference *N. eichhorniae* (Coleoptera: *Curculionidae*) by aquatic plants of different nutritional value. *Revista Colombiana de Entomología*, 39(1), 2013, p. 81-87.
- [10] HAMSATU, L., HAMADINA, C. and ANASO, U. Life Cycles of *N. bruchi* Warner and *N. eichhorniae* Hustache as Potential Biological Control Agents in the Semi Arid Zone of Nigeria. *American Journal of Life Sciences*, 2015, p. 219-222.

- [11] KORE, S., THITE, and KADAM, A. Occurrence of *N. bruchi* Hustache A Biocontrol agent of *E. crassipes* (Martius.) Solms in Satara, Maharashtra B.A. ZOO's PRINT, 30(7), 2015, p.17-19.
- [12] MONTOYA, W., PEÑA, E. y TORRES, G. Variaciones ultraestructurales inducidas por Cromo (VI) en hojas de jacinto acuático (*Eichhornia crassipes*). Limnetica, 34(1), 2015, p. 85-94.
- [13] MARTÍNEZ, F., FRANCESCHINI, M. and POI, A. Food preference *N. eichhorniae* (Coleoptera: Curculionidae) by aquatic plants of different nutritional value. Revista Colombiana de Entomología, 39(1), 2013, p. 81-87.
- [14] RICO, R. Aprovechamiento de buchón de agua a través de la fabricación de carbón vegetal en el municipio de Cicuco, Bolívar, (Colombia) [online]. 2011. Disponible: <http://roxanarico-roxy.blogspot.com/2011/10/aprovechamiento-de-buchon-de-agua.html> [citado 12 Julio de 2013].
- [15] OBERHOLZER, H. The Water Hyacinth Weevils (*N. eichhorniae* and *N. bruchi*). A Natural enemy of the Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in South Africa. Pretoria (South aFRICA): Agricultural Research Council, PPRI, Weeds Research Division, 2001.
- [16] MORAN, J. Feeding by Water hyacinth Weevils (*Neochetina* spp.) (Coleoptera: Curculionidae) in relation to site characteristics, plant size and biochemical factors. Environmental Entomology, 33, 2004, p. 346-355.
- [17] PUJA, R. and SUSHILKUMAR. Population dynamics and sex ratio of two biocontrol agents of water hyacinth. Indian Journal of Weed Science, 47(2), 2015, p. 188-192.
- [18] UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS. Control de plagas y malezas por enemigos naturales. Ft. Lauderdale (USA): University of California. Riverside, USA.T. D. Center, United States Department of Agriculture, Invasive Plants Research Laboratory, 2016.
- [19] OKE, A. and ADEKOYA, B. Life cycle and pupation site preference of *N. eichhorniae* Warner (Coleoptera: Curculionidae) on water hyacinth. European Journal of Scientific Research, 17(3), 2012, p. 291-295.
- [20] BOJÓRQUEZ, G. Control biológico de maleza acuática en las presas, derivadoras y ríos del área de influencia del Distrito de Riego 010. Sinaloa (México): Universidad Autónoma de Sinaloa, 2007.
- [21] AGUILAR, J., CAMARENA, O., CENTER, D. and BOJÓRQUEZ, G. Biological control of Water hyacinth in Sinaloa, Mexico with the weevils *N. bruchi* and *N. eichhorniae*. Biocontrol, 48, 2003, p. 595-608.
- [22] COETZEE, J., JONES, R. and HILL, M. Waterhyacinth, *Eichhorniacrassipes* (Pontederiaceae), reduces benthic macroinvertebrate diversity in a protected subtropical lake in South Africa. Biodiversity and Conservation, 23(5), 2014, p. 1319-1330
- [23] EMPRESA PÚBLICA DE MEDELLIN (EPM). EPM logra controlar el buchón de agua en sus embalses Porce II y Peñol-Guatapé. Medellín (Colombia): 2011, 5 p
- [24] ARTEAGA, J., CUÉLLAR, W., RENSSON, D., RÍOS, S. y GIRALDO, S. Manejo de plantas acuáticas invasoras en embalses de EPM: buchón de agua (*Eichhornia crassipes*) en el embalse Porce II. Medellín (Colombia): 2010, 71 p.
- [25] COLPRENSA EL COLOMBIANO. Del buchón de agua salen libretas [online]. 2014. Disponible: <http://www.vanguardia.com/historico/28056-del-buchon-de-agua-salen-libretas> [citado 4 de junio de 2013].
- [26] CAMARENA, O. y AGUILAR, J. El IMTA y el control biológico de maleza acuática en distritos de riego del país (Experiencias desde 1990). 1 ed. México D.F. (México): Instituto mexicano de tecnología del agua, 2012, 78 p.
- [27] GLOBAL INVASIVE SPECIES DATABASE. 100 de las especies exóticas invasoras más dañinas del mundo. Madrid (España): Fondation d'Entreprise Total, 1998-2000, 11 p.
- [28] MORAN J. Feeding by Water hyacinth Weevils (*Neochetina* spp.) (Coleoptera: Curculionidae) in relation to site characteristics, plant size and biochemical factors. Environmental Entomology, 33, 2004, p. 346-355.
- [29] OKE, O. and ADEKOYA, B. Life cycle and pupation site preference of *N. eichhorniae* Warner (Coleoptera: Curculionidae) on water hyacinth. European Journal Science Research, 17(3), 2007, p. 291-295.
- [30] CORREA, L. Buchón en embalse del peñol-Guatapé, está bajo control [online]. Disponible: <http://tips.elcolombiano.com/MedioAmbiente/Buch%C3%B3nenrepresapreocupa/tabid/1821/Default.aspx> [citado 4 de junio de 2013].
- [31] HERNÁNDEZ, J., TORRES, A., CONEJO, F., GONZÁLEZ, O. y ARDILA, A. Aprovechamiento de *E. crassipes* (lirio acuático) proveniente de la zona de Yuriria, Guanajuato, como fuente de Lignina, Celulosa y Hemicelulosa. Innovación y desarrollo tecnológico revista digital, 7(1), 2015, p. 1-5.