

**Conducta de apareamiento y progenie entre
biotipos chino y nepalés de *Lilioceris cheni*
(Coleóptera: Chrysomelidae), agente de
control biológico de *Dioscorea bulbifera***

Valeria Soledad Guerrero Kesselman

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2016

ZAMORANO
CARRERA DE AMBIENTE Y DESARROLLO

**Conducta de apareamiento y progenie entre
biotipos chino y nepalés de *Lilioceris cheni*
(Coleóptera: Chrysomelidae), agente de
control biológico de *Dioscorea bulbifera***

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Ambiente y Desarrollo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Valeria Soledad Guerrero Kesselman

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2016

Conducta de apareamiento y progenie entre biotipos chino y nepalés de *Lilioceris cheni* (Coleóptera: Chrysomelidae), agente de control biológico de *Dioscorea bulbifera*

Valeria Soledad Guerrero Kesselman

Resumen. En el 2009, el biotipo chino del coleóptero *Lilioceris cheni* fue liberado en Florida como agente de control biológico para contrarrestar el efecto invasivo de la papa de aire (*Dioscorea bulbifera*), una maleza extremadamente agresiva. El biotipo de origen nepalés de *Lilioceris cheni* aún se encuentra bajo investigaciones de laboratorio para analizar su liberación. El presente estudio tiene como objetivo describir qué pasaría si ambos biotipos tienen contacto en la naturaleza y tienen la oportunidad de copular una sola vez. Se investiga la selección de pareja entre los biotipos, el número de huevos fértiles ovopositados tras sólo un apareamiento, el número de larvas emergidas, pupas formadas, adultos y cantidad de hembras por cada posible combinación entre los biotipos chino y nepalés. El estudio fue desarrollado bajo condiciones de laboratorio utilizando individuos de líneas genéticamente puras. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar y se analizó estadísticamente utilizando un *alfa* de 0.05. Los resultados de la selección de pareja sugieren que los machos de ambos biotipos cortejan a las hembras dirigiéndose rápidamente hacia ellas, reduciendo las posibilidades de que sean éstas quienes escojan al macho que las copule. Las hembras fueron conservadas al finalizar la cópula y su progenie no mostró diferencias en cantidad. Se concluye que no existe diferencia entre la selección de parejas entre biotipos de *Lilioceris cheni* ni en la cantidad de progenie producida en una sola cópula.

Palabras clave. Cópula, maleza, reproducción, selección de pareja.

Abstract. In 2009, the chinese biotype of the coleopteran *Lilioceris cheni* was released in Florida as a biological control agent in order to reduce the invasive effects of the air potato (*Dioscorea bulbifera*), an extremely aggressive weed. Nevertheless, another biotype from Nepal is under laboratory investigations in order to analyze feasibility of release in Florida. This study contributes to discover what could happen if both biotypes have contact in the field and mate once. Partner selection between biotypes, the numbers of eggs oviposited, larvae, pupae, adults, and females produced by each possible type of mating. The study was developed under laboratory conditions using individuals of genetically pure lines. An experimental design completely random was used and statistically analyzed using an *alpha* of 0.05. The results of mate selection suggest that males from both biotypes court females by rapidly approaching them; thus, heading rapidly so the mating decision is made by the male. Females were preserved at the end of copulation and their offspring showed no difference in quantity. The study concluded that there is no difference between the selection of partners among biotypes of *Lilioceris cheni* or the number of offspring produced in a single copulation.

Key words: Copulation, mate selection, reproduction, weed.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	4
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
4. CONCLUSIONES	12
5. RECOMENDACIONES	13
6. LITERATURA CITADA	14
7. ANEXOS.....	16

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Resultados del <i>G Test</i> para el análisis de selección de pareja de <i>Lilioceris cheni</i>	9
2. Productos de los apareamientos de <i>Lilioceris cheni</i>	10
3. Análisis de varianza para la progenie del cruzamiento entre biotipos.....	10

Figuras	Página
1. Papa de aire cubriendo la vegetación nativa en Florida, en 2014.....	1
2. Mapa de distribución de <i>Dioscorea bulbifera</i> en Florida y los Estados Unidos.....	2
3. Adultos de <i>Lilioceris cheni</i> del biotipo chino (izquierda) y adulto del biotipo nepalés (derecha).....	3
4. Parejas de <i>Lilioceris cheni</i> separadas al escoger pareja sexual	5
5. Contenedor acrílico con hojas de <i>Dioscorea bulbifera</i> y <i>Lilioceris cheni</i> para monitorear la selección de pareja.....	5
6. Hembra nepalés de <i>Lilioceris cheni</i> ovopositando	6
7. Ovarios (A) y edeago (B) de adulto de <i>Lilioceris cheni</i> . Instalaciones de cuarentena de la Universidad de Florida, en Fort Pierce, USA.....	7
8. Parejas resultantes del experimento de selección de pareja de <i>Lilioceris cheni</i>	9
9. Relación entre el tiempo de apareamiento y producción de larvas en <i>L. cheni</i>	11

Anexos	Página
1. Parejas formadas y resultados de las disecciones durante el experimento de selección entre biotipo	16
2. Parejas utilizadas para la toma de datos en el experimento de progenie.	20

1. INTRODUCCIÓN

La papa de aire (*Dioscorea bulbifera*), una enredadera herbácea, trezada y perenne, originaria de Asia, fue introducida a la península de Florida como planta medicinal en 1905. A partir de 1944 fue conocida como una de las malezas más agresivas y peligrosas en Florida (Overholt et al., 2016). Actualmente, está considerada como una de las 79 especies invasivas de Categoría I en Estados Unidos de América por el Consejo de Plantas Exóticas y Pestes de Florida [FLEPPC], (2015). Las plantas en Categoría I modifican estructuras de las comunidades de plantas autóctonas, alteran funciones ecológicas o se hibridan con las nativas (Overholt et al., 2016). La papa de aire cubre el dosel de los árboles y arbustos bloqueando la luz del sol, desplazando a las comunidades nativas y sofocando la vegetación por debajo de ella (Figura 1). Compite con la vegetación nativa teniendo una ventaja debido a la ausencia de factores de control natural como enfermedades o depredadores (Center, Overholt, Rohrig y Rayamajhi, 2012; Kaufman y Kaufman, 2012). Esta maleza se ha extendido por toda Florida, invadiendo ambientes húmedos, rocosos, sumideros, bosques aluviales, pantanos y comunidades rurales (Langeland, 2008).



Figura 1. Papa de aire cubriendo la vegetación nativa en Florida, en 2014. Foto por: Beth Curry.

La papa de aire tiene su origen en África, Asia y Oceanía y su nombre se debe a la presencia de tubérculos axiales, similares a papas a través de los cuales se reproduce asexualmente (Hammer, 1998). En Florida, su dispersión se dio por el traslado de sus bulbillos por parte humana (Center y Overholt, 2012; Center et al., 2013). Actualmente, la papa de aire se encuentra en 60 de 67 condados en Florida, con presencia; además en Texas, Alabama, Mississippi, Louisiana, Georgia y Hawaii (Figura 2).

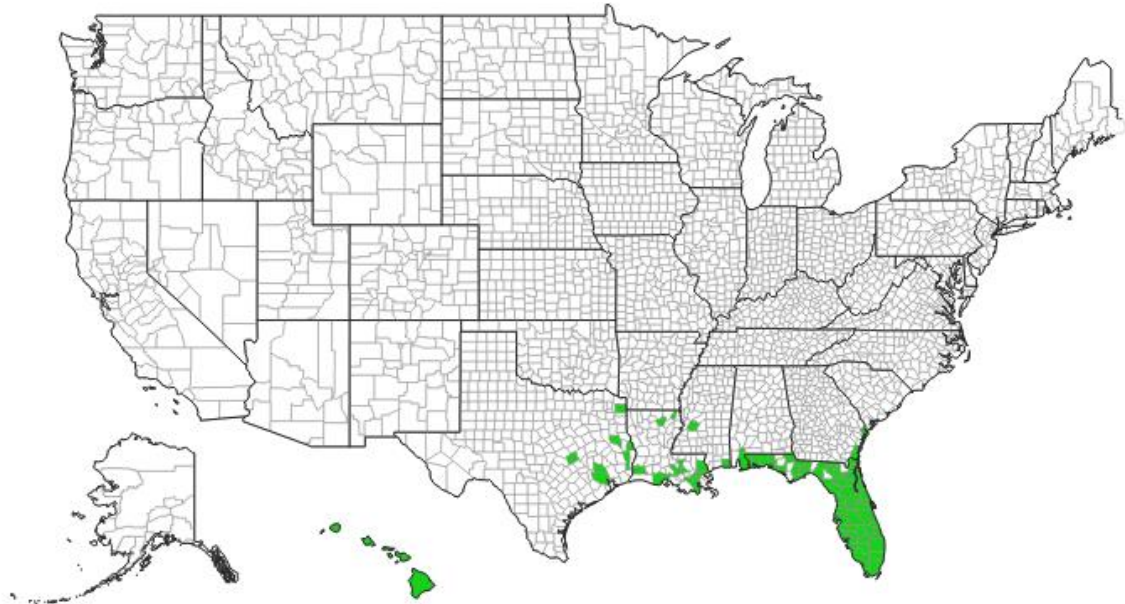


Figura 2. Mapa de distribución de *Dioscorea bulbifera* en Florida y los Estados Unidos
Fuente: EDDMaps.org (2016).

El programa de control biológico contra la papa de aire empezó a implementarse a partir del 2002 al descubrir al coleóptero *Lilioceris cheni* alimentándose de las hojas de la maleza en el valle de Katmandú de Nepal (Overholt et al., 2016; Pemberton y Witkus, 2010). Desde el 2012 hasta el 2015 se han liberado en Florida 429,668 individuos del biotipo chino de *Lilioceris cheni* (Coleoptera: Chrysomelidae) (Overholt et al., 2016). Este coleóptero, de origen asiático (Nepal, Bangladesh, India, Malasia, Birmania, Sri Lanka y China) cuenta con dos biotipos: chino y nepalés. En adultos, ambos miden cerca de 9 mm de largo y 4 mm de ancho (Figura 3). La cabeza, abdomen, patas y tórax de ambos biotipos son negros. Los élitros del biotipo nepalés son marrones y los del biotipo chino son rojos (Center y Overholt, 2013).



Figura 3. Adultos de *Lilioceris cheni* del biotipo chino (izquierda) y adulto del biotipo nepalés (derecha). Fotos por: Beth Curry.

El ciclo de vida de *Lilioceris cheni* se completa en aproximadamente 24 a 28 días pasando por etapas de huevo, larva, pupa y adulto (Center y Overholt, 2013). Pruebas intensivas de alimentación en varias plantas huéspedes demostraron que se trata de un alimentador especialista de la papa de aire (Pemberton y Witkus, 2010). Pruebas adicionales en la población china confirmaron que la especie es monófaga en papa de aire (Pemberton y Witkus, 2010). La población china fue liberada por primera vez en los Estados Unidos de América en la península de Florida en 2012 (Center et al., 2013).

Pese a que se permitió que el biotipo chino de *Lilioceris cheni* fuera liberado en Florida, el biotipo de Nepal se encuentra aún en investigación. El presente estudio de parámetros reproductivos entre biotipos contribuye al conjunto de investigaciones del Departamento de Agricultura de Estados Unidos de América (USDA), la Universidad de Florida y el Departamento de Agricultura y Servicios al Consumidor de Florida ante la liberación del biotipo. Estudios de especificidad alimentaria, depredadores en el medio, desarrollo de la papa de aire en medios con liberación de biotipos, tolerancia al frío, tiempo de desarrollo y sobrevivencia de individuos, tasa de consumo de la maleza, enfermedades y parámetros biológicos (estados de diapausa) están siendo realizados para su efectiva liberación. La mayoría de estos estudios aún no han sido publicados pero varios ya están disponibles (Lake et al., 2015; Rayamajhi et al., 2015).

La presente investigación tiene el objetivo de analizar la conducta de apareamiento de dos biotipos de *Lilioceris cheni* (chino y nepalés) y su respectiva progenie luego de una sola cópula. Para ello se planteó: (1) determinar si el escarabajo *Lilioceris cheni* prefiere aparearse con individuos de su mismo biotipo; (2) comprobar si las parejas híbridas de los dos biotipos de *Lilioceris cheni* procrean más descendencia fértil, en comparación con las líneas puras, en un solo apareamiento; y (3) establecer si las parejas híbridas de los dos biotipos de *Lilioceris cheni* producen más hembras que con las líneas puras en un solo apareamiento. Los ensayos fueron diseñados con la colaboración del Dr. William Overholt de la Universidad de Florida, y fueron realizados dentro de los laboratorios manejados por el Dr. Overholt y bajo la supervisión del mismo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Crianza de insectos. El experimento fue conducido en el Centro de Educación e Investigación Indian River (IRREC) de la Universidad de Florida, en el Laboratorio de Control Biológico y Prevención de Plagas (BCRCL), Fort Pierce, USA. Las colonias de biotipos de insectos chinos y nepaleses se mantuvieron en el BCRCL. Los insectos fueron separados al emerger de su estado de pupa en contenedores acrílicos individuales ($12 \times 12 \times 12$ cm) dentro de cámaras de crecimiento, con ambiente controlado (28 ± 2 °C, humedad de 70–80%, fotoperíodo con 14 horas de luz y 10 de obscuridad) durante 14 días, mientras alcanzan la madurez sexual (Overholt et al., 2013). Para la toma de datos de los experimentos se utilizaron 98 insectos adultos de cada biotipo. El número total de insectos bajo crianza fue mayor (120 aproximadamente por cada biotipo) como respaldo ante posibles muertes pre-experimento.

Plantas. La investigación fue conducida en invierno cuando la maleza no crece en el campo. Las plantas utilizadas fueron criadas en invernaderos bajo luz artificial, a una temperatura de 26 °C y humedad ambiental de 80%. Las hojas producidas en invernaderos fueron ocasionalmente suplidas por hojas recogidas en el exterior.

Diseño experimental. Para cada ronda de experimentos se tomaron 11 adultos vírgenes tanto nepaleses como chinos de 20 a 30 días de edad. Estos fueron colocados dentro de un contenedor (16 cm de altura \times 12 cm de ancho \times 21,5 cm de diámetro) con hojas de papa de aire frescas. Una vez que los insectos escogieron una pareja sexual, la pareja fue cuidadosamente removida del contenedor utilizando una hoja (o removiendo la hoja en caso de ser necesario). Cada ronda de experimentos duró 2 horas. Cada pareja se mantuvo en un recipiente acrílico más pequeño (12 cm de altura \times 12 cm de ancho \times 12 cm de diámetro) con más hojas. El macho se retiró inmediatamente al terminar el primer apareamiento y se registró la duración de la cópula (Figura 4). Cada hembra fue visitada todos los días a las 9:30 am, y sus huevos depositados durante el día fueron colectados. Las hojas fueron reemplazadas según lo necesario. La técnica se repitió en 8 ocasiones.

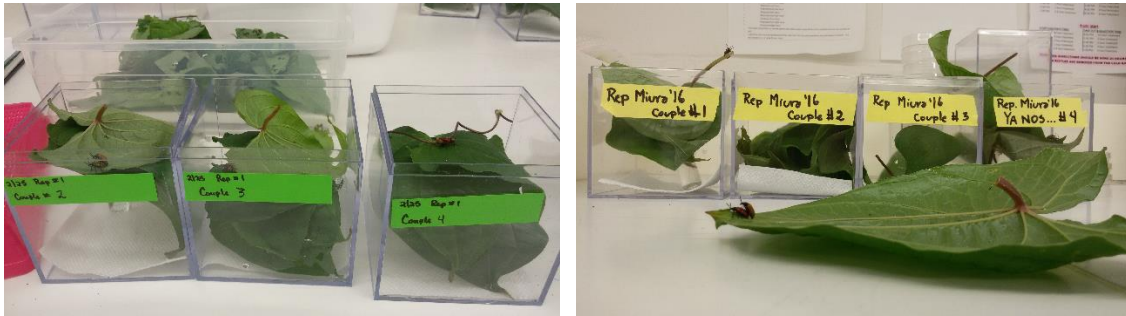


Figura 4. Parejas de *Lilioceris cheni* separadas al escoger pareja sexual.

Selección de pareja. Se dispuso a 22 adultos vírgenes de ambos biotipos en el contenedor acrílico (16 cm de altura × 12 cm de ancho × 21,5 cm de diámetro) con hojas frescas de *Dioscorea bulbifera* (Figura 5). Se reconocieron y conforme se empezó la cópula, las parejas formadas fueron registradas y separadas del resto de insectos. Los coleópteros que no copularon al finalizar el experimento fueron diseccionados para conocer su sexo. Los datos se suprimieron en el caso de presentarse individuos de un determinado biotipo del mismo sexo (todos machos o todas hembras). Cada sesión del experimento tuvo una duración de dos horas. Alexander, Marshall y Cooley (1997) interpretan al apareamiento entre insectos con alas como una secuencia de ocho pasos: acercamiento, cortejo, cópula, inseminación, postcópula, fertilización, cuidado parental y nuevo apareamiento. Para la elección de la pareja sexual, este estudio se enfocó en analizar los tres primeros.



Figura 5. Contenedor acrílico con hojas de *Dioscorea bulbifera* y *Lilioceris cheni* para monitorear la selección de pareja.

Crianza y mantenimiento de las masas de huevos. Los huevos fueron criados hasta convertirse en larvas, pupas y adultos. El sexo fue determinado por disección. Se compararon los datos obtenidos entre las parejas formadas por $Nep_{\text{♀}} + Chin_{\text{♂}}$, $Nep_{\text{♂}} + Chin_{\text{♀}}$, $Nep_{\text{♀♂}}$ ó $Chin_{\text{♀♂}}$ para: cantidad de huevos ovopositados diariamente, larvas emergidas al quinto día de ovoposición, pupas, adultos y hembras diseccionadas.

Mantenimiento de huevos. *Lilioceris cheni* ovoposita a manera de masa de huevos en el envés de las hojas. Una vez al día, las hojas de *Dioscorea bulbifera* puestas en cada contenedor individual fueron recolectadas y reemplazadas por hojas frescas. Los huevos encontrados en cada hoja fueron contados y a su vez enrollados con más hojas frescas para disposición de las larvas que eclosionen de los huevos fértiles (Figura 6). Estas fueron guardados en un contenedor ovoide (12 cm de altura x 5 cm de diámetro) para que con su ligera presión éste mantuviera la humedad adecuada para que puedan desarrollarse y eclosionar. Cada contenedor con masas de huevos fue puesto en el cuarto de crianza ($28 \pm 2^\circ\text{C}$, 70–80% humedad relativa, fotoperíodo de 14 horas luz y 10 de oscuridad).



Figura 6. Hembra nepalés de *Lilioceris cheni* ovopositando.

Crianza de larvas. Luego de cinco días, los huevos contados y puestos en los cuartos de crianza fueron revisados, las larvas que eclosionaron se contaron utilizando una lupa y posteriormente fueron trasladadas a un contenedor (largo 30 cm, ancho 20 cm, altura 20 cm) con hojas frescas de *Dioscorea bulbifera*. Para facilitar el empuje se utilizó vermiculita (sustancia mineral compuesta de silicato de aluminio con hierro-magnesio). Una mezcla de 500 gramos de vermiculita y 120 ml de agua fue depositada en cada contenedor para preservar la humedad de las hojas y larvas. Las hojas fueron reemplazadas día de por medio para garantizar la alimentación de las larvas con material vegetal fresco y limpio.

Conteo y registro de adultos. El conteo de adultos se realizó una vez éstos emergieron de la fase de pupa. El dimorfismo sexual en crisomélidos no es muy aparente, salvo que los machos son ligeramente más pequeños que las hembras (Jolivet y Petitpierre, 1981). En especies como *Lilioceris cheni*, éste solo puede conocerse a través de la disección de los adultos. Las hembras tienen ovarios y los machos edeago (pene) (Figura 7).

Análisis estadístico. Utilizando el Statistical Analysis Software (SAS), se comparó la elección de pareja entre ambos biotipos, realizándose un test G de independencia, utilizando un nivel de significancia de $\alpha=0.05$. El estudio se replicó ocho veces. Para analizar la variación entre la cantidad de huevos ovopositados, número de larvas, pupas, adultos y hembras entre los distintos grupos de parejas (Nep $_{\text{♀}}$ + Chin $_{\text{♂}}$, Nep $_{\text{♂}}$ + Chin $_{\text{♀}}$, Nep $_{\text{♀♂}}$ o Chin $_{\text{♀♂}}$) se realizó un test ANOVA simple, evaluando por separado cada dato, con 12 parejas en total.

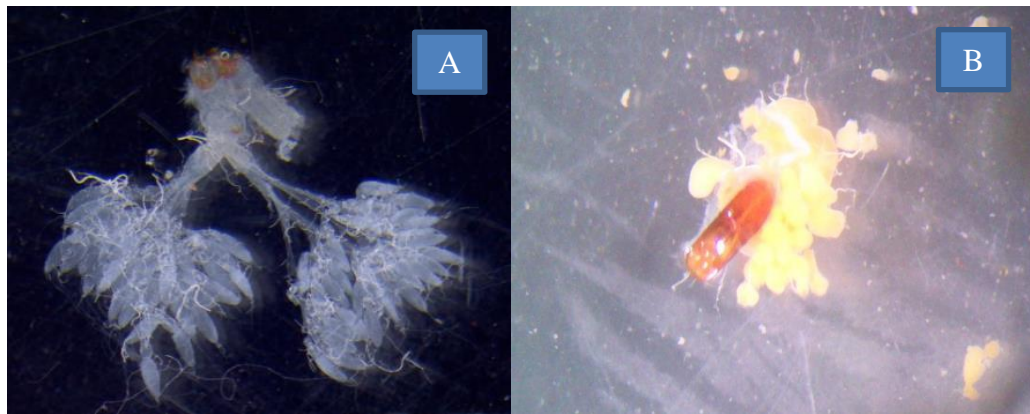


Figura 7. Ovarios (A) y edeago (B) de adulto de *Lilioceris cheni*. Instalaciones de Cuarentena de la Universidad de Florida, en Fort Pierce, USA. Créditos: William A. Overholt.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Elección de pareja sexual. Al liberar los biotipos en el contenedor, éstos caminaron y treparon por las hojas de *Dioscorea bulbifera*. Este comportamiento corresponde a la parte de la fase de formación de pares o fase de acercamiento (Alexander, Marshall y Cooley, 1997). La mayor parte de las parejas fue conformada en los primeros 20 minutos de cada ronda de experimento.

En la fase de cortejo, los insectos machos se dirigieron rápidamente hacia las hembras. Algunos tuvieron contacto con varios individuos antes de seleccionar su pareja. El contacto principal se dio con la interacción de las antenas antes de que el macho suba al lomo de la hembra. La definición funcional de cortejo asume que el individuo que busca aparearse (usualmente el macho) realiza un esfuerzo para reducir la resistencia a la cópula del otro individuo. Esto puede ser motivacionalmente al mostrar su presencia delante de la hembra y que ésta deba escogerlo independientemente del macho (el caso de *Lilioceris cheni*) o, mostrando sus cualidades positivas que puedan reducir la posibilidad de que la hembra escoja a otro individuo (Alexander et al., 1997). Estudios similares con el coleóptero *Diabrotica virgifera* en condiciones de laboratorio muestran un comportamiento similar en el cortejo del macho, acercándose de manera agitada a la hembra y con vibración de sus antenas (Spencer et al., 2009).

Durante el proceso de apareamiento se observaron conductas agresivas en machos de ambos biotipos: observaciones en repeticiones 2, 4, 5 y 6 (Anexo 2). Al momento de la cópula, es necesario que el edeago (pene) sea introducido en la hembra; un individuo puede presentar resistencia, pero su pareja se acoplará mecánicamente o físicamente (Alexander et al., 1997). De un total de 196 coleópteros utilizados se formaron 53 parejas que representan al 54% de la población de insectos. De las parejas formadas, el 57% (30 parejas) escogió un individuo de su mismo biotipo, mientras que el 44% restante (23 parejas) optó por uno diferente (Figura 8). Estas elecciones contrastan con los resultados de Jolivet y Vall (1981) en donde aseveran que la hibridación entre crisomélidos no suele ocurrir en el campo (estudios realizados para el cruce de *Gastrophysa viridula* de Bélgica con *Gastrophysa cyanea* de California).





Tipos de pareja formadas			
$N_{\text{♀}} \times N_{\text{♂}}$	$C_{\text{♀}} \times C_{\text{♂}}$	$N_{\text{♀}} \times C_{\text{♂}}$	$C_{\text{♀}} \times N_{\text{♂}}$
17	13	12	11
			

Figura 8. Parejas resultantes del experimento de selección de pareja de *Lilioceris cheni*.

Una vez recolectados los datos de cada repetición, se diseccionó a los individuos que no se aparearon con el resto de individuos, para determinar el sexo de cada uno (Anexo 2). Ninguno de los biotipos mostró una preferencia sexual significativa para su mismo u otro biotipo (Cuadro 1). Los machos adultos y las hembras de ambos biotipos pueden entrar en el cortejo y el apareamiento con éxito dando lugar a la fertilización de los huevos y a tener descendencia F1.

Cuadro 1. Resultados del *G Test* para el análisis de selección de pareja de *Lilioceris cheni*.

Repetición	$N_{\text{♀}} \times N_{\text{♂}}$	$C_{\text{♀}} \times C_{\text{♂}}$	$N_{\text{♀}} \times C_{\text{♂}}$	$C_{\text{♀}} \times N_{\text{♂}}$	G	GI	P
1	2	1	1	2	0.59672	3	0.89718
2	3	2	1	1	1.36691	3	0.71331
3	2	1	0	1	2.28157	3	0.51606
4	1	0	2	1	2.28157	3	0.51606
5	3	0	3	2	4.39104	3	0.22222
6	0	3	2	1	3.93554	3	0.26851
7	3	3	1	2	1.24401	3	0.74247
8	3	3	2	1	1.24401	3	0.74247
Total G					17.3414	24	0.83374
Agrupada G	17	13	12	11	1.48235	3	0.68635
			Heterogeneidad G		15.859	21	0.77752

Fecundidad en las hembras, larvas, pupas, hembras y la supervivencia total de la progenie. Al inicio del experimento se conservaron para su monitoreo 6 parejas de cada tipo posible entre los biotipos. Durante la toma de datos varias de las parejas fueron suprimidas por muerte, no ovoposición y ovoposición sin fertilización (Anexo 3), dejando solo tres parejas disponibles por tratamiento (Cuadro 2). Las parejas puras de *Lilioceris*

cheni obtuvieron un porcentaje de larvas (producto de huevos fertilizados) de 44% C♀C♂ y 42% N♀N♂ comparado con las parejas híbridas de N♀C♂ con 36% y C♀N♂ con 47%.

Cuadro 2. Productos de los apareamientos de *Lilioceris cheni*.

Origen de la pareja	Tipo de pareja	Duración de cópula (minutos)	Número de huevos	Número de larvas	Número de pupas	Número de adultos	Número de hembras
R3 P2	C♀C♂	34	1155	855	601	473	241
R4 PF		410	1777	715	402	275	140
R6 P3		176	1017	466	216	153	77
R2 P1	N♀C♂	248	2086	564	311	208	111
R4 PC		190	2200	1058	633	318	163
R6 P1		197	1048	283	235	201	102
R4 PE	C♀N♂	270	1821	801	553	357	190
R5 P6		278	1131	782	541	349	178
R6 P4		249	825	289	218	160	89
R2 P3	N♀N♂	123	1594	891	400	315	150
R2 P5		149	2277	1002	364	141	76
R4 PA		115	1370	385	146	118	61

No existe diferencia significativa entre la fecundidad en hembras de ambos biotipos de *Lilioceris cheni* sin importar si se aparearon con machos de su mismo o diferente biotipo. La cantidad de larvas emergidas, adultos o hembras por tipo de pareja tampoco difiere (Cuadro 3). Estudios similares realizados en biotipos B y Q de Mosca Blanca (Homoptera: Aleyrodidae) demuestran que el apareamiento inter-biotipos no afecta la cantidad de huevos ovopositados, pupas o adultos (Omondi et al., 2005). Estos resultados contrastan con la progenie producida por *Gastrophysa viridula* de Bélgica con *Gastrophysa cyanea* de California en la que su F1 mostró signos de displasia (anomalía en los tejidos) y esterilidad (Jolivet y Vall, 1981); rasgos no encontrados en este experimento.

Cuadro 3. Análisis de varianza para la progenie del cruzamiento entre biotipos.

Parámetro	Valor	
	F	P
Huevos ovopositados	0.87	0.4970
Larvas emergidas	0.12	0.9472
Pupas	0.29	0.8312
Adultos	0.54	0.6658
Hembras	0.67	0.5962

Adicionalmente, utilizando los datos recolectados del tiempo de apareamiento entre las parejas, se analizó si el tiempo en el cuál el macho está sobre la hembra al momento del apareamiento se relaciona con la cantidad de progenie producida. El análisis se realizó utilizando el programa SAS, regresión lineal simple, variable independiente: duración del apareamiento, *alfa* de 0.05. El resultado no fue significativo ($P = 0.44$) (Cuadro 4). Alexander et al. (1997) explican este fenómeno aseverando que en coleópteros es común que el macho pase varios minutos, horas o días sobre la hembra sin existir penetración, por lo que la fertilización no se lleva a cabo.

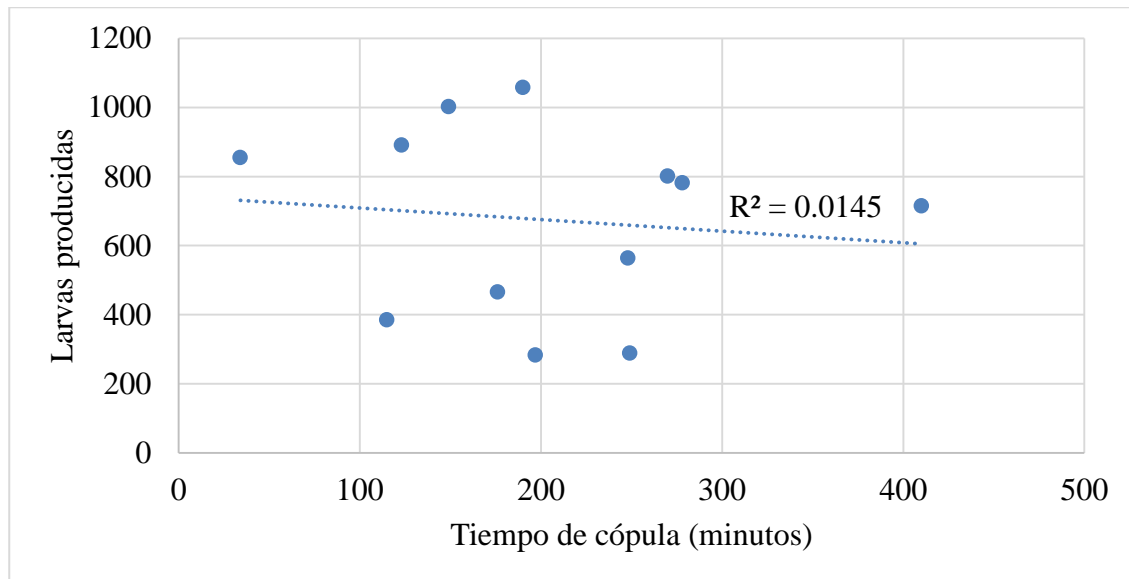


Figura 9. Relación entre el tiempo de apareamiento y producción de larvas en *Lilioceris cheni*.

4. CONCLUSIONES

- Se establece que los biotipos chino y nepalés tienen una conducta similar de apareamiento y procreación. En laboratorio, ambos biotipos muestran compatibilidad sexual: el 57% de parejas formadas fueron por individuos del mismo biotipo por lo que no existe una diferencia significativa en la selección de pareja entre los biotipos chino y nepalés de *Lilioceris cheni*. Las pruebas de laboratorio indican que si el biotipo nepalés de *Lilioceris cheni* es liberado en Florida, éste se apareará y tendrá descendencia con el biotipo chino del coleóptero.
- Las parejas puras y mixtas entre los biotipos chino y nepalés de *Lilioceris cheni* se comportaron de manera similar, sin ninguna diferencia significativa. Presentaron similar cantidad de huevos ovopositados, larvas, pupas, adultos y hembras. El número promedio de huevos por pareja híbrida durante 30 días fue de 1,519 y de parejas puras fue de 1,532. El promedio de larvas eclosionadas por pareja híbrida fue de 42% mientras que el de la pareja pura fue de 48%. Se observa que ésta es la etapa en dónde la progenie sufre más pérdidas. El promedio de pupas formadas por pareja híbrida fue del 61%, y en las parejas puras fue de 54%. El porcentaje promedio de adultos eclosionados por pareja híbrida fue de 68%, mientras que las parejas puras obtuvieron un promedio de 65%.
- El porcentaje de huevos que logran terminar su fase de crecimiento hasta convertirse en adultos es muy similar entre sí; en parejas híbridas fue de 19% mientras que en parejas puras fue de 18%. Ninguna pareja de biotipos muestra diferencia significativa entre el tiempo de desarrollo de huevo a adulto.

5. RECOMENDACIONES

- Para el estudio de diferencias entre progenie, solo se contó con la disponibilidad de 3 parejas por cada posible combinación de biotipo $Nep_{\text{♀}} + Chin_{\text{♂}}$, $Nep_{\text{♂}} + Chin_{\text{♀}}$, $Nep_{\text{♀♂}}$ o $Chin_{\text{♀♂}}$. Para descartar la posibilidad de que la falta de diferencias significativas sea por error de muestreo, se recomienda ampliar el estudio con un número mayor de parejas.
- Los resultados de este estudio se basan en experimentación y monitoreo de los insectos bajo condiciones de laboratorio. Se recomienda repetir el estudio en campo adecuándolo a las condiciones climáticas reales de Florida, utilizando jaulas de tela con los insectos y maceteros con las plantas, en diversas zonas de la península.
- Este estudio puede ampliarse analizando la influencia de varios parámetros no incluidos en los experimentos tanto de selección de pareja como de número de progenie. Estos parámetros serían: la edad de los individuos, la influencia de la temperatura ambiental, humedad relativa y cantidad de luz, y como estos determinan el número de huevos, larvas y adultos de *Lilioceris cheni*.

6. LITERATURA CITADA

- Alexander R. D., Marshall D. C., Cooley J. R. (1996). Evolutionary perspectives on insect mating. Pp. 4-31, En: Choe, J. C., Crespi, B. J, eds. *The Evolution of Mating Systems in Insects and Arachnids*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Center, T. D., Overholt, W. A., Rohrig, E. y Rayamajhi, M. (2012). Classical Biological Control of Air Potato in Florida. Universidad de Florida, Instituto de Alimentos y Ciencias Agrícolas. Documento ENY-864. Disponible en <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN95700.pdf>
- Center, T. D. y Overholt, W. A. (2013). Air Potato Leaf Beetle (Suggested Common Name), *Lilioceris cheni* Gressitt and Kimoto (Insecta: Coleoptera: Chrysomelidae: Criocerinae). Universidad de Florida, Instituto de Alimentos y Ciencias Agrícolas. ENY 854. Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/in/in97200.pdf>
- Center, T.D., Rayamajhi M., Dray F. A., Madeira P. M., Witkus G., Rohrig E., Mattison E., Lake E., Smith M., Zhang J., Purcell M., Konstantinov A. y Schmitz D. (2013). Host range validation, molecular identification and release and establishment of a Chinese biotype of the Asian leaf beetle *Lilioceris cheni* (Coleoptera: Chrysomelidae: Criocerinae) for control of *Dioscorea bulbifera* L. in the southern United States. *Biocontrol Science and Technology* 23: 735-755. Recuperado en línea en: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/09583157.2013.790931>
- Consejo de Plantas Exóticas y Pestes de Florida (2015). Lista de las especies de plantas invasoras. Disponible en <http://fleppc.org/list/>
- Hammer, R. L. (1998). Diagnosis: *Dioscorea*. *Wildland weeds* 2 (1), 8-10.
- Jolivet, P. y Petitpierre E. (1981). Biology of Chrysomelidae (Coleoptera). Bulletin of the Catalan Institution of Natural History. 47 (Sec. Zool., 4): 105- 138. Genetic Department. Sciences College. Balear University. Mallorca, Spain.
- Kaufman, S. R. y Kaufman, W. (2012). *Invasive Plants: Guide to Identification and the Impacts and Control of Common North American Species* (Second ed.). Stackpole Books. Mechanisburg, Pennsylvania, United States.
- Langeland, K. A. (2008). *Identification and biology of nonnative plants in Florida's natural areas*. IFAS Communication Services, University of Florida.

- Omondi, B. A., Sseruwagi, P., Obeng-Ofori, D., Danquah, E. Y. y Kyerematen, R. A. (2005). Mating interactions between okra and cassava biotypes of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) on eggplant. *International Journal of Tropical Insect Science*, 25 (03), 159-167.
- Overholt, W. A., Pemberton R.W., Markle L., Taylor J., Meisenburg M., King M., Schmitz D., Raz L., Wheeler G. y Parks G.R. (2014). Plan de manejo de la Papa aérea (*Dioscorea bulbifera*): Recomendaciones del control de la papa aérea. Florida, control de plantas invasivas exóticas. Recuperado el 27 de octubre del 2015. Recuperado en: http://www.fleppc.org/Manage_Plans/AirpotatoManagementPlan_Final.pdf
- Overholt, W. A., Rayamajhi, M., Rohrig, E., Hight, S., Dray, F. A., Lake, E. y Poffenberger, R. (2016). Release and distribution of *Lilioceris cheni* (Coleoptera: Chrysomelidae), a biological control agent of air potato (*Dioscorea bulbifera*: Dioscoreaceae), in Florida. *Biocontrol Science and Technology* 1, 1-30.
- Pemberton, R. W., y Witkus, G. L. (2010). Laboratory host range testing of *Lilioceris* sp. near *impressa* (Coleoptera: Chrysomelidae)—a potential biological control agent of air potato, *Dioscorea bulbifera* (Dioscoreaceae). *Biocontrol Science and Technology*, 20 (6), 567-587.
- Spencer, J. L., Hibbard, B. E., Moeser, J. y Onstad, D. W. (2009). Behaviour and ecology of the western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *Agricultural and Forest Entomology* 11 (1), 9-27.
- Lake, E. C., Smith, M. C., Dray, F. A. y Pratt, P. D. (2015). Ecological host-range of *Lilioceris cheni* (Coleoptera: Chrysomelidae), a biological control agent of *Dioscorea bulbifera*. *Biological Control* 85, 18-24.
- Rayamajhi, M., Rohrig, E., Center, T., Lake, E., Smith, M., Manrique, V. y Overholt, W. (2015). Biological Control for Air Potato Has Arrived!. Recuperado el 26 de octubre del 2016. Recuperado de: <http://bcrc1.ifas.ufl.edu/airpotatofiles/PDF/2014%20Biological%20control%20for%20air%20potato%20has%20arrived.pdf>

7. ANEXOS

Anexo 1. Parejas formadas y resultados de las disecciones durante el experimento de selección entre biotipo.

Repetición 2							
Fecha: 25/2/2016				Resultados de disección R2			
Pareja	Hembra	Macho	Observaciones	Hembra		Macho	
				No.	Biotipo	No.	Biotipo
1	Nepalés	Chino	Macho extremadamente agresivo pre y durante el apareamiento. La hembra fue mordida varias veces en el cuello, cabeza, piernas y antenas.				
2	Nepalés	Nepalés		1	Chino	1	Nepalés
3	Nepalés	Nepalés		2	Chino		
4	Chino	Nepalés		3	Chino		
5	Nepalés	Nepalés		4	Chino		
6	Nepalés	Nepalés	Hembra muerta el 26/2	5	Chino		
7	Chino	Chino		6	Nepalés		
				7	Nepalés		

Repetición 3

Fecha: 4/3/2016				Resultados de disección R3			
Pareja	Hembra	Macho	Observaciones	Hembra		Macho	
				No.	Biotipo	No.	Biotipo
1	Nepalés	Nepalés		1	Chino	1	Chino
2	Chino	Chino		2	Chino	2	Nepalés
3	Nepalés	Nepalés		3	Chino		
4	Chino	Nepalés		4	Chino		
5	Chino	Chino	No se cuenta en el análisis por no concretarse el apareamiento	5	Nepalés		
6	Nepalés	Nepalés	No se cuenta en el análisis por no concretarse el apareamiento	6	Nepalés		
				7	Nepalés		
				8	Nepalés		

Repetición 4

Fecha: 4/3/2016				Resultados de disección R4			
Pareja	Hembra	Macho	Observaciones	Hembra		Macho	
				No.	Biotipo	No.	Biotipo
1	Nepalés	Nepalés	Otro macho nepalés trató de aparearse al mismo tiempo con la hembra				
2	Nepalés	Chino		1	Chino		
3	Nepalés	Chino		2	Chino		
4	Chino	Nepalés		3	Chino		
5	Nepalés	Chino		4	Chino		
6	Chino	Chino	Otro macho chino trató de aparearse al mismo tiempo con la hembra	5	Nepalés		
				6	Nepalés		
				7	Nepalés		
				8	Nepalés		
				9	Nepalés		

Repetición 5							
Fecha: 10/3/2016				Resultados de disección R5			
Pareja	Hembra	Macho	Observaciones	Hembra		Macho	
1	Nepalés	Chino	Otro macho nepalés trató de aparearse al mismo tiempo con la hembra	No.	Biotipo	No.	Biotipo
2	Chino	Nepalés		1	Chino	1	Nepalés
3	Nepalés	Chino		2	Chino	2	Chino
4	Nepalés	Chino		3	Chino	3	Chino
5	Nepalés	Nepalés		4	Chino		
6	Chino	Nepalés		5	Chino		
7	Nepalés	Nepalés					
8	Nepalés	Nepalés					

Repetición 6							
Fecha: 16/3/2016				Resultados de disección R6			
Pareja	Hembra	Macho	Observaciones	Hembra		Macho	
1	Nepalés	Chino	Hembra no quería aparearse	No.	Biotipo	No.	Biotipo
2	Chino	Chino		1	Chino	1	Nepalés
3	Chino	Chino		2	Nepalés		
4	Chino	Nepalés		3	Nepalés		
5	Nepalés	Chino		4	Nepalés		
6	Chino	Chino		5	Nepalés		
7	Chino	Nepalés	No se cuenta en el análisis	6	Nepalés		
8	Chino	Nepalés	No se cuenta en el análisis	7	Nepalés		

Repetición 7							
Fecha : 16/3/2016				Resultados de disección R7			
Pareja	Hembra	Macho	Observaciones	Hembra		Macho	
1	Nepalés	Nepalés		No.	Biotipo	No.	Biotipo
2	Chino	Chino		1	Chino	1	Nepalés
3	Nepalés	Nepalés		2	Chino		
4	Chino	Nepalés		3	Nepalés		
5	Chino	Chino		4	Nepalés		
6	Chino	Chino		5	Nepalés		
7	Chino	Nepalés		6	Nepalés		
8	Nepalés	Nepalés		7	Chino		
9	Nepalés	Chino		8	Nepalés		
10	Nepalés	Nepalés	No se cuenta en el análisis				

Repetición 8							
Fecha : 16/3/2016				Resultados de disección R8			
Pareja	Hembra	Macho	Observaciones	Hembra		Macho	
1	Nepalés	Nepalés		No.	Biotipo	No.	Biotipo
2	Chino	Nepalés		1	Chino	1	Nepalés
3	Nepalés	Nepalés		2	Chino	2	Chino
4	Nepalés	Nepalés		3	Chino		
5	Chino	Nepalés		4	Chino		
6	Chino	Chino		5	Chino		
7	Chino	Chino		6	Nepalés		
8	Chino	Nepalés		7	Nepalés		
9	Nepalés	Chino					
10	Chino	Chino					
11	Chino	Nepalés					
12	Nepalés	Chino					
13	Chino	Nepalés					

Anexo 2. Parejas utilizadas para la toma de datos en el experimento de progeñie.

	Pareja	Hembra	Macho	Observaciones
Rep. 2	1	Nepalés	Chino	Utilizada en la toma de datos
	2	Nepalés	Nepalés	Utilizada en la toma de datos
	3	Chino	Chino	
	4	Chino	Nepalés	
	5	Nepalés	Nepalés	Utilizada en la toma de datos
	6	Nepalés	Nepalés	Muerte de la hembra
	7	Chino	Chino	
Rep. 3	1	Nepalés	Nepalés	Hembra no fecundada
	2	Chino	Chino	Utilizada en la toma de datos
	3	Nepalés	Nepalés	Hembra no fecundada
	4	Chino	Nepalés	No ovopositó
Rep. 4	A	Nepalés	Nepalés	Utilizada en la toma de datos
	B	Nepalés	Chino	Muerte de la hembra
	C	Nepalés	Chino	Utilizada en la toma de datos
	D	Chino	Nepalés	Hembra no fecundada
	E	Chino	Nepalés	Utilizada en la toma de datos
	F	Chino	Chino	Utilizada en la toma de datos
Rep. 5	1	Nepalés	Chino	Muerte de la hembra
	2	Chino	Nepalés	Hembra no fecundada
	3	Nepalés	Chino	
	4	Nepalés	Chino	Muerte de la hembra
	5	Nepalés	Nepalés	
	6	Chino	Nepalés	Utilizada en la toma de datos
	7	Nepalés	Nepalés	
	8	Nepalés	Nepalés	Muerte de la hembra
Rep. 6	1	Nepalés	Chino	Utilizada en la toma de datos
	2	Nepalés	Chino	Muerte de la hembra
	3	Chino	Chino	Utilizada en la toma de datos
	4	Chino	Nepalés	Utilizada en la toma de datos