

**Ecología de la hibernación de *Lilioceris cheni*
Gressitt y Kimoto (Coleoptera: Chrysomelidae), un
agente de control biológico para la patata aérea
(*Dioscorea bulbifera* L.) en Florida, Estados Unidos**

Luis Jonathan Clavijo Herrera

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2015

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Ecología de la hibernación de *Lilioceris cheni*
Gressitt y Kimoto (Coleoptera: Chrysomelidae), un
agente de control biológico para la patata aérea
(*Dioscorea bulbifera* L.) en Florida, Estados Unidos**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por:

Luis Jonathan Clavijo Herrera

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2015

**Ecología de la hibernación de *Lilioceris cheni*
Gressitt y Kimoto (Coleoptera: Chrysomelidae), un
agente de control biológico para la patata aérea
(*Dioscorea bulbifera* L.) en Florida, Estados Unidos**

Presentado por:

Luis Jonathan Clavijo Herrera

Aprobado por:

Abelino Pitty, Ph.D.
Asesor principal

John Jairo Hincapié, Ph.D.
Director
Departamento de Ciencia y
Producción Agropecuaria

William A. Overholt, Ph.D.
Asesor

Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Rodrigo Diaz, Ph.D.
Asesor

Ecología de la hibernación de *Lilioceris cheni* Gressitt y Kimoto (Coleoptera: Chrysomelidae), un agente de control biológico para la patata aérea (*Dioscorea bulbifera* L.) en Florida, Estados Unidos.

Luis Jonathan Clavijo Herrera

Resumen. Florida es altamente susceptible a plantas invasivas, las cuales han colonizado gran parte de su territorio. *Dioscorea bulbifera* L., llamada patata aérea, desplaza la vegetación nativa y su control químico o mecánico resulta caro, por lo que el control biológico es una alternativa, amigable con el ambiente. El insecto herbívoro y altamente específico *Lilioceris cheni* Gressitt y Kimoto (Coleoptera: Chrysomelidae) fue introducido en Estados Unidos el año 2012, como controlador biológico para patata aérea. Esta pierde sus hojas en el invierno y el insecto, para sobrevivir esa etapa del año, debe atravesar un proceso de hibernación conocido como diapausa. Comprender este mecanismo de supervivencia es fundamental para determinar si el controlador podrá establecerse exitosamente en Florida. Anteriormente, se determinó que a 20°C y 10 horas de luz diaria se induce diapausa en *L. cheni*, por lo que se estudiaron las condiciones que permiten romper dicho estado. El estudio fue conducido en dos biotipos del insecto, y se encontró que responden a fotoperiodo de maneras diferentes. La duración crítica del día para salir de diapausa a 22.5°C no pudo determinarse con precisión por la dificultad para reconocer el estado fisiológico inicial, lo que se atribuye al método utilizado para inducir diapausa. No se encontraron diferencias en tolerancia al frío entre biotipos o estados fisiológicos, en pruebas completadas a 5°, 0° y -5°C durante 0.5, 1, 2, 4 y 8 horas. El área de distribución potencial del insecto llega al condado de Hamilton (30°N de latitud) en Florida.

Palabras clave: Biotipo, diapausa, modelado de nicho climático, planta invasiva, tolerancia al frío.

Abstract. Florida is highly susceptible to invasive plants, which have colonized much of its territory. *Dioscorea bulbifera* L., called air potato, displaces native vegetation and its chemical or mechanical control is expensive. Thus, biological control is an alternative, environmentally friendly. The herbivorous and highly specific insect *Lilioceris cheni* Gressitt and Kimoto (Coleoptera: Chrysomelidae) was introduced in the United States in 2012, as biological control agent for air potato. The plant loses its leaves during the winter and the insect, to survive this part of the year, must go through an overwintering process known as diapause. Understanding this mechanism of survival is essential to determine if the insect will successfully establish in Florida. Previously, it was determined that at 20°C and 10 hours of daily light diapause is induced in *L. cheni*, so we studied the conditions that allow break that status. The study was conducted in two biotypes of the insect, and it was found that they have different responses to photoperiod. The critical day length to get out of diapause at 22.5°C could not be accurately determined because of the difficulty to recognize the initial physiological status, which is attributed to the method used to induce diapause. No differences in cold tolerance between biotypes or physiological statuses were found in experiments completed at 5°, 0° and -5°C during 0.5, 1, 2, 4 and 8 hours. The potential distribution area of the insect reaches Hamilton County (30°N latitude) on Florida.

Key words: Biotype, climate niche modeling, cold tolerance, diapause, invasive plant.

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.....	6
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
4. CONCLUSIONES.....	24
5. RECOMENDACIONES.....	25
6. LITERATURA CITADA	26
7. ANEXOS.....	29

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Significancia de X^2 de Wald para diferentes condiciones de temperatura sobre <i>Lilioceris cheni</i> . Fort Pierce, Florida, Estados Unidos.....	18
2. Tiempos letales significativos y límites fiduciales de tolerancia al frío para <i>Lilioceris cheni</i> . Fort Pierce, Florida, Estados Unidos.....	18
Figuras	Página
1. Patata aérea en instalación de cuarentena, BCRCL, Fort Pierce, Florida, Estados Unidos.	1
2. Infestación de patata aérea en el Campo de Boy Scouts en Fort Pierce, Florida, Estados Unidos.	2
3. (A) Adulto de <i>Lilioceris cheni</i> del biotipo chino (Beth Curry) y (B) adulto del biotipo nepalés. Instalaciones de Cuarentena de la Universidad de Florida, en Fort Pierce, Estados Unidos.	3
4. (A) Huevos, (B) larvas (Beth Curry), y (C) pupa de <i>Lilioceris cheni</i> cubierta de partículas de suelo (William A. Overholt). Instalaciones de Cuarentena de la Universidad de Florida, en Fort Pierce, Estados Unidos.....	4
5. Adulto de <i>Lilioceris cheni</i> en condición de (A) diapausa y (B) no diapausa (reproductivo) (William A. Overholt). Instalaciones de Cuarentena de la Universidad de Florida, en Fort Pierce, Estados Unidos.....	8
6. (A) Ovarios (William A. Overholt) y (B) edeago de adulto de <i>Lilioceris cheni</i> . Instalaciones de Cuarentena de la Universidad de Florida, en Fort Pierce, Estados Unidos.....	9
7. Biotipo chino de <i>Lilioceris cheni</i> . Masas de huevo/Hembra puesto por semana a lo largo de siete semanas bajo diferentes fotoperiodos. Fort Pierce, Florida, Estados Unidos.....	11
8. Biotipo chino de <i>Lilioceris cheni</i> . Promedio de Masas de huevo/Hembra bajo diferentes fotoperiodos. Letras diferentes muestran diferencias significativas ($P < 0.05$). Fort Pierce, Florida, Estados Unidos.....	12
9. Estado fisiológico interno de <i>Lilioceris cheni</i> después de la terminación de la diapausa. Las características observadas son difíciles de relacionar con un estado de diapausa o no diapausa. Fort Pierce, Florida, Estados Unidos.....	13

10. Biotipo chino de <i>Lilioceris cheni</i> . Predicción de la duración crítica del día (DL ₅₀) (Wald X ² = 14.68, P < 0.05) a la cual 50% de la población sale de diapausa. Límites fiduciales al 95%: 12.30 – 14.52 horas. Fort Pierce, Florida, Estados Unidos.....	14
11. Biotipo nepalés de <i>Lilioceris cheni</i> . Masas de huevo/Hembra puesto por semana a lo largo de siete semanas bajo diferentes fotoperiodos. Fort Pierce, Florida, Estados Unidos.....	14
12. Biotipo nepalés de <i>Lilioceris cheni</i> . Promedio de Masas de huevo/Hembra bajo diferentes fotoperiodos. Letras diferentes muestran diferencias significativas (P < 0.05). Fort Pierce, Florida, Estados Unidos.....	15
13. Biotipo nepalés de <i>Lilioceris cheni</i> . Predicción de la duración crítica del día (DL ₅₀) (Wald X ² = 5.28, P < 0.05) a la cual 50% de la población sale de diapausa. Límites fiduciales al 95%: 13.95 – 43.17 horas. Fort Pierce, Florida, Estados Unidos	16
14. <i>Lilioceris cheni</i> . Analisis de varianza de masas de huevos puestos por hembra entre ambos biotipos, chino y nepalés, bajo los diferentes fotoperiodos (P < 0.05) probados en el experimento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre biotipos. Fort Pierce, Florida, Estados Unidos	17
15. Mortalidad (%) a -5°C durante diferentes tiempos de exposición de insectos en estado de diapausa y no diapausa del biotipo (A) chino y (B) nepalés. Diferencias significativas entre estados no fueron encontradas (P < 0.05). Fort Pierce, Florida, Estados Unidos.....	19
16. Mortalidad (%) de las poblaciones china y nepalés a -5°C durante cinco periodos de exposición en condición de (A) diapausa y (B) reproductiva. Diferencias significativas entre estados no fueron encontradas (P < 0.05), excepto en los insectos reproductivos expuestos a 1 hora de luz. Fort Pierce, Florida, Estados Unidos	20
17. Zonas de Asia donde especímenes de <i>Lilioceris cheni</i> fueron colectados. La provincia Yunnan de China y el valle de Katmandú de Nepal. Las áreas blancas indican los puntos exactos.	21
18. Mapa de distribución potencial del biotipo chino de <i>Lilioceris cheni</i> en los Estados Unidos. Colores cálidos indican una alta probabilidad de ser un lugar potencial de establecimiento.....	22
19. Mapa de distribución potencial del biotipo nepalés de <i>Lilioceris cheni</i> en los Estados Unidos. Colores cálidos indican una alta probabilidad de ser un lugar potencial de establecimiento.....	22
20. Mapa de distribución de <i>Dioscorea bulbifera</i> L. en los Estados Unidos. Fuente: EDDMaps.	23

Anexos

Página

1. Variables climáticas usadas por el software MaxEnt.....	29
--	----

1. INTRODUCCIÓN

Florida tiene más de 500 especies de animales exóticos (Comisión de Pesca y Conservación de Vida Silvestre de Florida 2015) y desde la época de Cristóbal Colón se han establecido más de 1.300 especies de plantas exóticas (Weislo 2015). Florida está rodeada de agua por tres lados, lo que la convierte básicamente en una isla subtropical altamente susceptible al establecimiento de organismos exóticos (Cuda y Frank 2013). Varias de las plantas exóticas se han convertido en invasoras, no sólo en Florida sino en todo el sureste de Estados Unidos. Las plantas invasoras compiten con la vegetación nativa, y con frecuencia tienen una ventaja debido a la ausencia de factores de control natural como enfermedades o insectos herbívoros.

Una de las plantas invasoras más importantes es la patata aérea, *Dioscorea bulbifera* L., también llamada camote amargo (Kaufman y Kaufman 2012) (Figura 1). Esta enredadera herbácea, trezada y perenne es originaria de Asia y crece 20 m o más de longitud. Cubre el dosel de los árboles y arbustos, bloqueando la luz del sol, sofocando la vegetación debajo de ella y desplazando a las comunidades de plantas nativas (Center y Overholt 2013, Kaufman y Kaufman 2012).



Figura 1. Patata aérea en instalación de cuarentena, BCRCL, Fort Pierce, Florida, Estados Unidos.

Rara vez florece en Florida y debe su nombre a tubérculos aéreos similares a patatas que crecen en las axilas de las hojas. La patata del aérea se propaga principalmente a través de la dispersión humana de los bulbillos (Center y Overholt 2012, Center *et al.* 2013). El follaje y las enredaderas mueren durante el invierno, con nuevas enredaderas que brotan de bulbillos y tubérculos subterráneos en la primavera. Esta planta es originaria de África y Asia, pero estudios genéticos *indican* que la pata aérea de la Florida es más similar a la de China (Croxtton *et al.* 2010). Se expande por los bordes de los bosques, bordes de humedales y áreas alteradas en la Costa del Golfo (Florida, Luisiana, Mississippi, Alabama y Texas), Hawái y Puerto Rico. Los modelos climáticos sugieren que la patata aérea podría extenderse tan al norte como Carolina del Sur (Overholt *et al.* 2014).



Figura 2. Infestación de patata aérea en el Campo de Boy Scouts en Fort Pierce, Florida, Estados Unidos.

El control de la patata aérea generalmente se basa en herbicidas, como el glifosato o triclopir. Un esfuerzo de control en el Parque Nacional de los Everglades en 2000 requirió una inversión de \$ 30.000 y 1200 horas de trabajo (Overholt *et al.* 2014). Los tratamientos deben ser repetidos con frecuencia, sin mencionar el posible daño colateral que puede afectar a las especies de plantas nativas debido a los esfuerzos de control. El control mecánico por recolección manual de los bulbillos es otra táctica, que tiene que hacerse cuidadosamente, porque si no se eliminan todos los bulbillos, el área puede rápidamente ser recolonizada (Overholt *et al.* 2014). Debido al alto costo y la mano de obra involucrada en el control químico y mecánico, se hicieron esfuerzos para encontrar una solución a largo plazo usando control biológico.

Afortunadamente, un potencial agente de control biológico, *Lilioceris cheni* Gressitt y Kimoto (Coleoptera: Chrysomelidae), fue descubierto alimentándose de hojas de patata aérea en su zona de distribución natural en Asia, que incluye a Nepal, Bangladesh, India, Malasia, Birmania, Sri Lanka y China . En 2002, una población del escarabajo fue encontrado en el valle de Katmandú de Nepal (Pemberton y Witkus 2010). Pruebas intensivas de gama de huéspedes demostraron que se trataba de un alimentador especialista de la patata aérea (Pemberton y Witkus 2010), y finalmente fue aprobado para liberarse en los Estados Unidos (Center *et al.* 2013). Más tarde, en mayo de 2011, una población diferente de la misma especie fue encontrada en la provincia china de Yunnan. Estas dos poblaciones podrían diferir en sus rangos de huéspedes, así que se llevaron a cabo pruebas adicionales en la población china, la cual confirmó ser monófaga en patata aérea (Pemberton y Witkus 2010). La población china fue lanzada por primera vez en los Estados Unidos en la península de Florida, en 2012 (Center *et al.* 2013).

Los adultos de *L. cheni* miden cerca de 9 mm de largo y 4 mm de ancho (Figura 3). Los élitros del biotipo chino son rojos y los nepalés son marrones, pero la cabeza, tórax, abdomen y patas de ambos biotipos son negros. El ciclo de vida es completado en aproximadamente 24-28 días (Center and Overholt 2013).

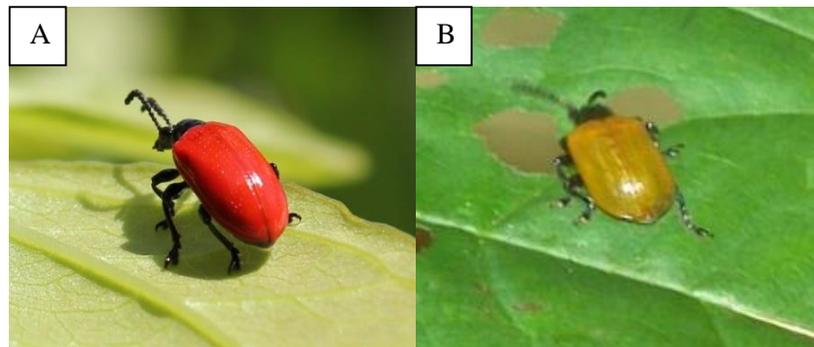


Figura 3. (A) Adulto de *Lilioceris cheni* del biotipo chino (Beth Curry) y (B) adulto del biotipo nepalés. Instalaciones de Cuarentena de la Universidad de Florida, en Fort Pierce, Estados Unidos.

Los huevos son de color blanco y alargado y de alrededor de 1 mm de longitud; las hembras pueden depositar un promedio de 1200 durante su vida (Center *et al.* 2013). Aunque las hembras pueden poner huevos en las hojas viejas, prefieren la parte de abajo de las hojas jóvenes, dejando racimos de huevos agregados en la superficie. Center *et al.* 2013 indican que la hembra aparentemente pellizca el tejido de la hoja provocando que los bordes se enrosquen dando una forma de copa, que parcialmente envuelve los racimos de huevos, posiblemente modificando el microambiente. Los huevos se vuelven amarillentos cuando están cerca de la eclosión, por lo general después de 4 días (Center y Overholt 2012).

Las larvas tienen cuatro estadios y pasan 2 días en cada uno, haciendo un total de 8 días en esta etapa (Center y Overholt 2012). Las nuevas larvas son amarillentas pero progresivamente cambian a un color rojizo (biotipo chino) o color parduzco (biotipo nepalés). Las larvas exudan una secreción pegajosa y la materia fecal se adhiere a esta sustancia, posiblemente funcionando como un elemento de disuasión a los depredadores (Center *et al.* 2013). Cuando las larvas están maduras, entran en el suelo y producen una secreción oral blanquecina que se endurece en un capullo espumoso de 7 mm de longitud (Figura 4) (Center y Overholt 2012, Center y Overholt 2013). Esta etapa dura 12-16 días, después de la cual los adultos emergen. Los adultos alcanzan la madurez sexual después de 10 días, y 5 días más tarde las hembras comienzan a poner huevos (Center *et al.* 2013).

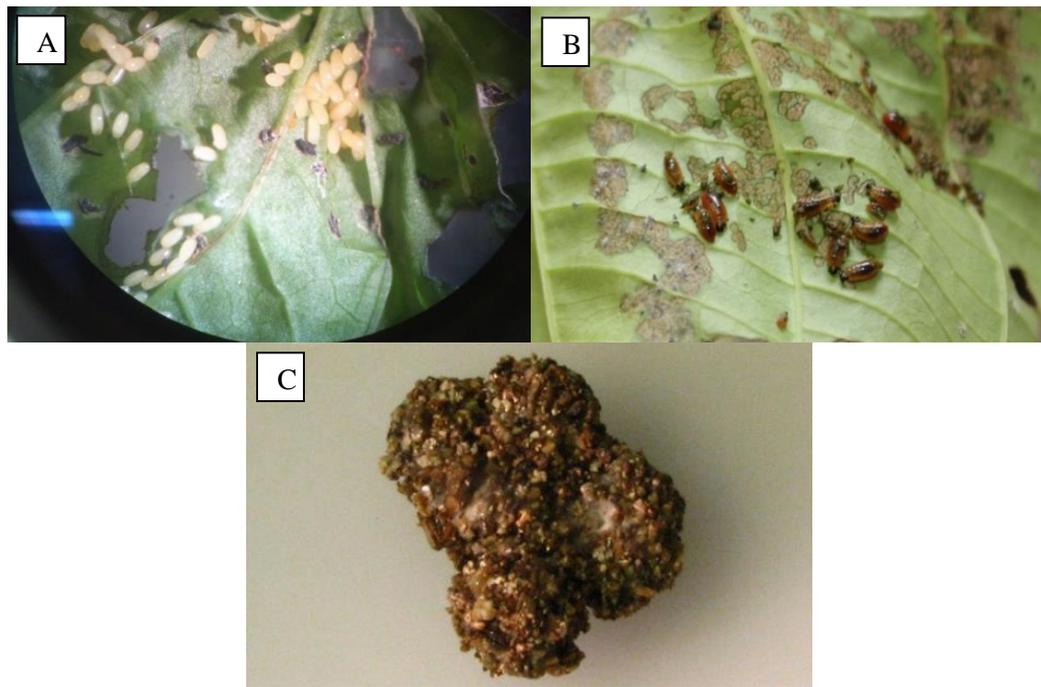


Figura 4. (A) Huevos, (B) larvas (Beth Curry), y (C) pupa de *Lilioceris cheni* cubierta de partículas de suelo (William A. Overholt). Instalaciones de Cuarentena de la Universidad de Florida, en Fort Pierce, Estados Unidos.

Debido a la ausencia de la enredadera durante el invierno, el insecto entra en un estado de actividad metabólica reducida conocido como diapausa. De acuerdo con Nation (2008), la diapausa es un desarrollo alterado, conocido en muchas especies de insectos que sucede en una o varias etapas, regulada por patrones únicos de expresión génica, que se pueden observar como una ralentización o detención del desarrollo en etapas inmaduras, o la represión de la reproducción en los adultos.

Nation 2008 también menciona que diapausa es un proceso que resulta en el secuestro de reservas de nutrientes, la supresión del metabolismo, la detención o ralentización del desarrollo y el aumento de la tolerancia al estrés ambiental. Algunos estudios sobre inducción de diapausa y su terminación ya han sido completados en los biotipos chinos y nepalés de *L. cheni*¹. Sin embargo, una mayor comprensión del proceso de diapausa y la capacidad de los escarabajos de resistir el frío durante el invierno, ayudará a determinar qué biotipo es el más adecuado para su liberación en diferentes áreas de Florida y otros estados en el sureste de los Estados Unidos.

Este estudio es parte de investigaciones orientadas a entender el comportamiento de *L. cheni* bajo las condiciones climáticas de Florida. Los objetivos fueron comparar las respuestas de los biotipos chino y nepalés a diferentes fotoperiodos y determinar la duración crítica del día a 22.5°C para la terminación de diapausa en ambos biotipos, determinar el tiempo letal para 50 y 90% de las poblaciones de cada biotipo y comparar la tolerancia al frío de adultos en diapausa y no diapausa dentro de los biotipos y entre biotipos, y determinar áreas establecimiento potencial para *L. cheni* en los Estados Unidos.

1. Diaz, R., W.A. Overholt, V. Manrique, P. Tipping, M. Smith y E. Lake. Datos no publicados. Improving rearing and establishment success of the air potato leaf beetle (*Lilioceris cheni*) by closing knowledge gaps in its biology and geographic adaptation. University of Florida, IFAS.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Colonias de insectos. Los adultos de *L. cheni* del biotipo de Nepal se recibieron de una colonia conservada en un centro de investigación en Fort Lauderdale (originalmente, estos insectos se recogieron en el valle de Katmandú, Nepal). Los adultos de biotipo chino se recolectaron en mayo de 2011 en la provincia china de Yunnan, y recibidos en el Laboratorio de Investigación de Control Biológico y Contención (BCRCL) del Centro de Investigación y Educación de Río Indio (IRREC), Universidad de Florida, Fort Pierce, Florida (27°25'34.30" N, 80°24'20.31" O), donde las colonias de ambos biotipos fueron cultivados para llevar a cabo experimentos.

Para obtener poblaciones de la misma edad, huevos recién puestos fueron recolectados y trasladados a jóvenes hojas de patata aérea dentro de un recipiente de plástico transparente (31 × 23 × 10 cm) con vermiculita en la base. Las tapas de los contenedores tenían un agujero circular (r = 10 cm) sellado con malla. Cuando los huevos eclosionaron, el follaje se cambió diariamente. Después de que las larvas estaban listas para pupar, se dirigieron a la base del recipiente y usaron vermiculita para hacer sus capullos. Una vez que los adultos jóvenes comenzaron a surgir, fueron trasladados en grupos de 60-105 individuos a un nuevo recipiente de plástico transparente o cubetas blancas (h = 32 cm, r = 20 cm) con dos agujeros circulares en los lados (r = 8 cm) y uno en la tapa (r = 10 cm), cubiertas con toallas de papel húmedas en la base. Se alimentaban dos veces por semana, proporcionando cinco hojas de patata aérea por cada 15 insectos, de buena calidad y puestas en el interior de un tubo de ensayo con agua. Los adultos que emergieron en un intervalo de dos semanas se consideraron contemporáneos. El experimento se inició 10 días después de que el último insecto del grupo emergió del capullo. Durante esta etapa, los insectos se mantuvieron en una cámara controlada de medio ambiente programada a 25°C, humedad relativa 60-70% (HR), y un fotoperiodo de 14:10 (L: D) horas (condición de días largos).

Fuente de material vegetal. Se experimentó durante el invierno, y en esta época del año *Dioscorea bulbifera* desaparece. Afortunadamente, el IRREC cultiva vainas de patata aérea bajo condiciones controladas en invernadero, de donde se recogió el material vegetal para alimentar a los insectos. Además, la División de Industria Vegetal de Fort Pierce, Florida, proporcionó plantas de patata aérea, y algunas colecciones de campo se realizaron al final del invierno, cuando las enredaderas comenzaron a brotar. Se lavaron las hojas usando agua esterilizada.

Inducción a diapausa: Una vez que los insectos recién emergidos tuvieron por lo menos 10 días (madurez sexual), fueron transferidos a una nueva cámara de ambiente controlado configurada a condiciones de inducción a diapausa: 20°C, 60-70% de humedad relativa (HR), y un fotoperiodo de 10:14 (L:D) horas (condiciones de día corto) durante 35 días. Para el experimento de la tolerancia al frío, fue necesario tener individuos de ambas poblaciones en condiciones de diapausa y no diapausa (reproductivos). Estudios anteriores mostraron que a 20°C, el factor principal para determinar la entrada en diapausa es fotoperiodo (Diaz *et al.*, datos no publicados¹), por lo que un grupo de insectos fue criado en una cámara diferente fijado con condiciones de no diapausa: 20°C, humedad relativa de 60-70% (HR), y un fotoperiodo de 14:10 (L: D) horas (condiciones de día largo) durante 35 días. Mantener la misma temperatura en ambas cámaras es importante para conservar ambas poblaciones a la misma edad fisiológica. Los insectos son poiquiloterms, por lo que la temperatura conduce el ritmo de la acción enzimática para su crecimiento. Esto significa que significa que se desarrollan y envejecen lentamente con temperaturas bajas, y aceleradamente con temperaturas más cálidas (Byrd y Castner 2010).

Terminación de diapausa. Para un mejor entendimiento de la ecología de hibernación de *L. cheni*, es necesario determinar cuántas horas de luz desencadenan la terminación de la diapausa en estos insectos. Después del periodo de inducción a diapausa (20°C, 60-70% RH and 10:14 [L:D]), algunos insectos fueron disectados para evaluar el estado fisiológico inicial y, después de confirmar el estado de diapausa, fueron trasladados a cinco cámaras de ambiente controlado ajustado a 22.5°C y fotoperiodos de 10, 11, 12, 13 o 14 horas de luz. Las condiciones de luz en las incubadoras fueron revisados y estandarizadas utilizando un medidor de luz. Registradores de datos HOBO[®] fueron colocados dentro de las cámaras para controlar la temperatura. Cada cámara se utilizó para mantener cuatro contenedores de plástico transparente (h = 15 cm, r = 10 cm) con 10 insectos cada uno. Las tapas de los contenedores tenían un agujero cuadrado (4 × 4 cm) cubierto con malla, y toallas de papel húmedas en la base. Este proceso se repitió con ambos biotipos. Dos veces a la semana, los insectos fueron alimentados con hojas de patata aérea de buena calidad y se tomaron los datos sobre el número de masas de huevos y la mortalidad de insectos por contenedor. Después de que la ovoposición inició en el período de luz más largo (14:10 [L: D]), la recopilación de datos continuó durante 5 semanas. Para cada fotoperiodo, se calcularon los días necesarios para terminar la diapausa (determinada por el momento en que los insectos empezaron a poner huevos) y porcentaje de insectos en diapausa (de acuerdo a los datos obtenidos de las disecciones).

La diapausa es un estado de baja actividad metabólica neuro-hormonalmente regulado, caracterizado por diferentes cambios de comportamiento, morfológicos y fisiológicos (Tauber *et al.* 1986). Algunas de estas características permiten la evaluación del estado fisiológico (en diapausa o reproductivo) en *L. cheni* (Figura 5). Las características analizadas mediante la disección y la observación de las estructuras internas de los insectos bajo un estereoscopio (Diaz *et al.* 2011) para determinar si los insectos estaban o no en diapausa (al inicio y al final del experimento) fueron los siguientes:

1. Sexo: El dimorfismo sexual en crisomélidos no es muy aparente (Jolivet y Petitpierre 1981) y en algunas especies, como *L. cheni*, la única manera de determinar el sexo de un individuo es por la disección y observación del sistema reproductivo interno (Figura 6). Los machos presentan testículos y edeago (pene), y las hembras ovarios. Aparentemente, los machos son ligeramente más pequeños que las hembras.
2. Grasa corporal: El contenido de grasa corporal fue inspeccionado visualmente y estimad como mínimo (<10%), medio (11-60) o completo (> 60%).
3. Contenido del tubo digestivo: La cantidad de alimento en el tracto digestivo se estimó visualmente como mínima (<10%), media (11-60) o completa (> 60%).
4. Presencia o ausencia de ovocitos y huevos: Se observaron huevos inmaduros (ovocitos) y huevos casi listos para la ovoposición.



Figura 5. Adulto de *Lilioceris cheni* en condición de (A) diapausa y (B) no diapausa (reproductivo) (William A. Overholt). Instalaciones de Cuarentena de la Universidad de Florida, en Fort Pierce, Estados Unidos.

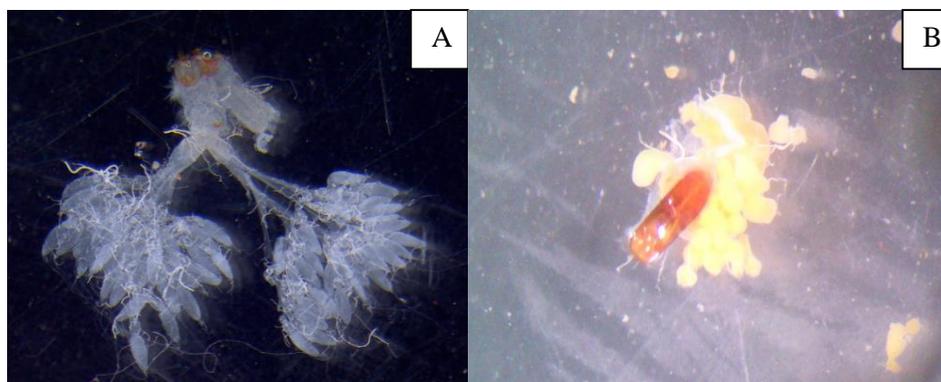


Figura 6. (A) Ovarios (William A. Overholt) y (B) edeago de adulto de *Lilioceris cheni*. Instalaciones de Cuarentena de la Universidad de Florida, en Fort Pierce, Estados Unidos.

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar, con un arreglo factorial de 2 (biotipos) \times 5 (fotoperiodos), donde las variables independientes fueron biotipo y duración del día (fotoperiodo), y la variable dependiente fue la producción de masas de huevos. Para determinar la influencia del fotoperiodo en el número de masas de huevos, se utilizó un análisis de varianza (ANDEVA) con un modelo lineal general y separación de medias por mínimos cuadrados (LSMEANS). Para comparar la ovoposición entre ambos biotipos, bajo los diferentes fotoperiodos, se utilizó un análisis de varianza (ANDEVA). La duración crítica del día, DL_{50} (fotoperiodo que induce la entrada en estado reproductivo de 50% de la población) se calculó usando un modelo logístico en JMP, una herramienta de SAS. Los datos fueron analizados utilizando el software Statistical Analysis Software SAS[®] v9.3 (Instituto SAS 2013).

Tolerancia al frío. La tolerancia a condiciones de frío se evaluó a tres temperaturas: 5°, 0° ó -5°C, durante 0.5, 1, 2, 4 u 8 horas. Los experimentos se realizaron en una máquina de baño frío (NESLAB[™], baño de temperatura constante, RTE-8). La máquina funciona enfriando agua con anticongelante a una temperatura estable, en la que los contenedores se pueden sumergir durante períodos variables de tiempo. Previo al experimento, se comprobó la capacidad de la máquina de baño de agua fría para mantener una temperatura estable, usando un registrador de datos HOBO[®] y un termómetro de bulbo, enfriando agua con anticongelante a -10°C durante 24 horas.

Los adultos fueron aclimatados a bajas temperaturas exponiéndolos gradualmente desde 15°C hasta la temperatura final, en intervalos de 5°C por día (Diaz *et al.* 2008). Se metieron cinco insectos por periodo de tiempo en un vial de vidrio (h = 6 cm, r = 1,5 cm). Los viales se sellaron con parafina, cubriendo la tapa para evitar la entrada de líquido. A continuación, los viales, y algunas piezas metálicas como lastre, se colocaron dentro de un contenedor de plástico (h = 6 cm, L = 8 cm, w = 8 cm) con agujeros en la tapa para permitir que se hundiera.

Se controló la temperatura usando un termómetro de bulbo, y el tiempo con un cronómetro. Cuando el tratamiento fue completado, los insectos se transfirieron a un contenedor de plástico transparente (h = 15 cm, r = 10 cm) con un par de hojas de patata aérea, y llevados a una incubadora a 20°C, 60-70% HR y un fotoperiodo de 14:10 (L:D) horas, donde permanecieron durante 24 horas. Después de este período, se contaron los insectos muertos y cada individuo fue disectado para evaluar su sexo y estado fisiológico, basado en la grasa corporal, el contenido del tubo digestivo y la presencia o ausencia de ovocitos y huevos. La mortalidad se determinó por el criterio de la movilidad. Los insectos vivos suelen caminar alrededor del recipiente, moviendo sus alas, patas o antenas. *L. cheni* puede exhibir tanatosis (simular estar muerto) como una respuesta natural a los depredadores. Por tanto, cuando había sospechas de un insecto muerto, se colocó al individuo sobre sus élitros y se sopló sobre él. Típicamente, los insectos vivos responden a este estímulo moviendo alas, patas y antenas. Los insectos sin movilidad fueron considerados muertos. El experimento se repitió tres veces por temperatura con insectos en diapausa y reproductivos de ambas poblaciones.

El diseño experimental fue factorial, con cuatro factores: temperatura, tiempo, población y estado (diapausa o no diapausa). La variable dependiente fue la supervivencia de adultos. Se compararon los valores de LT₅₀ and LT₉₀ (tiempo letal) entre poblaciones y estados. Los valores LT se calcularon con un procedimiento Proc Probit. Para comparar la tolerancia al frío de los estados entre biotipos y dentro de los biotipos, se calculó la mortalidad con la fórmula [mortalidad% = insectos muertos / total de los insectos] y se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANDEVA). Se completó el análisis estadístico utilizando el programa Statistical Analysis Software SAS® v9.3 (Instituto SAS 2013).

Modelado de nicho climático. El modelado de nicho climático es una herramienta que se puede utilizar para predecir la distribución potencial de un organismo en una nueva zona geográfica. Usando de las coordenadas donde ejemplares de *L. cheni* fueron recolectados, las condiciones climáticas en el área de distribución natural se caracterizaron y proyectaron a otras áreas para identificar zonas con climas similares. La modelización de nichos se utilizó para estimar las distribuciones potenciales de ambos biotipos en los Estados Unidos. Maximun Entropy Distribution (MaxEnt) (Phillips *et al.* 2015) es un software que combina estadística y geografía, el cual se utiliza para hacer predicciones de posibles zonas de distribución de especies, basadas en 19 variables bioclimáticas proporcionados por la base de datos WorldClim (www.worldclim.org) (Anexo 1). El lugar donde se recogió el biotipo chino de *L. cheni* fue al sur de la provincia de Yunnan (Center *et al.* 2013), y el biotipo de nepalés fue recogido en el valle de Katmandú².

Se prepararon mapas de distribución potencial en los Estados Unidos. La base de datos WorldClim caracteriza a las condiciones ambientales de todo el planeta, por lo que para obtener resultados más precisos, las variables bioclimáticas fueron segmentados a la zona asiática donde el insecto ha sido observado, y la zona de proyección reducida a Norteamérica con la ayuda de ArcGIS, un software de información geográfica del Environmental System Research Institute (ESRI® 2012).

2. Rayamajhi, M. 2015. *Lilioceris cheni* biotype Nepalese occurrence record. Personal communication.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Terminación de la diapausa. El inicio del proceso de diapausa y su finalización en algunos crisomélidos es estimulado por el fotoperiodo (Jolivet y Petitpierre 1981). En caso de *Lilioceris cheni*, los fotoperiodos largos estimulan la terminación de la diapausa entre 20 a 25°C (Díaz *et al.* datos no publicados¹), similar a lo que ocurre en *Diorhabda elongata*, agente de control biológico de *Tamarix* spp. (Bean *et al.* 2007). Hubo una interacción significativa ($P < 0.05$) entre el biotipo del insecto y el fotoperiodo, lo que significa que la respuesta a los cambios en las horas de luz por día es diferente para cada biotipo.

En el biotipo chino, los primeros insectos en poner huevos fueron los expuestos a un fotoperiodo de 13:10 (L: D), en el comienzo de la primer semana bajo estas condiciones (Figura 8). El segundo grupo fue aquel expuesto a 14:10 (L: D) horas, al final de la primer semana. No se observó ovoposición en los insectos expuestos a un fotoperiodo de 12:12 (L:D), pero se observaron masas de huevos en los contenedores de insectos bajo condiciones de 10:14 and 11:13 (L:D) horas.

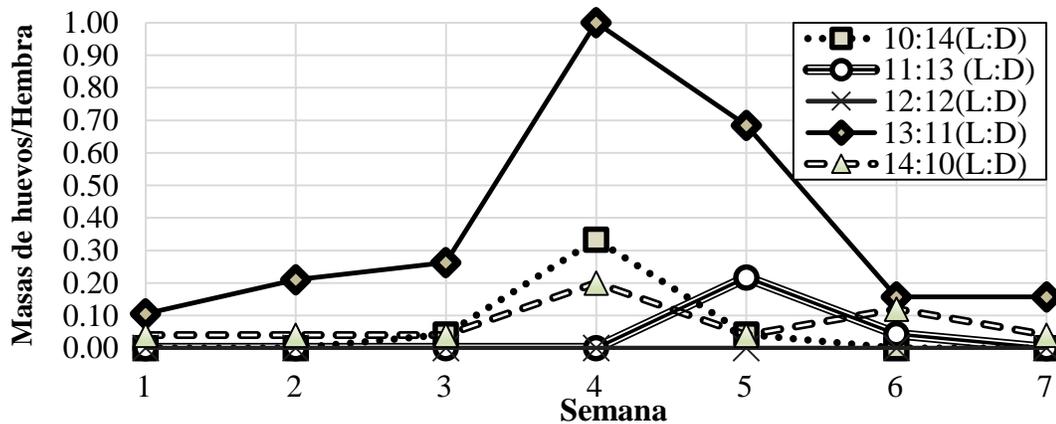


Figura 7. Biotipo chino de *Lilioceris cheni*. Masas de huevo/Hembra puesto por semana a lo largo de siete semanas bajo diferentes fotoperiodos. Fort Pierce, Florida, Estados Unidos.

La información obtenida no corresponde a la tendencia esperada, donde los insectos bajo fotoperiodos más largos debían ovopositar primero, seguidos por los insectos expuestos a menores horas de luz por día. Se esperaba que esto ocurriera porque la tasa de actividad metabólica es más alta en los insectos expuestos a fotoperiodos que están más alejados de aquel que mantiene las condiciones de diapausa (Tauber and Tauber 1976). Del mismo modo, era esperado que los insectos bajo el fotoperiodo de 14:10 (L:D) generaran la cantidad más alta de huevos por hembra, pero esto fue mostrado por los insectos bajo el fotoperiodo de 13:11 (L:D) (Figura 9).

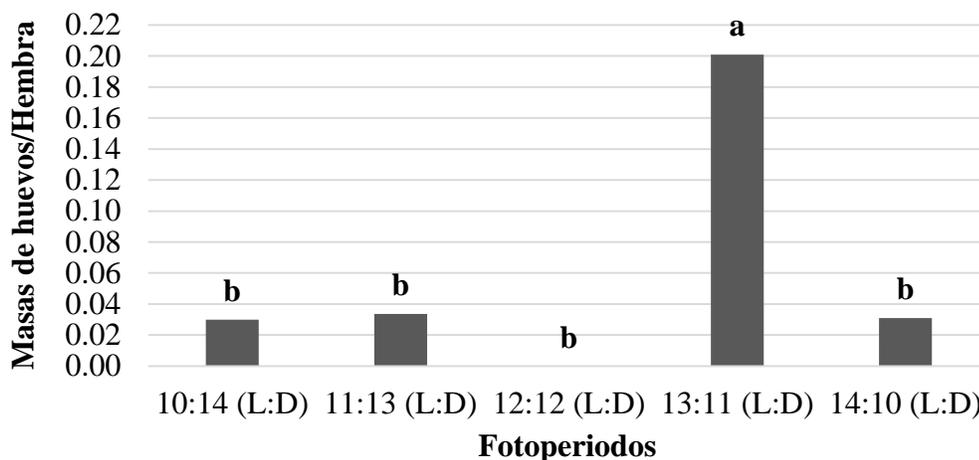


Figura 8. Biotipo chino de *Lilioceris cheni*. Promedio de Masas de huevo/Hembra bajo diferentes fotoperiodos. Letras diferentes muestran diferencias significativas ($P < 0.05$). Fort Pierce, Florida, Estados Unidos.

Este desorden en ovoposición esta probablemente asociado al método utilizado para inducir la diapausa en los insectos. En el estudio dirigido por Diaz *et al.* (datos no publicados¹), el tiempo necesario para inducir la diapausa fue de 40 días. Después de un análisis de esos resultados, y por razones logísticas, se decidió reducir este periodo a 35 días, pero aparentemente esta reducción pudo haber resultado en que no todos los insectos entraron en diapausa. Esto es corroborado por la dificultad en clasificar a los insectos en diapausa o reproductivo a través de las disecciones completadas al final del experimento (Figure 9). Las características fisiológicas internas de los insectos en diapausa y reproductivos no siempre fueron claro. Otro factor que pudo haber afectado el estado de los insectos es su edad, debido a que hubo diferencia de dos semanas entre el insecto más joven y el de mayor edad.

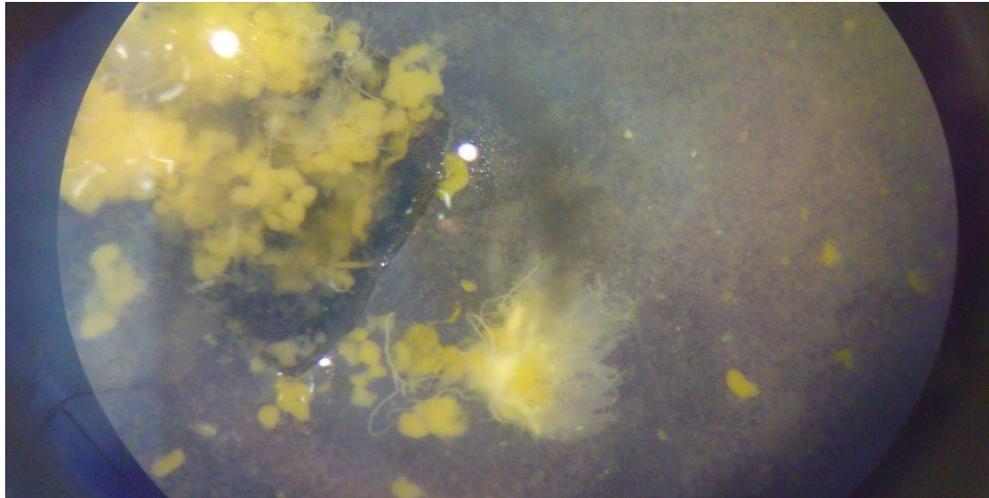


Figura 9. Estado fisiológico interno de *Lilioceris cheni* después de la terminación de la diapausa. Las características observadas son difíciles de relacionar con un estado de diapausa o no diapausa. Fort Pierce, Florida, Estados Unidos.

La luz de las cámaras fue estandarizada al comenzar el experimento. No obstante, las condiciones de luz pudieron haber cambiado en los incubadoras durante el experimento y *L. cheni* podría ser sensible a la intensidad de luz. Es importante notar que la diapausa está relacionada a muchos factores como el fotoperiodo, la temperatura, sequia, desecación, calidad del alimento, duración crítico del día, tamaño de la población y edad materna al momento de la ovoposición, entre otros (Nation 2008). Inconsistencias en resultados asociados a la diapausa han sido observados en estudios similares, como en la investigación sobre *Orius majusculus* por Ünal y Tunç (2012).

La duración crítica del día (DL_{50}), a la cual 50% de la población rompe la diapausa, fue calculado utilizando un modelo logístico que permite predecir la variable dependiente entre dos posibilidades, en respuesta al efecto de las variables independientes (JMP s.f.). En este caso, los factores independientes son biotipo y fotoperiodo, y las dos posibilidades para la variable dependiente (estado) son condición de diapausa o condición reproductiva, lo que se determinó con base en los resultados de las disecciones. El DL_{50} calculado para el biotipo chino fue de 13.04 horas (Figura 10), duración del día que ocurre en Florida central en la cuarta semana de abril, al comienzo de primavera (Time and Date 2015), lo que coincide con la el aumento de actividad metabólica sucedido cuando los insectos comienzan a alimentarse y aparearse en primavera (Nation 2008). Los límites fiduciales al 95% (límites de confianza) fueron 12.30 - 14.52 horas ($P < 0.05$), lo que es ligeramente amplio probablemente por las razones anteriormente mencionadas.

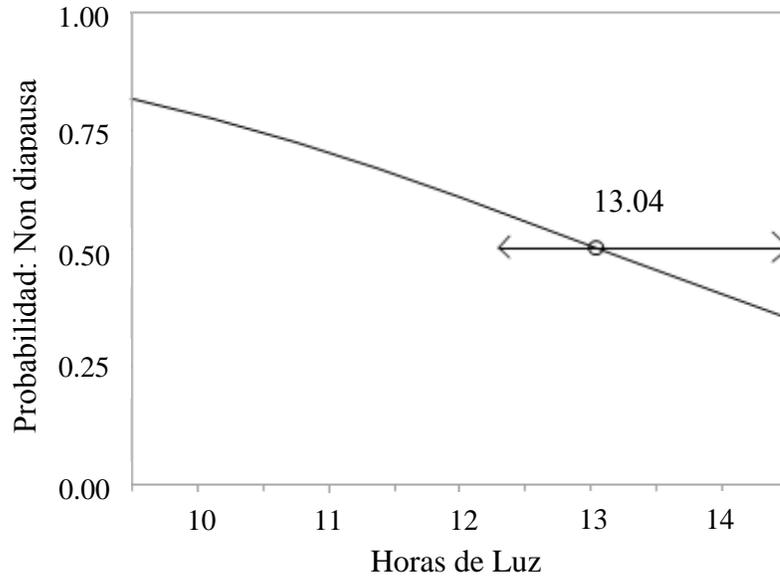


Figura 10. Biotipo chino de *Lilioceris cheni*. Predicción de la duración crítica del día (DL_{50}) (Wald $X^2 = 14.68$, $P < 0.05$) a la cual 50% de la población sale de diapausa. Límites fiduciales al 95%: 12.30 – 14.52 horas. Fort Pierce, Florida, Estados Unidos.

La interacción significativa entre biotipo y fotoperiodo indica que los dos biotipos respondieron de manera distinta a los cambios en fotoperiodo. En el caso del biotipo nepalés, el método usado para inducir la diapausa parece haber funcionado. Aparentemente, los insectos del biotipo nepalés necesitaron menos tiempo que los chinos para entrar en diapausa. La falta de producción de huevos, que ocurrió bajo fotoperiodos de 10:14, 11:13, 12:12 and 13:11 (L:D) (Figura 11), es un indicador de diapausa en los insectos (Nation 2008), lo que también se observa en otro crisomélido, *Gratiana boliviana*, cuando se encuentra en este estado (Diaz *et al.* 2011).

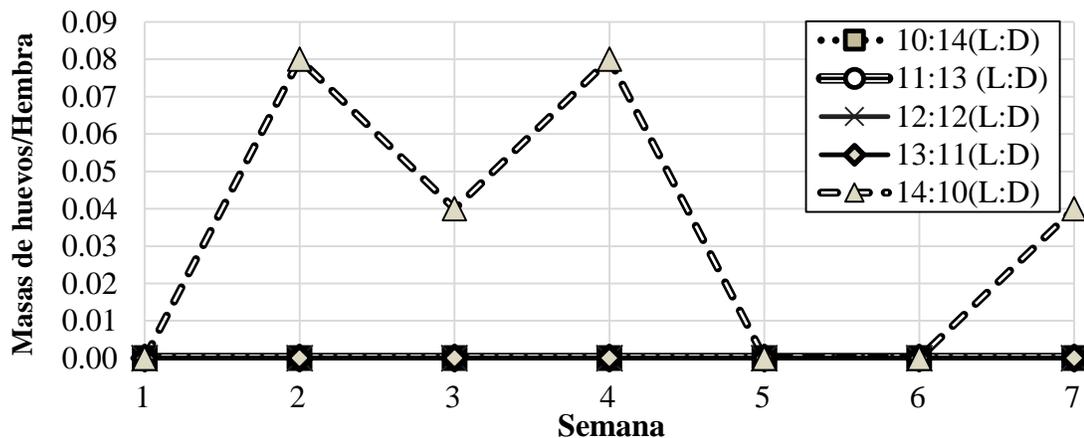


Figura 11. Biotipo nepalés de *Lilioceris cheni*. Masas de huevo/Hembra puesto por semana a lo largo de siete semanas bajo diferentes fotoperiodos. Fort Pierce, Florida, Estados Unidos.

Los insectos bajo un fotoperiodo de 14:10 (L:D) ovopositaron en la segunda semana, y mantuvieron actividad reproductiva a lo largo del experimento. El comportamiento de la población nepalés se ajusta mejor a los resultados esperados de acuerdo con Tauber y Tauber (1976). Se registró una ovoposición significativamente mayor en el fotoperiodo más largo, pero no hubo diferencia entre los otros fotoperiodos (Figura 12). Es importante decir que la ovoposición solo se presentó en uno de los cuatro contenedores expuestos al fotoperiodo de 14:10 (L:D), sugiriendo que probablemente los insectos de Nepal necesitan más tiempo expuestos a fotoperiodos largos para romper la diapausa.

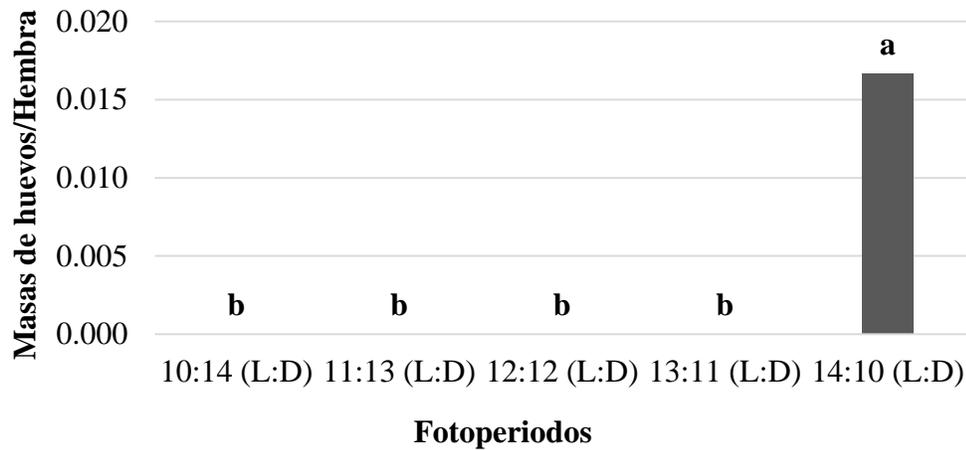


Figura 12. Biotipo nepalés de *Lilioceris cheni*. Promedio de Masas de huevo/Hembra bajo diferentes fotoperiodos. Letras diferentes muestran diferencias significativas ($P < 0.05$). Fort Pierce, Florida, Estados Unidos.

El DL_{50} calculado para la población nepalés fue de 15.84 horas (Figure 13), con un intervalo de 13.95 – 43.17 ($P < 0.05$). Esta duración del día no se observa en la península de Florida, y la amplitud del rango está asociado a la alta variabilidad en el estado psicológico inicial de los insectos, y otros factores mencionados para la población china.

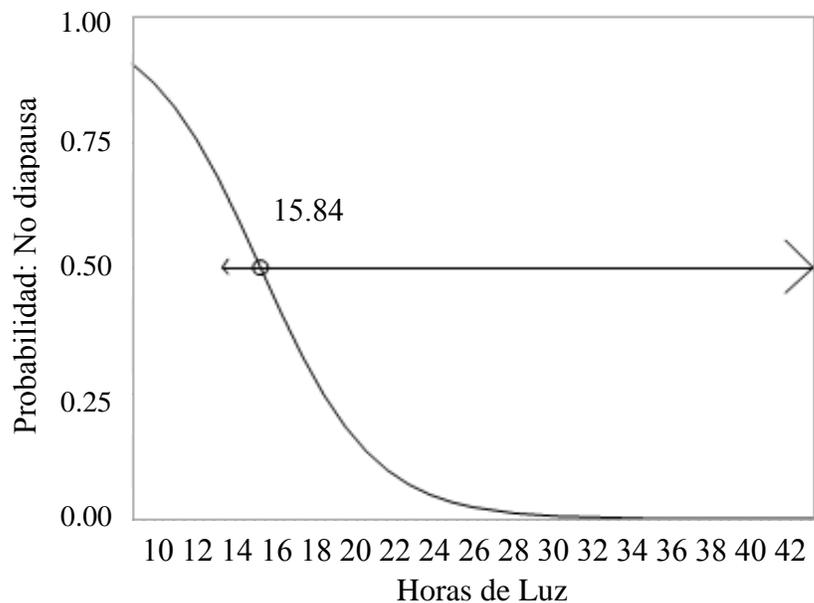


Figura 13. Biotipo nepalés de *Lilioceris cheni*. Predicción de la duración crítica del día (DL_{50}) (Wald $X^2 = 5.28$, $P < 0.05$) a la cual 50% de la población sale de diapausa. Límites fiduciales al 95%: 13.95 – 43.17 horas. Fort Pierce, Florida, Estados Unidos.

Se realizó un análisis de varianza ($P < 0.05$) para comparar las masas de huevos puestas por hembra entre ambos biotipos bajo distintos fotoperiodos. Debido a que la interacción entre el fotoperiodo y biotipo fue importante, las dos poblaciones no responden de la misma manera al fotoperiodo (Figura 8 y Figura 11). La población china es más prolífica que la nepalés (Diaz *et al.* datos no publicados¹) esto explicaría porque el biotipo chino puso más masas de huevos por hembra que los insectos nepalés bajo fotoperiodos de 10:14 y 13:11 (L:D), los únicos que mostraron diferencias importantes. En los otros fotoperiodos no se observaron diferencias significativas, posiblemente debido a que el estado psicológico inicial de los insectos no fue apropiado y otras razones ya mencionadas. En general, hubo diferentes respuestas de ovoposición bajo las condiciones de este experimento, y el valor de DL_{50} para ambas poblaciones no pudo ser claramente determinado. Un mejor entendimiento de las condiciones que inducen la diapausa de *L. cheni* es requerido para reducir la alta variabilidad observada.

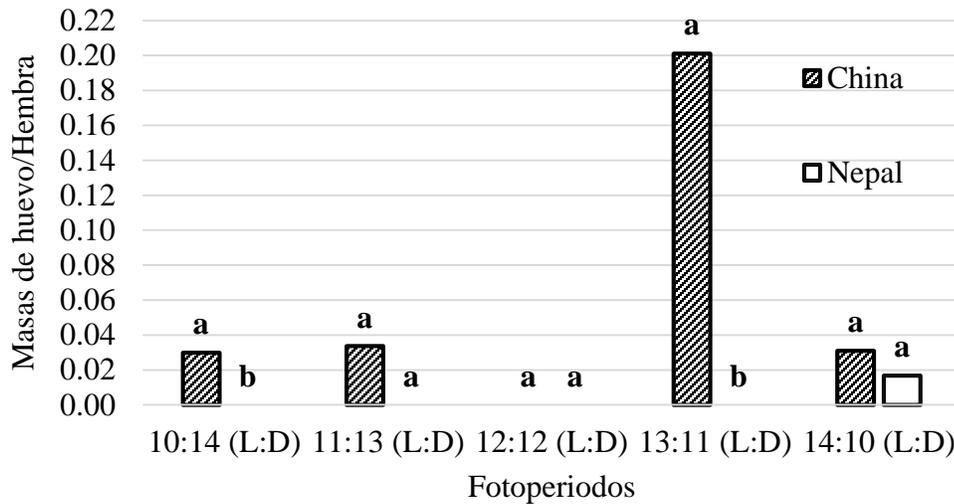


Figura 14. *Lilioceris cheni*. Análisis de varianza de masas de huevos puestos por hembra entre ambos biotipos, chino y nepalés, bajo los diferentes fotoperiodos ($P < 0.05$) probados en el experimento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre biotipos. Fort Pierce, Florida, Estados Unidos.

Tolerancia al frío. La diapausa es un proceso dinámico que responde a cambios ambientales, permite a varias especies de insectos sobrevivir a condiciones desfavorables y está caracterizado por la ausencia de actividad reproductiva (Lee y Denlinger 1991). Un procedimiento Probit fue utilizado para calcular los valores LT_{50} y LT_{90} , el tiempo requerido para matar 50 y 90% de las poblaciones china y nepalés. En la población china, se encontró que en la mayoría de los casos para ambos estados (diapausa y reproductivo), a las diferentes temperaturas probadas (5° , 0° and -5°C), la influencia de los distintos periodos de tiempo (0.5, 1, 2, 4 y 8 horas) no fue significativo para la mortalidad (Cuadro 1), excepto para los insectos reproductivos a -5°C . En la población nepalés, la influencia del tiempo (de acuerdo a Wald X^2) no fue significativa a 5°C , pero lo fue a 0° and -5°C , aunque a 0°C la mortalidad fue baja. Esto concuerda con los resultados de Diaz *et al.* 2008, donde el crisomélido *Gratiana boliviana* mostró una alta resistencia a temperaturas de 0°C durante periodos de tiempo menores a 24 h. Posiblemente, el tiempo de exposición fue muy corto y/o la temperatura no fue lo suficientemente fría para reflejar el efecto de estas dos variables en la mortalidad. Sin embargo, es importante notar otro factor que pudo afectar los resultados, el estado fisiológico inicial de los insectos. Esto es evidente cuando los valores de LT_{50} y LT_{90} son analizados (Cuadro 2). Los límites fiduciales al 95% son muy amplios, sugiriendo una alta variabilidad en las observaciones. Bajo las condiciones de esta investigación, los valores de LT_{50} and LT_{90} no pudieron ser determinados con certeza.

Cuadro 1. Significancia de X^2 de Wald para diferentes condiciones de temperatura sobre *Lilioceris cheni*. Fort Pierce, Florida, Estados Unidos.

Biotipo	Estado	Temperatura (°C)	X^2 de Wald	Prob> X^2	Significancia	Observación
Chino	D	5	N.C.	N.C.	No	Sin mortalidad
Chino	R	5	N.C.	N.C.	No	Sin mortalidad
Chino	D	0	N.C.	N.C.	No	Sin mortalidad
Chino	R	0	0.0000	0.9990	No	
Chino	D	-5	2.9293	0.0870	No	
Chino	R	-5	10.4888	0.0012	Sí	
Nepalés	D	5	N.C.	N.C.	No	Sin mortalidad
Nepalés	R	5	N.C.	N.C.	No	Sin mortalidad
Nepalés	D	0	6.7612	0.0093	Sí	
Nepalés	R	0	5.8979	0.0152	Sí	
Nepalés	D	-5	19.5788	0.0001	Sí	
Nepalés	R	-5	10.7524	0.0010	Sí	

R: Reproductivo.

D: Diapausa

N.C.: No calculado.

Sin mortalidad: No se registró mortalidad bajo estas condiciones.

Cuadro 2. Tiempos letales significativos y límites fiduciales de tolerancia al frío para *Lilioceris cheni*. Fort Pierce, Florida, Estados Unidos.

Biotipo	Estado	Temperatura (°C)	LT ₅₀		LT ₉₀	
			Valor (h)	Límites fiduciales 95% (h)	Valor (h)	Límites fiduciales 95% (h)
Chino	R	-5	2.30	1.19 - 4.53	11.17	5.32 - 147.37
Nepalés	D	0	14.56	6.40 - X	130.86	24.6 - X
Nepalés	R	0	15.34	5.82 - X	256.47	31.12 - X
Nepalés	D	-5	2.47	1.63 - 3.90	11.81	6.46 - 48.40
Nepalés	R	-5	0.74	0.18 - 1.28	6.53	3.28 - 61.55

X: Representa valores superiores a las 500 horas.

LT₅₀: Tiempo letal para el 50% de la población.

LT₉₀: Tiempo letal para el 90% de la población.

R: Reproductivo

D: Diapausa

Para comparar la tolerancia al frío entre estados para cada biotipo, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) a la temperatura donde se registró una mayor mortalidad, es decir a -5°C (Figura 15). En ambos biotipos, no se encontraron diferencias significativas entre el estado de diapausa y no diapausa. Posiblemente, ambos estados mostraron la misma tolerancia al frío a esta temperatura (-5°C) debido a que el tiempo de exposición, o la misma temperatura, no fueron suficientes para hacer evidente la resistencia al frío de los insectos en diapausa y la susceptibilidad del estado reproductivo a bajas temperaturas. No se observaron diferencias en mortalidad a -3°C y 24 horas de frío en los insectos del estudio realizado en *Leptinotarsa decemlineata* Say (Hiiesaar *et al.*2014). Las diferencias en mortalidad fueron evidentes recién en -4°C y 24 horas.

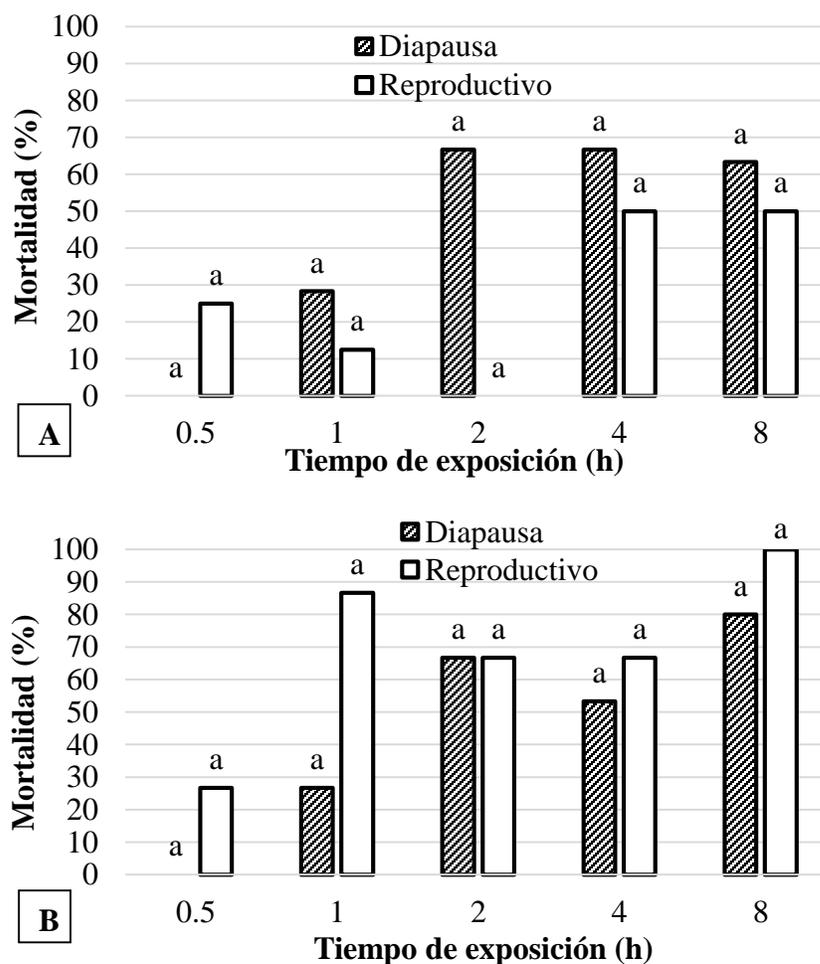


Figura 15. Mortalidad (%) a -5°C durante diferentes tiempos de exposición de insectos en estado de diapausa y no diapausa del biotipo (A) chino y (B) nepalés. Diferencias significativas entre estados no fueron encontradas ($P < 0.05$). Fort Pierce, Florida, Estados Unidos.

La diapausa es un proceso dinámico que evoluciona con la estacionalidad (Nation 2008), cuyo inicio y terminación no son simplemente procesos de encendido/apagado (Lee y Denlinger 1991). Hay pruebas de independencia entre diapausa y tolerancia al frío en algunos insectos pero, en la mayoría, la tolerancia al frío está estrechamente relacionada con la diapausa, aumentando con la profundización en este proceso (Lee y Denlinger 1991). Esto sugiere que es necesario prolongar el tiempo bajo condiciones de inducción a diapausa, para así llegar a un estado de diapausa apropiado y analizar adecuadamente la resistencia al frío de *L. cheni*.

Para comparar la tolerancia al frío entre biotipos en cada estado, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANDEVA) con los resultados a -5°C (Figura 16). No se encontraron diferencias significativas entre las poblaciones chinas y nepalés, excepto en un caso, lo que sugiere que la tolerancia al frío es similar en ambos biotipos.

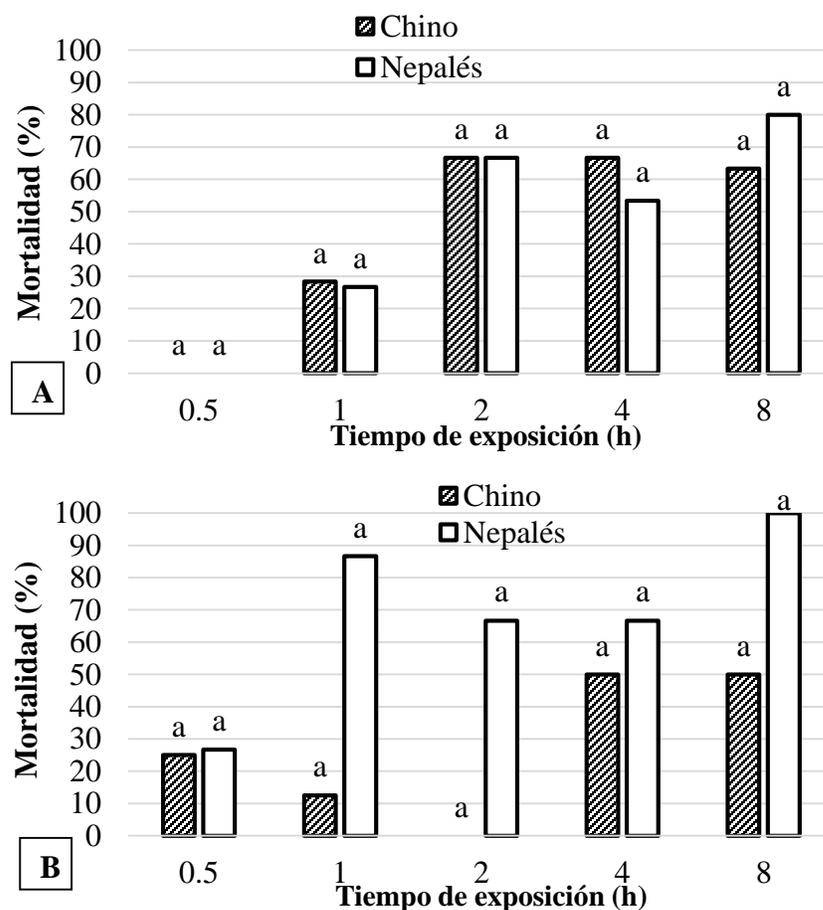


Figura 16. Mortalidad (%) de las poblaciones china y nepalés a -5°C durante cinco periodos de exposición en condición de (A) diapausa y (B) reproductiva. Diferencias significativas entre estados no fueron encontradas ($P < 0.05$), excepto en los insectos reproductivos expuestos a 1 hora de luz. Fort Pierce, Florida, Estados Unidos.

Un análisis molecular (Center *et al.* 2013) indica que las poblaciones china y nepalés pertenecen a la misma especie, y se recogieron en latitudes similares (lo que se explica en el siguiente apartado), por lo que se prevé tendrán similares respuestas. Bajo las condiciones de este estudio, las poblaciones de Nepal y China tienen una tolerancia al frío similar, y no se observó ninguna diferencia en la respuesta a condiciones de frío entre los estados. Es importante tener en cuenta que los experimentos muestran resultados sujetos a variabilidad debida al estado fisiológico inicial y otros factores discutidos anteriormente.

Modelado de nicho climático. Los modelos de distribución de especies permiten predecir las posibles distribuciones geográficas de plantas y los animales (Guisan y Thuiller 2005). Usando esta herramienta, es posible predecir las áreas en los Estados Unidos donde *L. cheni* puede sobrevivir. MaxEnt trabaja con coordenadas geográficas de los registros de presencia del insecto, junto con datos climáticos. Los lugares donde se recolectó el biotipo chino se especifican por Center *et al.* (2013), y las coordenadas de recolección de la población nepalés también fueron proporcionadas por el mismo investigador (Figura 17).

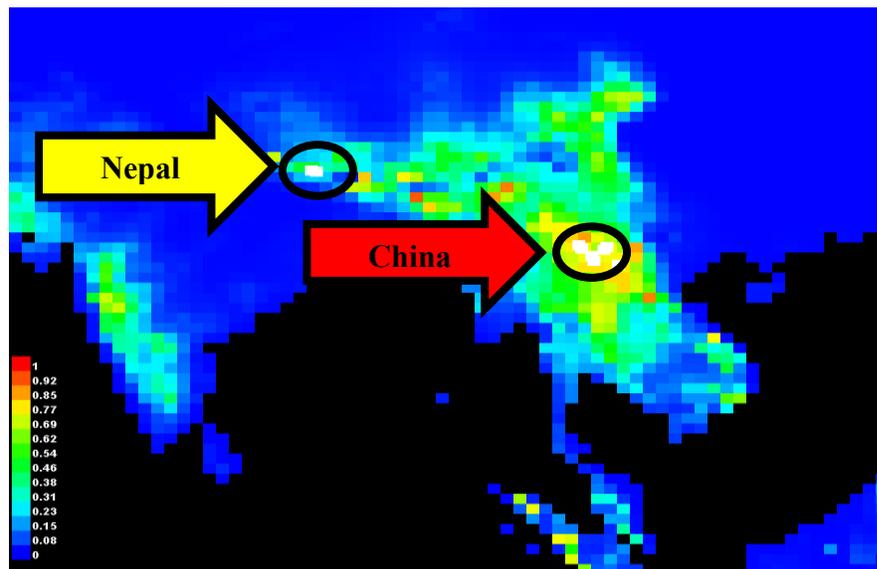


Figura 17. Zonas de Asia donde especímenes de *Lilioceris cheni* fueron colectados. La provincia Yunnan de China y el valle de Katmandú de Nepal. Las áreas blancas indican los puntos exactos.

Para la población de China, las áreas de Estados Unidos con mayor probabilidad de establecimiento de *L. cheni* son los estados de Texas, Nuevo México, Arizona y Nevada, pero las condiciones climáticas también son adecuadas en Florida (Figura 18). Algo similar ocurre con la distribución potencial de los insectos de Nepal (Figura 19), donde no solo parte de los estados de Texas, Nuevo México y Arizona muestran un buen ajuste a las exigencias climáticas del insecto, sino también la península de Florida. Sin embargo, es importante señalar que la patata aérea no ha sido reportada en Nuevo México, Arizona, Nevada y la región de Texas indicada en el mapa (Figura 20), el cual es el principal factor limitante considerando que *L. cheni* es monófago (Pemberton y Witkus 2010).

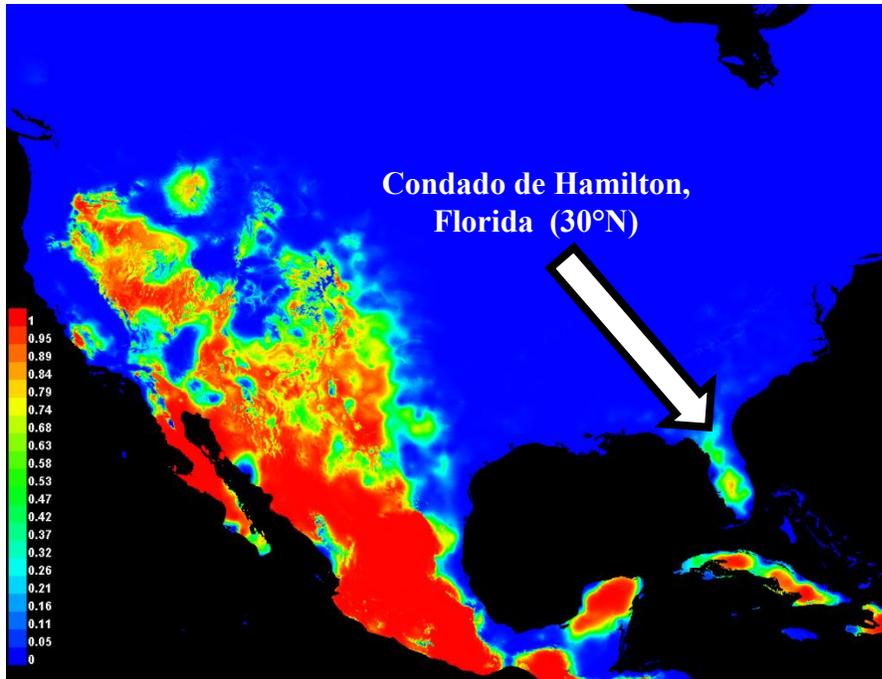


Figura 18. Mapa de distribución potencial del biotipo chino de *Lilioceris cheni* en los Estados Unidos. Colores cálidos indican una alta probabilidad de ser un lugar potencial de establecimiento.

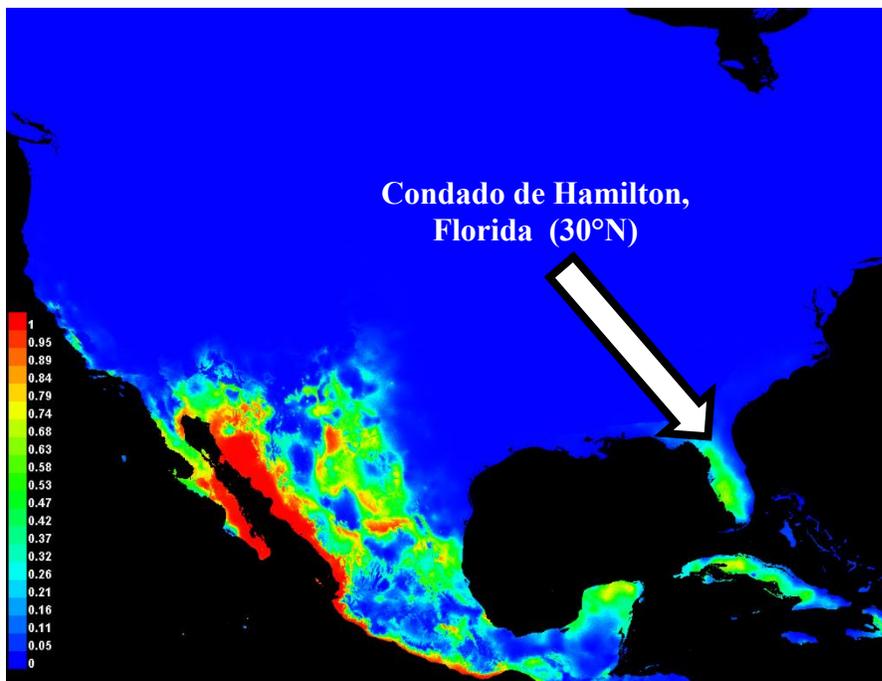


Figura 19. Mapa de distribución potencial del biotipo nepalés de *Lilioceris cheni* en los Estados Unidos. Colores cálidos indican una alta probabilidad de ser un lugar potencial de establecimiento.

Dioscorea bulbifera

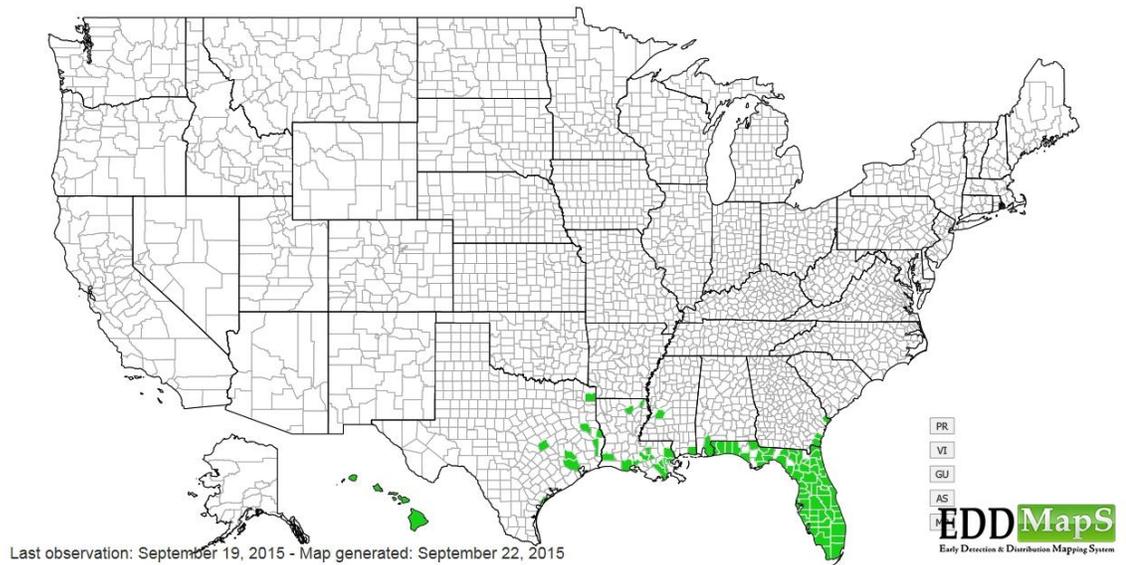


Figure 20. Mapa de distribución de *Dioscorea bulbifera* L. en los Estados Unidos. Fuente: EDDMaps.

El mapa de distribución potencial de los insectos de Nepal podría ser mejorado, teniendo en cuenta que el número de coordenadas proporcionadas sobre los sitios de recolección fue bajo, lo que impacta en la predicción de su establecimiento (Hernández *et al.* 2006). Además, conocer el tiempo letal a temperatura fría para el 50% de la población, permitiría predecir el límite norte del insecto, similar a lo realizado en el trabajo de Díaz *et al.* 2008 sobre la distribución de *Gratiana boliviana*. En general, ambas poblaciones tienen distribuciones potenciales similares y Florida parece ser un área de establecimiento adecuado para el insecto, la cual llega al condado de Hamilton, 30° de latitud norte. Esto concuerda con el hecho de que ambos biotipos pertenecen a la misma especie (Center *et al.* 2013) y provienen de latitudes similares (Center *et al.* 2013).

4. CONCLUSIONES

- El fotoperiodo crítico para 50% de las poblaciones (DL_{50}) no pudo ser determinado con precisión debido a la variabilidad observada en el estado fisiológico de los insectos.
- Las diferencias en masas de huevos puestos por hembra, y principalmente el hecho de que casi la totalidad de insectos de Nepal no ovopositaron, indica que cada biotipo respondió a fotoperiodo de diferente manera.
- Los tiempos letales (LT_{50} and LT_{90}) no pudieron ser determinados con precisión debido a la variabilidad del estado fisiológico de los insectos.
- No se observaron diferencias en mortalidad entre biotipos y entre estados. Bajo las condiciones de este experimento, ambos biotipos mostraron similar resistencia al frío.
- Los biotipos de China y Nepal de *Lilioceris cheni* tienen áreas de distribución potencial similares. Florida parece ser un ambiente adecuado para el establecimiento de este insecto.

5. RECOMENDACIONES

- Investigaciones futuras respecto a las condiciones que inducen y terminan diapausa en *Lilioceris cheni* son necesarias.
- Determinar si existe diferencia en el tiempo requerido para entrar y salir de diapausa entre adultos del biotipo chino y nepalés.
- Desarrollar un estudio similar de tolerancia al frío usando temperaturas más bajas, y periodos de exposición más largos.
- Analizar la posibilidad de utilizar la metodología de superficie de respuesta para futuras investigaciones, lo que ayudaría a disminuir el número de repeticiones y obtener información precisa.

6. LITERATURA CITADA

Bean, D. W., T. Wang, R. J. Bartelt y B. W. Zilkowski. 2007. Diapause in the Leaf Beetle *Diorhabda elongata* (Coleoptera: Chrysomelidae), a Biological Control Agent for Tamarisk (*Tamarix* spp.). Entomological Society of America. Environmental Entomology 36: 531-540.

Bryd, J. H. y J. L. Castner. 2010. Forensic entomology. The utility of arthropods in legal investigations (Second Edition). Boca Raton, Florida, Estados Unidos: Taylor & Francis Group.

Center, T. D. y W. A. Overholt. 2012. Classical Biological Control of Air Potato in Florida. University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences. ENY 854. Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN95700.pdf>

Center, T. D. y W. A. Overholt. 2013. Air Potato Leaf Beetle (Suggested Common Name), *Lilioceris cheni* Gressitt and Kimoto (Insecta: Coleoptera: Chrysomelidae: Criocerinae). University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences. ENY 854. Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/in/in97200.pdf>

Center, T.D., M. Rayamajhi, F.A. Dray, P.M. Madeira, G. Witkus, E. Rohrig, E. Mattison, E. Lake, M. Smith, J. Zhang, M. Purcell, A. Konstantinov y D. Schmitz. 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. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/09583157.2013.790931>

Comisión de Pesca y Conservación de Vida Silvestre de Florida. 2015. Consultado en Febrero de 2015. Florida Fish and Wildlife. Disponible en: <http://myfwc.com/wildlifehabitats/nonnatives/>

Croxton, M., M. Andreu, D. Williams, W. Overholt, y J. Smith. 2010. Geographic origins and genetic diversity of air-potato (*Dioscorea bulbifera*) in Florida. Invasive Plant Science and Management 4: 22-30.

Cuda, J. P. y J. H. Frank. 2013. Florida's Established Arthropod Weed Biological Control Agents and Their Targets. University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences. ENY 853. Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN77900.pdf>

Diaz, R., W.A. Overholt, A. Zamoya, F. Sossa, D. Cordeau y J. Medal. 2008. Temperature-dependent development, cold tolerance, and potential distribution of *Gratiana boliviana* (Coleoptera: Chrysomelidae), a biological control agent of tropical soda apple, *Solanum viarum* (Solanaceae). *Biocontrol Science and Technology*. Vol. 18, 193-207.

Diaz, R., W.A. Overholt, D. Hahn y A. C. Samoya. 2011. Diapause Induction in *Gratiana boliviana* (Coleoptera:Chrysomelidae), a Biological Control Agent of Tropical Soda Apple in Florida. *Annals of the Entomological Society of America*, 104(6):1319-1326.

EDDMaps. 2015. Air potato *Dioscorea bulbifera* L. (En línea). Consultado en Octubre de 2015. Disponible en: <https://www.eddmaps.org/Species/subject.cfm?sub=3017>

Environmental System Research Institute, ESRI. ArcGIS. 2012. Versión 10.1. California, Estados Unidos.

Guisan, A. y W. Thuiller. 2005. Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. *Ecology Letters* 8: 993–1009.

Hernandez, P. A., C. H. Graham, L. L. Master y D. L. Albert. 2006. The effect of sample size and species characteristics on performance of different species distribution modeling methods. *Ecography* 29: 773-785.

Hiiesaar, K., R. Karise, I. H. Williams, A. Luik, L. Metspalu, K. Jõgar, V. Eremeev, A. Ploomi, E. Kruus y M. Mänd. 2014. Cold tolerance of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) adults and eggs. *Zemdirbyste-Agriculture* 101-4: 431–436

JMP. s.f. Logistic analysis (En línea). Consultado en Octubre de 2015. Disponible en: http://www.jmp.com/support/help/Logistic_Analysis.shtml#100521

Jolivet, P. y E. Petitpierre. 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 W. Kaufman. 2012. *Invasive Plants: Guide to Identification and the Impacts and Control of Common North American Species* (Second ed.). Stackpole Books. Mechanicsburg, Pensilvania , Estados Unidos.

Lee, R. E. Jr. y D. L. Denlinger. 1991. *Insects at low temperature*. Chapman and Hall. New York, Estados Unidos. Disponible en: <https://books.google.hn/books?id=rWwECAAQBAJ&pg=PA175&lpg=PA175&dq=diapause+and+cold+hardiness&source=bl&ots=hBgaNJgdXs&sig=7gvAMq1s0g8qOPnfcVUc7byfAFg&hl=es&sa=X&ved=0CHoQ6AEwCWoVChMllp-QqOLXyAIVgio-Ch3laA1v#v=onepage&q=diapause%20and%20cold%20hardiness&f=false>

Nation, J. L. 2008. *Insect Physiology and Biochemistry* (Second Edition). Boca Raton, Florida, Estados Unidos: Taylor & Francis Group.

Overholt, W. A., R.W. Pemberton, L. Markle, J. Taylor, M. Meisenburg, M. King, D. Schmitz, L. Raz, G. Wheeler, y G.R. Parks. 2014. Air Potato (*Dioscorea bulbifera*) Management Plan: Recomendations from the Air Potato Task Force. Florida Exotic Pest Plants Council. Disponible en: http://www.fleppc.org/Manage_Plans/AirpotatoManagementPlan_Final.pdf

Pemberton, R. W. y G. L. Witkus. 2010. Laboratory host range testing of *Lilioceris* sp. near *imprensa* (Coleoptera: Chrysomelidae) – a potential biological control agent of air potato, *Dioscorea bulbifera* (Dioscoreaceae). *Biocontrol Science and Technology* 20: 567-587. Disponible en: <http://naldc.nal.usda.gov/naldc/download.xhtml?id=42888&content=PDF>

Phillips, S. J., R. P. Anderson, y R. E. Schapire. 2015. Maximum entropy modeling of species geographic distributions software (MaxEnt). Versión 3.3.3k. Diponible en: <http://www.cs.princeton.edu/~schapire/maxent/>

SAS Institute. 2013. Versión 9.3. SAS Institute. Cary, Carolina del Norte, Estados Unidos.

Tauber, M. J. y C. A. Tauber. 1976. *Insect Seasonality: Diapause Maintenance, Termination and Postdiapause Development*. Department of Entomology, Cornell University. Ithaca, New York. *Annual Review of Entomology* 21: 81-107.

Tauber, M. J., C. A. Tauber y S. Mazaki. 1986. *Seasonal Adaptations of Insects*. New York, Estados Unidos. Oxford University Press, Inc. Disponible en: <https://books.google.hn/books?hl=es&lr=&id=SCTtG4mPBGMC&oi=fnd&pg=PA3&dq=Seasonal+adaptations+of+insects+tauber&ots=7fpnV7UhV1&sig=Ddp195DiDFvSyWRv98HrMHqNy0#v=onepage&q=diapause&f=false>

Time and Date. 2015. Sunrise, sunset and daylength in Orlando, Florida (En línea). Consultado en Octubre de 2015. Disponible en: <http://www.timeanddate.com/sun/usa/orlando?month=4&year=2015>

Ünal B., S. y I. Tunç. 2012. The response of a southern strain of *Orius majusculus* (Reuter) (Hemiptera: Anthocoridae) to photoperiod and light intensity: Biological effects and diapause induction. *Biological Control* 63: 157–163.

Weislo, E. 2015. Florida Nature. Consultado en Febrero de 2015. Exotic and Invasive Plants in Florida. Disponible en: <http://floridasnature.com/exotics.htm>

7. ANEXOS

Anexo 1. Variables climáticas usadas por el software MaxEnt.

BIO1 = Temperatura anual media.

BIO2 = Rango diurno medio (Media mensual (temp max- temp min))

BIO3 = Isothermalidad (BIO2/BIO7) (* 100)

BIO4 = Temperatura de la temporada (desviación estándar *100)

BIO5 = Temperatura máxima del mes más cálido.

BIO6 = Temperatura mínima del mes más frío.

BIO7 = Rango anual de temperatura (BIO5-BIO6)

BIO8 = Temperatura media del trimestre más húmedo.

BIO9 = Temperatura media del trimestre más seco.

BIO10 = Temperatura media del mes más cálido.

BIO11 = Temperatura media del mes más frío.

BIO12 = Precipitación anual.

BIO13 = Precipitación del mes más húmedo.

BIO14 = Precipitación del mes más seco.

BIO15 = Precipitación de la temporada (Coeficiente de variación)

BIO16 = Precipitación del trimestre más húmedo.

BIO17 = Precipitación del trimestre más seco.

BIO18 = Precipitación del trimestre más cálido.

BIO19 = Precipitación del trimestre más frío.