

DETERMINACIÓN DE LOS DíPTEROS PARASITOIDES EN PIERIDAE, PAPILIONIDAE Y NYMPHALIDAE (LEPIDOPTERA) DEL CCH PLANTEL VALLEJO, CON EL USO DE BIOCÓDIGOS DE BARRAS URBANOS (BBU)

¹Mariela Rosales-Peña¹, Mónica Bárbara Quijano-Pérez¹, Yoalli Acit Paredes-Balderas¹, y Fernando Villagomez²✉

¹Colegio de Ciencias y Humanidades plantel Vallejo, Av. 100 metros, Esq. Fortuna, Magdalena de las Salinas, Gustavo A. Madero, C. P. 07760, CDMX, México.

²Laboratorio de Ecología y sistemática de Microartrópodos, Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias, UNAM, Av. Universidad 300, Circuito exterior S/N, Ciudad Universitaria, C. P. 04510, CDMX, México.

✉ Autor de correspondencia: lfvillagomez@gmail.com

RESUMEN. La crianza de mariposas en cautiverio es una de las actividades que se realizan en el CCH plantel Vallejo como programa de introducción científica a los estudiantes del bachillerato; sin embargo, muchas de estas mariposas no eclosionan debido a la alta presencia de parasitoides, dentro de los que destacan las moscas de la familia Tachinidae. Como parte del proyecto de Biocódigos de Barras Urbanos (BBU) de la CDMX, se realizó la determinación específica de los parasitoides de Tachinidae por medio del marcador molecular *cox1*, con el fin de diseñar planes de acción para minimizar el porcentaje de mariposas parasitadas de las especies *Leptophobia aripa*, *Pterourus multicaudata*, *Danaus gilippus* y *Danaus plexippus*. Por medio de la herramienta BLAST del genBank y con inferencia filogenética Bayesiana se determinaron con un porcentaje de identidad del 99.8 % y 100 % y soporte de ramas de Bootstrap de 98 % y 100 %, respectivamente, las especies *Patelloa xanthura* (Wulp) e *Hyphantrophaga virilis* (Aldrich y Webber), mismas que posteriormente fueron corroboradas por sus características morfológicas y literatura especializada. Ambas especies son parasitoides generalistas, pero difieren en sus patrones conductuales y de parasitismo, por lo que fue posible establecer planes de acción diferenciales para cada especie de parasitoide.

Palabras clave: Tachinidae, *cox1*, determinación molecular, *Patelloa xanthura*, *Hyphantrophaga virilis*.

Determination of Diptera parasitoids in Pieridae, Papilionidae and Nymphalidae (Lepidoptera) from the CCH campus Vallejo, with the use of Urban Bar Biocodes (BBU)

ABSTRACT. The breeding of butterflies in captivity is one of the activities that are carried out in the CCH campus Vallejo as a program of scientific introduction to high school students. However, many of these butterflies do not hatch due to the high presence of parasitoids, within of which the flies of the family Tachinidae stand out. As part of the CDMX Urban Bar Code (BBU) project, the specific determination of Tachinidae parasitoids was carried out using the *cox1* marker, in order to design action plans to minimize the percentage of parasitized butterflies species of *Leptophobia aripa*, *Pterourus multicaudata* and *Danaus plexippus*. Using the BLAST tool of the genBank and with Bayesian phylogenetic inference, the species *Patelloa xanthura* (Wulp) and *Hyphantrophaga virilis* (Aldrich and Weber) were determined with an identity percentage of 99.8 % and 100 % and Bootstrap branch support of 98 % and 100 %, respectively, which were subsequently corroborated by morphological characteristics and specialized literature. Both species are generalist parasitoids, but differ in their behavioral and parasitism patterns, so it was possible to establish differential action plans for each parasitoid species.

Keywords: Tachinidae, *cox1*, molecular determination, *Patelloa xanthura*, *Hyphantrophaga virilis*.

INTRODUCCIÓN

Los jardines para polinizadores tienen la finalidad de atraer a diversas especies de insectos, entre ellos a las mariposas; estos espacios les proporcionan refugio, alimento y un lugar ideal para reproducirse, además, se pueden estudiar sus interacciones intra e interespecíficas, como la polinización, competencia e incluso el parasitismo (Galindo, 2014).

Los parasitoides son algunos de los enemigos naturales de las mariposas, sin embargo, para la crianza en cautiverio, es prioritario reducir la mortandad de estos insectos polinizadores por efecto de moscas parasitoides, por lo que es necesario comenzar por la determinación de las especies de Tachinidae que infectan a *Leptophobia aripa* (Boisduval, 1836), *Danaus plexippus* (Linnaeus, 1758), *Danaus gilippus* (Cramer, 1776) y *Pterourus multicaudata* (W.F. Kirby, 1884) en un ambiente urbano. Estos insectos durante su estado larvario se alimentan y desarrollan dentro o sobre otro invertebrado, y eventualmente llevan a su muerte. La mayoría de las especies de insectos parasitoides pertenecen a los órdenes Hymenoptera y Diptera (Godfray, 1994), y en este caso, parasitan a los estadios de huevo y larvas de diferentes fases de lepidópteros.

Uno de los graves problemas para la detección de estos parasitoides, es la escasa información con la que se cuenta en el país en cuestiones taxonómicas y biogeográficas, también debido a la gran plasticidad de algunas especies por parasitar más de 140 especies de hasta 19 familias de lepidópteros (Janzen y Hallwachs, 2005). Stireman *et al.* (2009), evaluaron la riqueza de taquínidos parasitoides de lepidópteros en el noreste de los Andes Ecuatoriales y encontraron 157 morfoespecies presentes en 160 especies de 16 familias, por lo que puede tenerse una idea de la gran plasticidad que tienen los taquínidos para parasitar a sus hospederos.

Una de las especies de mariposas más emblemáticas de nuestro país es la mariposa monarca, *D. plexippus*, de la que también se ha documentado en Estados Unidos de América que los parasitoides primarios son taquínidos de hasta siete especies diferentes, incluso se reportan casos de multiparasitismo en el que más de una especie de taquínido emerge del huésped, algunas especies han desarrollado diversas estrategias de infección, por lo que incluso son capaces de depositar microhuevos en el follaje que, al ser consumidos por las larvas resultan parasitados por los taquínidos (Oberhauser, *et al.*, 2017).

La sistemática molecular es una herramienta que permite la identificación de las especies de taquínidos que afectan ambientes urbanos, aunque también es necesaria la confirmación taxonómica con base en caracteres morfológicos, con el fin de evitar cualquier error nomenclatural. La presente investigación se realizó como parte del programa de Biocódigos Barras Urbanos CDMX (BBU), del centro Bioenseñanza ADN y el DNA Learning Center del Cold Spring Harbor Laboratory en Nueva York, EUA. Para los análisis moleculares se utilizó una región de ADN mitocondrial (*cox1*) para determinar al mayor nivel taxonómico posible las especies que infectan a las larvas de mariposas presentes en los jardines del Colegio Ciencias Humanidades, plantel Vallejo de la Ciudad de México, y así conocer más sobre su historia natural y mecanismo de parasitismo, con el fin de desarrollar un protocolo para el control de estos parasitoides durante el proceso de crianza en cautiverio y minimizar el porcentaje de parasitismo para aquellos que deseen realizar el proceso de crianza en cautiverio de lepidópteros para fines docentes, de investigación o incluso en aspectos comerciales.

MATERIALES Y MÉTODO

Se realizó la crianza en cautiverio de las especies *L. aripa*, *D. plexippus* y *D. gilippus* dentro de las instalaciones del Colegio de Ciencias y Humanidades plantel Vallejo en el jardín al aire libre del SILADIN (Sistema de Laboratorios para el Desarrollo y la Innovación). Se colectaron las hojas de mastuerzo *Tropaeolum majus* L., de algodoncillo *Asclepias curassavica* L. y *Asclepias physocarpa* E. Mey., que presentaban huevos de las especies antes mencionadas, y se trasladaron a un área acondicionada del Acuario del CCH-Vallejo para llevar la crianza en cautiverio con base en lo propuesto por García-Hernández (2014). Las hojas con huevos se colocaron en recipientes

plásticos con tapa y se esperó a que eclosionaran las larvas, también se colectaron larvas en estadios avanzados de las mismas plantas, las que se aislaron en otros contenedores; el manejo de los ejemplares consistió en el traslado de los mismos a los contenedores mediante el uso de pinceles y siempre con guantes estériles, también en proporcionar su alimento y la sanitización de su contenedor. En el caso de *P. multicaudata*, se obtuvo una larva a punto de pupar, producto de una donación estudiantil en el mismo plantel.

Para obtener las muestras de taquínidos parasitoides, se identificaron las pupas de mariposas parasitadas por medio de la observación, ya que las pupas cambian a una coloración más parda o incluso negra, en ocasiones es posible ver a contraluz las larvas de mosca moviéndose en el interior de la pupa de la mariposa. Estas pupas se aislaban de manera individual en un contenedor de un litro tapadas con malla tul, permitiendo que continuaran su desarrollo hasta completar su ciclo de vida; una vez que emergieron los dípteros adultos de la crisálida, se almacenaron en alcohol al 96 % y se mantuvieron en refrigeración para mantener una mayor calidad en el DNA.

Las muestras fueron llevadas a las instalaciones del SILADIN del CCH-Azcapotzalco, donde se establecieron los laboratorios semi-ambulantes de BeADN, el cual es un centro de aprendizaje de Biología molecular para estudiantes de educación media superior dedicado a la educación genética y biotecnológica, en donde se proporcionaron los reactivos y materiales necesarios para llevar a cabo los protocolos para la extracción del DNA mitocondrial. Se utilizaron las técnicas de extracción y amplificación propuestas por Folmer *et al.* (1994), para el marcador *cox1*, el análisis y la edición de las secuencias se realizó en los programas DNAsubway y BioEdit. Se utilizó la herramienta BLAST del genBank para correlacionar con base en la identidad genética las especies de parasitoides que estaban parasitando a los lepidópteros. Posteriormente, se llevó a cabo la determinación morfológica de los ejemplares de Tachinidae con base en las claves de O'Hara (2005). Finalmente se descargaron del genbank secuencias de la misma especie, especies cercanas y géneros cercanos para corroborar mediante un análisis bayesiano (Mr. Bayes. 3.2; GTR+I; ngen=100000) y un árbol de consenso estricto que las secuencias obtenidas efectivamente pertenecieran a las especies previamente determinadas por los métodos morfológicos y moleculares con base en el marcador *cox1*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La determinación de las especies de Tachinidae parasitoides de mariposas se realizó inicialmente por la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) de GenBank, en donde arrojó dos especies pertenecientes a dos géneros, *Patelloa xanthura* (Wulp) y *H. virilis* con un porcentaje de identidad del 99.8 % y 100 %, respectivamente. Subsecuentemente se realizaron las determinaciones morfológicas para aseverar dicha determinación basada únicamente en el marcador molecular *cox1*. El análisis bayesiano confirma las determinaciones (Figura 1) con un soporte de ramas (bootstrap) del 98 a 100 % para las secuencias obtenidas en este estudio, por lo que podemos observar que en aquellos grupos de Tachinidae en los que se posee información molecular previa, la herramienta de BLAST es un buen indicio sobre la identidad taxonómica de los ejemplares, aunque se recomienda siempre corroborar estas determinaciones con una delimitación morfológica.

Las dos especies encontradas de estas moscas pertenecen a especies generalistas de lepidópteros. *Hyphantrophaga virilis* puede infectar más de 10 familias y 100 especies de larvas de lepidópteros, tiene una distribución muy amplia en el Continente Americano, reportándose desde Canadá hasta Perú. Parasita directamente a los lepidópteros en la fase de larva, pero también puede depositar microhuevos en las hojas que, al ser consumidos, las larvas parasitoides comienzan a desarrollarse

dentro hasta consumirlo (Cave y Cordero, 1999; Oberhauser *et al.*, 2017). Es por esta razón que puede parasitar larvas que han sido criadas desde huevo, si existe un manejo inadecuado en la limpieza de las hojas que se le ofrecen como alimento durante las etapas larvianas.

P. xanthura se distribuye desde México hasta Argentina y también es una especie generalista que ataca 145 especies y 19 familias de mariposas, aunque solamente ataca a las larvas en sus primeros estadios y no se tiene registro de la capacidad de ovipositar microhuevos en hojas (Janzen y Hallwachs, 2005).

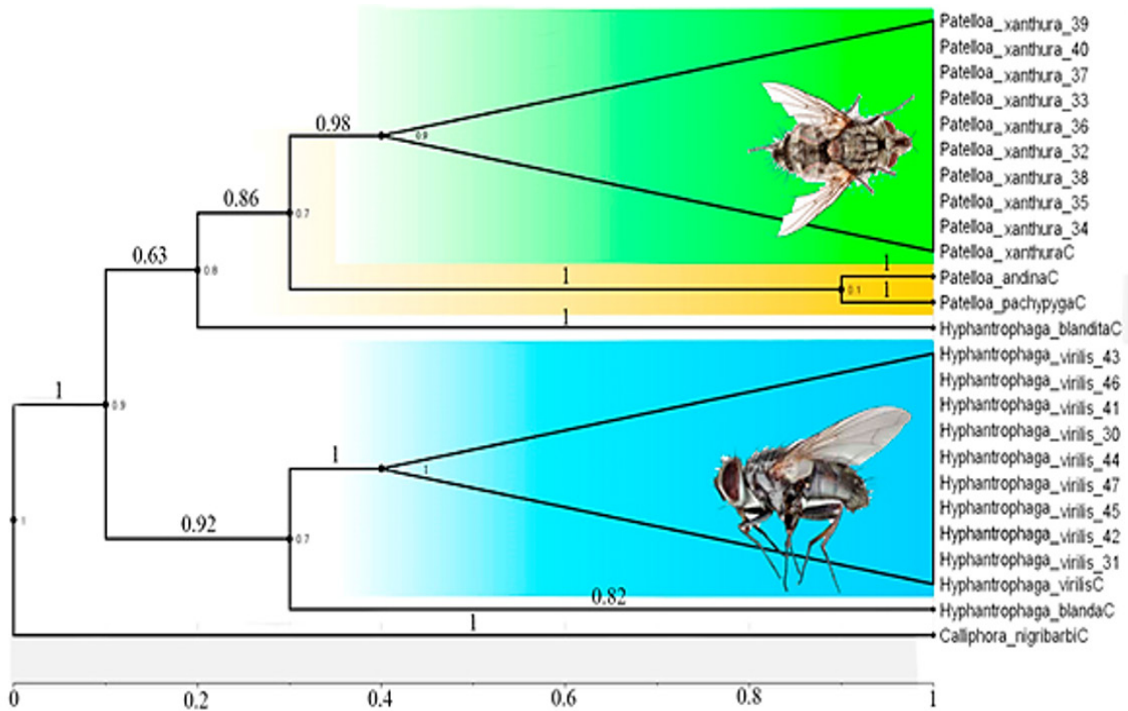


Figura 1. Análisis filogenético Bayesiano de los taquídeos parasitoides de lepidópteros urbanos *Patelloa xanthura* (Wulp) e *Hyphantrophaga virilis* (Aldrich y Webber) en el CCH Vallejo. Secuencias terminadas con C fueron obtenidas en este estudio, 31-47 obtenidas del GenBank. Valores de soporte de Bootstrap sobre las ramas, entre las ramas resolución del árbol de consenso estricto.

Debido a la etología infectiva diferencial que presentan ambas especies de moscas (*P. xanthura* e *H. virilis*), es posible generar un plan de acción para evitar completamente la mortalidad de los lepidópteros criados en cautiverio por parte de estas dos especies de moscas taquíneas, por lo que es importante que las plantas que se les van a ofrecer como alimento o para la puesta de huevos, no se encuentren en espacios abiertos donde puedan llegar fácilmente estas moscas y ovipositar, lo más recomendable es germinar las plantas hospederas para garantizar su ausencia de parásitos previos, y tenerlas en resguardo en un invernadero cubierto de malla antiáfidos para evitar la entrada de parasitoides, incluso cuando aún no existan larvas de mariposas.

Posteriormente, incorporar a las mariposas a la zona de plantas hospederas a manera de jaula de vuelo y colectar los huevos depositados en las hojas de dichas plantas, mismas que pueden ser trasladadas al laboratorio para continuar con su ciclo de vida en condiciones controladas. Una vez

eclosionadas las larvas, se les deben proporcionar de preferencia hojas frescas de invernadero; si las plantas se encuentran en el exterior, deben ser debidamente sanitizadas con agua corriente sin el uso de detergentes. También es posible tener plantas hospederas en macetas forradas de malla antiáfidos, y que sea en este ambiente controlado en el que las larvas de mariposas desarrollen su ciclo de vida sin estar expuestas a ser parasitadas por taquínidos.

CONCLUSIONES

Se determinaron dos especies de moscas taquínidas parasitoides de mariposas por medio de secuencias genéticas con el marcador molecular *cox1* y mediante determinación morfológica tradicional. Las especies determinadas, *H. virilis* y *P. xanthura*, son generalistas ya que múltiples especies y familias dentro del orden Lepidoptera. La primera afecta a *L. aripa*, *D. plexippus* y *D. gilippus* de las familias Pieridae y Nymphalidae, mientras que la segunda es parasitoide de *P. multicaudata* de la familia Papilionidae. Se ofrecen recomendaciones básicas para evitar el parasitismo por parte de estas especies de moscas taquínidas a las mariposas que se estén reproduciendo en cautiverio o en ambientes urbanos.

AGRADECIMIENTOS

Para la Dra. Magali B.I. Honey Escandón, Directora Operativa BBU CDMX y al Dr. Jorge D. López Caballero por compartir sus conocimientos de genética y asistir con el curso-taller sobre las técnicas de BBU; al Biol. Saúl S. Esparza Vázquez, Biol. Rosa Eugenia Zárate Villanueva y Dra. Felisa Salgado Escorsia, por su apoyo y por proporcionar las instalaciones del SILADIN para este proyecto de investigación, así como sus críticas constructivas que motivaron a las alumnas en la participación de este proyecto hasta el final; a la Dra. Cristina Fernández Marco del DNALC por su apoyo, asesoramiento y acompañamiento en el viaje de premio al primer lugar nivel bachillerato al DNA Learning Center del Cold Spring Harbor Laboratory en Nueva York y a la actual administración del Colegio de Ciencias y Humanidades plantel Vallejo por su apoyo y financiamiento para acudir al LV Congreso Nacional de Entomología de la SME en Monterrey Nuevo León.

LITERATURA CITADA

- Cave, R. D. and Cordero, R. J. 1999. *Leptophobia aripa* parasitoids (Lepidoptera:Pieridae) in Honduras. *Revista científica y tecnológica de la escuela agrícola Zamorana*, 40(1): 51-55.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. and R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3(5): 294-299. PMID: 7881515
- Galindo-Ponce, L. 2014. Dípteros parasitoides de *Leptophobia aripa* (Lepidoptera: Pieridae) criadas en cautiverio y semicautiverio en el jardín de mariposas de la Fes-Iztacala. México: UNAM. Dirección General de Bibliotecas. 57 pp.
- García-Hernández, A. L. 2014. *Cría de la mariposa monarca, Danaus plexippus (Linnaeus, 1785), bajo condiciones de laboratorio y su uso como modelo experimental en educación*. Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Tesis de Maestría. 87 pp. <http://bdigital.unal.edu.co/39633/1/24587121.2014.pdf> 7 septiembre del 2018.
- Godfray, H. C. J. 1994. *Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology*, Princeton, Princeton University Press. 488pp. ISBN: 9780691000473
- Janzen, D. H. and W. Hallwachs. 2005. Dynamic database for an inventory of the macrocaterpillar fauna, and its food plants and parasitoids of the Área de Conservación Guanacaste (ACG), northwestern Costa.

Rica.

- Oberhauser, K., Elmquist, D., Perilla-López, J. M., Gebhard, I., Lukens, L. y J. Stireman. 2017. *Tachinid Fly* (Diptera: Tachinidae) Parasitoids of *Danaus plexippus* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 110(6): 536-543. DOI: 10.1093/aesa/sax048
- O'Hara, J. E. 2005. A review of the tachinid parasitoids (Diptera: Tachinidae) of Nearctic *Choristoneura* species (Lepidoptera: Tortricidae), with keys to adults and puparia. *Zootaxa*. 938: 1-46. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.938.1.1>
- Stireman, J. O., Greeney, H. F. y L. A. Dyer. 2009. Species richness and host associations of Lepidoptera-attacking Tachinidae in the northeast Ecuadorian Andes. *Journal of Insect Science*. 9(1): 39. doi: 10.1673/031.009.3901