



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

**Análisis de supervivencia de orugas de *Heliconius erato*
(Lepidoptera: Nymphalidae) alimentadas con dieta
McMorrán para su crianza en insectarios**

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de:
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Autor

PABLO ANDRES ARIAS DUTAN

Tutora: Ph. D. Caroline Nicole Bacquet Perez

Napo – Ecuador

2023

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, Pablo Andrés Arias Dután, con documento de identidad N° 0106273824, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de ingeniería en biotecnología son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Tena, 13 de septiembre de 2023



Pablo Andrés Arias Dután

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, PABLO ANDRÉS ARIAS DUTÁN, con documento de identidad N° 0803587922, en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA DE ORUGAS DE HELICONIUS ERATO ALIMENTADAS DIETA MCMORRAN PARA SU CRIANZA EN INSECTARIOS (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE), reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiám una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiám para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación superior.

Tena, 13 de septiembre de 2023



Pablo Andrés Arias Dután

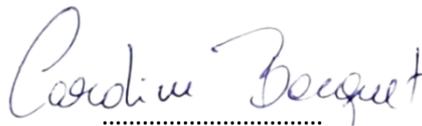
0106273824

Certificado de dirección de trabajo de integración curricular

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: “Análisis de supervivencia de orugas de *Heliconius erato* alimentadas dieta McMorran para su crianza en insectarios (Lepidoptera: Nymphalidae)”, en la modalidad de: tesis, fue realizado por: Pablo Andrés Arias Dután, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiám, para su entrega y defensa.

Tena, 13 de septiembre de 2023



Caroline Nicole Bacquet Perez

C.I: 1756861496

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mis agradecimientos a mi madre Patricia, quien han sido mi mayor motivación, a mi padre Neyver, quien siempre me ha brindado su apoyo.

De la misma manera a mi tutora, la PhD. Caroline Bacquet quien ha sido mi guía en las aulas y especialmente en este proyecto.

Agradezco también a los profesores de la carrera de Biotecnología quienes han sido claves en mi formación académica y a mis amistades por su apoyo incondicional y por todos los momentos que hemos compartido.

DEDICATORIA

A mi madre, Patricia.

ÍNDICE GENERAL

CARÁTULA	
DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	iii
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA	vi
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Planteamiento del problema	3
1.3 Justificación de la Investigación	4
1.4 Objetivos de la investigación	5
<i>General:</i>	5
<i>Específicos:</i>	5
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO	5
2.1 Desarrollo y dosificación de las dietas	5
2.2 Especímenes	7
2.3 Cuidado de las orugas	8
2.4 Análisis de datos	8
CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS	9
3.1 Población total de orugas, crecimiento máximo y supervivencia	9
3.2 Gráfica Kaplan-Meier y regresión Cox	10
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN	13
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	17
REFERENCIAS	18
ANEXOS	23

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Promedio de tamaño máximo, número de pupas y adultos de las orugas alimentadas con las distintas dietas.....	10
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 : Curva Kaplan-Meier de las distintas poblaciones de orugas alimentadas con las diferentes dietas.....	11
Figura 2: Curva de regresión de Cox de las distintas poblaciones de orugas alimentadas con las diferentes dietas.....	12

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Reactivos para la receta McMorran y la solución vitamínica que la compone.....	23
Anexo 2: Fotos de las diferentes dietas.	24
Anexo 3: Orugas en sus distintas etapas de vida.	25
Anexo 4: Orugas junto a las diferentes dietas.	26
Anexo 5: Comandos ejecutados en el entorno virtual R para la obtención de las curvas Kaplan-Meier y las curvas de la regresión Cox de los diferentes grupos de oruga ..	27

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la eficacia de la dieta McMorran como alimento sintético para la cría de *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae) en su estadio larvario. El propósito era encontrar una alternativa a la alimentación tradicional, que consiste en partes de *Passiflora punctata*, ya que hasta la fecha no se ha documentado el uso de dietas artificiales que satisfagan las necesidades nutricionales de estas mariposas. Para llevar a cabo el estudio, se diseñaron tres dietas artificiales diferentes. La primera consistió en una preparación de agar junto con partes trituradas de *P. punctata* en diferentes concentraciones. La segunda dieta fue la dieta McMorran. La tercera dieta combinó la dieta McMorran con partes trituradas de *P. punctata* en diferentes concentraciones. Se comparó el desarrollo de las larvas alimentadas con estas dietas artificiales con las larvas alimentadas de manera tradicional, utilizando zarcillos y hojas de *P. punctata* (Dt1). Posteriormente, se realizó un análisis de supervivencia de los diferentes grupos de orugas alimentadas con cada dieta utilizando el método Kaplan-Meier, junto con una regresión Cox utilizando el software RStudio®. Los resultados reflejaron que ninguna de las dietas artificiales es adecuada para la crianza de orugas de *H. erato*. Los resultados mostraron que ninguna de las dietas artificiales fue adecuada para la crianza de estas mariposas. Estos hallazgos resaltan la importancia de seguir investigando y buscando alternativas nutricionales para la cría de *H. erato*, debido a su alto valor como indicadores ecológicos y a su importancia económica.

Palabras clave: *alimentación tradicional, dieta artificial, Kaplan-Meier, nutrición, regresión Cox.*

ABSTRACT

The present investigation aimed to evaluate the efficacy of the McMorran diet as a synthetic food for the larval stage of *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae). The purpose was to find an alternative to the traditional feeding, which consists of parts of *Passiflora punctata*, as no artificial diets satisfying the nutritional needs of these butterflies have been documented to date. To conduct the study, three different artificial diets were designed. The first one consisted of an agar preparation along with crushed parts of *P. punctata* at different concentrations. The second diet was the McMorran diet. The third diet combined the McMorran diet with crushed parts of *P. punctata* at different concentrations. The development of the larvae fed with these artificial diets was compared with the larvae traditionally fed using tendrils and leaves of *P. punctata* (Dt1). Subsequently, a survival analysis of the different groups of caterpillars fed each diet was carried out using the Kaplan-Meier method, along with a Cox regression using RStudio© software. The results reflected that none of the artificial diets were suitable for rearing *H. erato* caterpillars. The findings indicated that none of the artificial diets were adequate for the breeding of these butterflies. These results highlight the importance of further research and exploration of nutritional alternatives for the rearing of *H. erato* due to their high value as ecological indicators and their economic significance.

Keyword: *artificial diet, Cox regression, Kaplan-Meier, nutrition, traditional feeding.*

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Antecedentes

Los artrópodos (del griego “*arthro*” y “*podós*”, que significa “patas articuladas”) son el grupo de animales más diverso y lo han sido desde la radiación cámbrica (hace 541 millones de años aprox.) [1]. De este gran grupo, se sabe que los insectos fueron de los primeros animales en establecerse y aprovechar los ecosistemas terrestres y de agua dulce, lo que los ha convertido en el grupo evolutivamente más exitoso y diverso de todos los reinos en cuanto a número de especies y hábitat, desde su aparición hace aproximadamente 400 millones de años [2,3]. Uno de los órdenes más diverso y conocido dentro de los insectos es Lepidoptera (del griego “*lepís*” y “*pteron*”, que significa “alas con escamas”), constituido por mariposas y polillas, siendo la región Neotropical el área con mayor abundancia y diversidad [4,5]. La diversidad excepcional de lepidópteros confiere un notable atractivo para la investigación científica, especialmente debido a que numerosas especies en este género pueden considerarse indicadores ecológicos fundamentales, reveladores de la biodiversidad y la estabilidad de los ecosistemas que constituyen su hábitat natural, esto debido a su extensa distribución en casi todos los hábitats (polos, trópicos, desiertos, montañas, prados, etc.) [6,7]. Su reconocida supervivencia se debe a un encadenamiento de adaptaciones miméticas, sistemas de defensa físicos y químicos, marcados patrones conductuales, entre otros [8].

Los insectos de la orden Lepidoptera que han sido objeto de mayor estudio son las mariposas. Esto se debe en gran medida a su alta sensibilidad a las perturbaciones en su hábitat, así como a su estabilidad, diversidad y facilidad de manejo tanto en el campo como en el laboratorio [9]. Además, presentan ciclos de vida cortos y una alta fidelidad ecológica, lo que los convierte en sistemas modelo confiables en una variedad de campos de la ecología y la evolución [9,10]. Así mismo, las mariposas han tomado relevancia económica al ser consideradas como objeto exportación global debido a su carácter ornamental y educativo [11,12]. La presencia de mariposas en un ecosistema está relacionada con el tipo de vegetación del lugar, por ejemplo, se sabe que el género *Heliconius* está estrechamente ligada con el género *Passiflora* [13–15]. Ciertos estudios sugieren que ha existido una evolución paralela entre ambos géneros causando una especialización entre sí [16]. Las larvas de la *Heliconius* se alimentan exclusivamente de la plantas del género *Passiflora*, lo que ha llevado a esta última a desarrollar estrategias de defensa contra

su consumo. Una de estas estrategias es la presencia de estructuras amarillas en sus hojas que imitan los huevos de *Heliconius*, lo que desalienta a las mariposas de depositar sus huevos en la planta y, por lo tanto, reduce la fitofagia [13,17]. También han desarrollado una amplia diversidad de compuestos químicos de defensa llamados glucósidos cianogénicos (CNgls) [15–18]. Curiosamente, las orugas de la tribu Heliconnini han desarrollado un sistema de defensa personal al secuestrar a los CNgls en su dieta [17]. Estos compuestos son liberados en forma de ácido cianhídrico, un gas altamente tóxico cuando se hidroliza en el tracto digestivo de los depredadores. De esta manera, las orugas disuaden a los depredadores de consumir tanto las larvas como adultos [19,20]. También se ha demostrado que su presencia en la dieta puede tener efectos beneficiosos para las larvas, como una mayor tasa de crecimiento, una mayor supervivencia e incluso en su comportamiento y características morfológicas [19–21]. Aunque estos compuestos se encuentran en las mariposas adultas en una mayor concentración que en las larvas, su origen metabólico en esta etapa no ha podido ser determinado con precisión [16–18,22]. Así mismo, se ha demostrado que todas las acciones defensivas de *Passiflora* a lo largo de su coevolución con *Heliconius* han dotado de una denominada plasticidad fenotípica continua especies de género *Heliconius* [15].

La investigación con mariposas puede desvelar aspectos de su hábitat y cómo las variaciones de este pueden afectar en su desarrollo. Dentro del contexto, es el caso de *Heliconius erato*. Su estudio puede ayudar en la comprensión sobre cómo los organismos se adaptan al medio conforme este cambia y si la repetibilidad de su adaptación local podría extrapolarse en la naturaleza para esclarecer si los cambios fenotípicos y genéticos son predecibles [23]. Los estudios con mariposas se los realiza en ambientes vigilados por razones de control, generalmente en insectarios. Es indudable el hecho de que el estudio requerirá de plantas hospederas pues son el eje en su ciclo de vida [24,25]. Durante los primeros estadios de su desarrollo, las larvas se alimentan de los brotes frescos de su planta hospedera y avanzan hacia hojas más maduras a medida que crecen. El tiempo que tardan en completar su metamorfosis varía según la especie, pero en general, la etapa de pupa es la más prolongada. [25]. Por otro lado, desde hace décadas se han implementado el uso de dietas sintéticas como estrategia alternativa al uso de plantas para permitir una investigación detallada de los requisitos nutritivos y la cría aséptica de poblaciones con diversos fines [26–30].

En una de las primeras dietas artificiales en el estudio de lepidópteros se utilizó agar con brotes de abeto balsámico triturado, esto para la cría de lepidópteros fitófagos del maíz,

demostrando que se desarrollaban normalmente, sin embargo, existía la presencia de hongos en la dieta [26]. Este principio se modificó posteriormente por Arlene McMorran para la cría de *Choristoneura fumiferana* añadiendo más compuestos enfocados en la nutrición de las larvas y la prevención del desarrollo de hongos y bacterias en la dieta, esto aumentó el número de sobrevivientes en cada estadio y en distintas generaciones [29]. Para 2016 la dieta McMorran había demostrado ser efectiva para la cría de 153 especies de lepidópteros fitófagos [30]. Una solución “más sencilla” también resultó ser el liofilizar una gran cantidad de la planta hospedera, congelar el polvo resultante y posteriormente rehidratarlo en distintas porciones individuales para la alimentación de las larvas, siendo efectivo para cría con fines de conservación de *Eumaeus atala* Poey [31].

En este trabajo se plantea evaluar la eficacia de la dieta McMorran como alimento sintético para la cría de *Heliconius erato* de en su estadio larvario como una alternativa al uso exclusivo de *Passiflora punctata* ya que ha demostrado ser efectivo para la cría de cientos de especies de lepidópteros. De lograrse, facilitaría en gran medida la crianza de *H. erato* en insectarios para su estudio en laboratorio, exportación o planes de conservación .

1.2 Planteamiento del problema

La cría de mariposas demanda un gran espacio, fundamentalmente porque es imperativa la presencia de plantas específicas para toda su metamorfosis, cada especie de mariposa tiene una planta hospedera o un rango limitado de plantas que son indispensables para que las larvas se alimenten y se desarrollen correctamente [32]. Para el correcto desarrollo de un estudio con mariposas, se debe poseer varias plantas hospederas de un tamaño adecuado, ya que la cantidad de orugas dispuestas al estudio está limitada por el alimento y las orugas requieren una dotación continua de brotes frescos y suaves debido a su voracidad y necesidad de los mismos [33]. Esto representa una desventaja en cuanto a requerimientos extra en mano de obra, costo y el tiempo para el mantenimiento de las plantas, además de la recolección diaria de brotes y hojas frescas, sin mencionar el espacio. Los mismos inconvenientes se presentan al momento de criar para exportación o cuando se desea cría para la conservación de una especie. Una alternativa a la alimentación natural y los ya mencionados inconvenientes podría ser la implementación de un alimento sintético que sustituya la necesidad física de la planta, cubriendo las necesidades nutricionales de las larvas y asegurando su desarrollo. A pesar de que existen varias dietas desarrolladas para la crianza de mariposas, la dieta desarrollada por Arlene McMorran se ha

mostrado muy eficaz en la crianza de 153 especies de insectos, especialmente lepidópteros fitófagos [30], siendo 30 mayor número de generaciones (*Dafnis nerii* y *Hyles galii*) criadas sin mayor dificultad [30,34]. Aunque hasta el momento no existe documentación que aborde específicamente la crianza de la tribu Heliconini mediante la dieta McMorran, es esta alimentación la que ha sido ampliamente testada en un extenso conjunto de especies de lepidópteros, otorgando así una notable facilidad al proceso de cría. Estos antecedentes atribuyen a la dieta McMorran las cualidades necesarias para emplearse como una dieta artificial para la crianza de *H. erato*.

1.3 Justificación de la Investigación

Los estudios de *H. erato* podría proporcionar conocimientos fundamentales para comprender cómo los organismos se ajustan en un entorno en constante fluctuación. Además, permitirían examinar si los patrones de adaptación pueden ser generalizados en la naturaleza, aportando así información sobre la previsibilidad de los cambios fenotípicos y genéticos. Los estudios con *H. erato* serían más constantes y rápidos si se facilitara de alguna forma el proceso investigativo. Implementar una dieta con las características nutricionales esenciales de la planta a un alimento sintético, no solo eliminaría los inconvenientes que suponen el mantenimiento de las plantas en los estudios, también permitiría evitar las enfermedades por infecciones víricas, bacterianas o fúngicas y además permitiría al investigador poder enfocarse a otros aspectos significativos de la investigación, lo que optimizaría los resultados y la investigación. Por otro lado, su estudio y crianza promueve la educación ambiental local y aumenta la conciencia sobre la importancia de los insectos y la conservación de la biodiversidad. En adición, está el gran potencial comercial del alimento sintético, ya que existen empresas dedicadas a la cría y exportación de mariposas dentro de las cuales se encuentra *H. erato*. Desarrollar un alimento sintético para esta especie podría facilitar el desarrollo de dietas para especies del mismo género y otros que siguen siendo alimentados únicamente con su hospedera, lo que lograría ampliar más el mercado.

1.4 **Objetivos de la investigación**

General:

- Evaluar el impacto de la dieta McMorran en el desarrollo de las larvas de *Heliconius erato* criadas en insectarios

Específicos:

- Comparar la preferencia alimenticia de las larvas de *H. erato* por la dieta sintética frente a su dieta natural mediante la comparación de tasa de supervivencia.
- Evaluar la necesidad de *Passiflora punctata* en la receta adicionando partes de la planta en la receta, registrando la preferencia de los especímenes por la dieta con presencia de la planta y comparando la tasa de supervivencia.
- Evaluar la salud de las orugas alimentadas con la dieta sintética en comparación con aquellas alimentadas con dieta natural mediante el registro de su movilidad como un factor de vitalidad.

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1 Desarrollo y dosificación de las dietas

Para el desarrollo de una dieta sintética adecuada se experimentó con 4 formas de alimentación (dietas) con el fin de tener un enfoque más amplio acerca de las necesidades nutricionales de las orugas. Las dietas sintéticas, al necesitar gelificación, se depositaron en recipientes limpios de plástico de $\frac{1}{4}$ de onza. La primera dieta (Dt1) consistió en la alimentación “tradicional” para las orugas que fue mediante brotes y hojas de *Passiflora punctata*. su selección y dosificación se realizó según el estadio de la oruga, su voracidad y la viabilidad de las hojas y brotes. A las orugas de primer estadio se las colocó en el recipiente de $\frac{1}{4}$ de onza junto con un zarcillo de *P. punctata* como alimento. En el segundo estadio se las colocó con las hojas más jóvenes de la planta y a partir del tercer estadio hasta el quinto con hojas más longevas de la planta. Para esta dieta se consideraron un total de 62 orugas, una mayor cantidad respecto al resto de dietas esto debido a que en durante la recolección de huevos se encontraban orugas ya eclosionadas, además se priorizó esta dieta debido a la necesidad de nuevas mariposas adultas

en el insectario. Se consideró a esta primera dieta como un control positivo.

La segunda dieta (Dt2) se elaboró con agua destilada, agar (23g/L) y *P. punctata* triturada: se calculó la cantidad de agar (g) de acuerdo a los mililitros de la dieta a preparar y en la mitad del agua destilada fría se disolvió el agar para luego pasar a baño maría. Por otro lado se pesaron distintas cantidades de hojas para ajustar la concentración de estas en la dieta (entre 5 y 35 g por cada 100ml de dieta), las hojas pesadas se lavaron con agua oxigenada al 5% y agua purificada para pasar a ser trituradas en una licuadora aséptica con la otra mitad del agua destilada, se filtró y el zumo resultante se añadió al agar en baño maría. Se calentó todo por unos diez minutos sin exceder los 60°, se mezcló continuamente procurando la homogeneidad y finalmente se depositó en recipientes limpios y se dejó gelificar. La dieta se colocó sobre la tapa del recipiente que contenía a la dieta para la dosificación a las orugas. Los recipientes contenedores de la dieta sin utilizar eran almacenados a 2°C, para su dosificación se esperó 20 min para que tomaran temperatura ambiente y se pudieran dar a las orugas sin causarles estrés térmico. Par esta dieta se consideraron un total de 40 orugas.

La tercera dieta (Dt3) fue la empleada por McMorran [29], se la preparó de acuerdo a sus ingredientes y especificaciones, se depositó en recipientes limpios y se dejó gelificar. La dieta se colocó sobre la tapa del recipiente que las contenía para su dosificación a las orugas. Los recipientes contenedores de la dieta sin utilizar eran almacenados a 2°C, para su dosificación se esperaba 20min para que tomaran temperatura ambiente y se pudieran dar a las orugas sin causarles estrés térmico. Para esta dieta se consideraron un total de 34 orugas. Los ingredientes de la dieta McMorran se pueden apreciar en el Anexo 1.

Finalmente la cuarta dieta (Dt4) consistió en añadir diferentes concentraciones de *P. punctata* (entre 5 y 35 g por cada 100ml de dieta) a la mezcla McMorran: se calculó y pesó la cantidad de ingredientes sólidos contenidos en la dieta McMorran de acuerdo a la cantidad de mililitros de dieta a preparar. Se disolvió los ingredientes sólidos en la mitad del agua destilada requerida a baño maría. Por otro lado se pesaron distintas cantidades de hojas para ajustar la concentración de estas en la dieta, esto de manera variable. Las hojas pesadas se lavaron con agua oxigenada al 5% y agua purificada para pasar a ser trituradas en una licuadora aséptica con la otra mitad del agua destilada, se filtró y el zumo resultante se añadió a la parte líquida de la dieta McMorran. Se homogenizó y se añadió el producto en baño maría en baño maría. Se calentó todo por unos diez minutos sin exceder los 60°, se mezcló continuamente procurando la

homogeneidad y finalmente se depositó en recipientes limpios y se dejó gelificar. La dieta se colocó sobre la tapa del recipiente que las contenía para la dosificación a las orugas. Los recipientes contenedores de la dieta sin utilizar eran almacenados a 2°C, para su dosificación se esperó 20 min para que tomaran temperatura ambiente y se pudieran dar a las orugas sin causarles estrés térmico. Para esta dieta se consideraron un total de 38 orugas.

A cada oruga que se alimentó de una dieta sintética (dietas de la 2 a la 4) se le dosificó un aproximado de 2 cm^3 de la misma, esto principalmente debido a las dimensiones de los recipientes que contenían a las orugas y además para evitar el desperdicio de dieta ya que el cambio de la dieta de lo realizó diariamente para todas las orugas alimentadas con la dieta artificial. Asimismo todos los días se dio seguimiento y limpieza a los recipientes que contenían a las orugas con las distintas dietas para cuidar la sepsis y evitar enfermedades en las mismas. Las anotaciones diarias evaluaron visualmente la cantidad de dieta consumida por las orugas, su vitalidad, tamaño, mortalidad y tiempo que tardan en estado larvario. Con la mariposa en su etapa adulta se visualizó su morfología en busca de anomalías y se las llevó al mariposario de la universidad para que continuaran reproduciéndose con sus congéneres silvestres. Una foto de cada dieta puede encontrarse en el Anexo 2.

2.2 Especímenes

El trabajo se desarrolló con el permiso correspondiente emitido por el Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica con número de contrato: “ MAATE-DBI-CM-2021-0176” bajo el proyecto: “Diversidad y genómica de las adaptaciones morfológicas y de comportamiento en mariposas miméticas”.

Las mariposas parentales del género *Heliconius erato* para este trabajo eran parte del mariposario de la Universidad Regional Amazónica Ikiam en la ciudad de Tena-Ecuador bajo el proyecto ya mencionado, estas mariposas en un principio se colectaron en Alto Tena y los alrededores de la Universidad. Tras su traslado al mariposario se les proporcionó alimento y plantas hospederas para que a lo largo de su interacción reproductiva estas puedan depositar sus huevos. Los huevos recolectados provenían de la interacción de adultos tanto silvestres como criados en cautiverio. La cantidad de machos y hembras parentales no se sabe con exactitud ya que el mariposario no contaba con un registro detallado del género. De manera constante, estos huevos fueron recolectados y separados en grupos (Dt1, Dt2, Dt3 y Dt4) y de manera individual en recipientes limpios de plástico transparente de ¼ de onza para las larvas en estadios más

tempranos y de ½ litro para aquellas en estadio más próximos a pupa, esto para su comodidad y además para una mejor visualización de su comportamiento y desarrollo. La variación en el número de orugas dispuestas para cada dieta fue debido a que durante la separación de huevos algunos no eclosionaron causando bajas en la población designada a las distintas dietas en cada colecta. Se puede apreciar a las orugas en sus distintos estadios en el Anexo 3.

2.3 Cuidado de las orugas

Cada oruga acogida en los recipientes de plástico transparente fue atendida de manera diaria una o dos veces. Primero se retiró cuidadosamente a la oruga con un palillo de dientes previamente tratado con agua oxigenada al 10% y se la colocó en un nuevo zarcillo u hoja que se depositó sobre una superficie tratada con cloro comercial diluido al 2%. Para el caso de las dietas artificiales, se colocó las dietas sobre papel filtro limpio y se colocó a la oruga sobre la dieta. Se puede apreciar a las orugas y sus dietas en el Anexo 4. Con la oruga y su dieta fuera, el recipiente de plástico que las contenía era vaciado de los desechos de la oruga y restos de planta o dieta sin consumir para luego ser tratado con una atomización de cloro comercial diluido al 2% y una toalla de papel. Una vez limpio y seco la oruga se depositó junto con su dieta. Los recipientes de ¼ de onza y ½ litro que ya habían sido utilizados y despojados de desechos mayúsculos, se los dejó en remojo durante 24 horas en un agua común con cloro comercial (2% v/v) . Una vez transcurrido este tiempo se retiraron los recipientes y se los dejó en remojo en agua común sin cloro durante 2 horas, luego se retiraron y se dejaron secar sobre una superficie limpia para su reutilización.

2.4 Análisis de datos

Los datos recolectados fueron sometidos a un análisis de supervivencia mediante el método Kaplan-Meier en conjunto con una regresión Cox con ayuda del software RStudio 3.3.0+ © [35]. El primer método modela la probabilidad estimada de supervivencia a partir de los tiempos de eventos y las censuras mientras que el segundo utiliza los eventos y las censuras para establecer un factor de riesgo mediante variables predictoras para reflejar cómo estas afectan la tasa de riesgo de experimentar el evento a lo largo del tiempo y predecir la supervivencia, más allá de los datos observados [36]. Estos métodos se han usado ampliamente en varios campos, incluidos la estimación de la supervivencia de insectos bajo diferentes criterios [37–41]. Para este trabajo se consideró como “evento” la muerte de una oruga y como “censura” el término de los estadios larvarios de la oruga y el término de su estadio pupal en días. Cabe recalcar que dentro

de RStudio 3.3.0+ © las funciones reconocen el estado de “evento” como “1” y el estado de “censura” como “0” por lo que cuando una oruga murió o no emergió de su estadio pupal se registró con un “1” y cuando haya completado sus estadios larvarios o terminado su estadio pupal con un “0”. Los datos se almacenaron en un documento de Excel con las variables: “oruga”, “tiempo de vida larvario” en días, “tiempo de vida pupal” en días, “pupa” como estado de censura o evento y “adulto” de igual manera como estado de censura o evento. Para este trabajo, estos métodos requieren una consideración únicamente de las variables y de su asignación como evento o censura pues se trabaja con los tiempos de supervivencia y los eventos ocurridos mas no se hacen suposiciones sobre la distribución de los datos subyacentes ya que el objetivo de los modelos para este trabajo es el análisis de supervivencia simple con datos de censuras y evento para describir curvas y asociaciones.

Dentro del entorno virtual RStudio 3.3.0+ ©, los datos en formato Excel se importaron al software y se procedió con la ejecución de comandos. Se consideraron los paquetes: “readxl”, “survival”, “lubridate”, “ggpubr”, “ggplot2” y “survminer” para el análisis de datos [35]. Los comandos que se ejecutaron dentro del software para la obtención de las gráfica Kaplan-Meier y la regresión Cox pueden visualizarse en el Anexo 5. Adicionalmente, de otro documento Excel donde se colectaron datos de medición diarios de cada oruga individual, se realizó un promedio del tamaño máximo y supervivencia total alcanzado por las orugas de cada grupo, esto con la fórmula de promedio propia del Software Excel 2021©.

CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

3.1 Población total de orugas, crecimiento máximo y supervivencia

En total, se trabajó con 174 orugas, la descripción en cuanto al número de orugas alimentadas con cada dieta, su promedio de vida, el promedio máximo de tamaño, la cantidad de pupas, adultos y el porcentaje de supervivencia se pueden apreciar en la Tabla 1. Las orugas alimentadas con las dietas artificiales Dt2, Dt3 y Dt4 no sobrevivieron a su primer estadio por lo que no alcanzaron la pupa ni su adultez, mientras que las alimentadas con dieta natural sobrevivieron hasta la etapa adulta un 1,61% por debajo de la mitad de su población total. Las dietas artificiales que se les presentó a las orugas en su respectivo recipiente presentaron ligeras

mordidas, lo cual es un claro indicador de que las orugas si se estuvieron alimentando de las distintas dietas, sin embargo, ninguna oruga que se alimentó con las dietas artificiales sobrevivió más allá de 7 días. Adicionalmente, es posible visualizar la diferencia en la cantidad de larvas alimentadas con las distintas dietas debido a que algunos de los huevos (separados previamente en grupos destinados a las diferentes dietas) no eclosionaron, además de otros factores ya mencionados en el marco metodológico. Por otro lado, tampoco existió una diferencia visual significativa en la cantidad de dieta artificial ingerida por las orugas entre los diferentes grupos, pues las mordidas se presentaban de igual manera en los bordes de las dietas y en una cantidad y dispersión similar.

Tabla 1: Promedio de tamaño máximo, número de pupas y adultos de las orugas alimentadas con las distintas dietas.

Dieta	Orugas	Promedio de tamaño máx. (cm)	Pupas	Adultos	Supervivencia (%)
Dt1	62	2.53	33	30	48,39
Dt2	40	0.56	0	0	0
Dt3	34	0.54	0	0	0
Dt4	38	0.52	0	0	0
Total de orugas	174			Supervivencia total	17.24

Realizado por: Andrés Arias

3.2 Gráfica Kaplan-Meier y regresión Cox

Dentro de la Figura 1 se puede apreciar la probabilidad de supervivencia de cada grupo de orugas a lo largo del tiempo bajo los parámetros Kaplan-Meier, siendo el grupo alimentado con Dt1 el único que alcanzó el estado de pupa y además que el estimado de supervivencia de este grupo al alcanzar este estado está sobre el 40%, en contraste con el resto de grupos cuyo estimado final es de 0% sin alcanzar el estado de pupa. En la gráfica se observa una sección de color atenuado en torno a las respectivas curvas Kaplan-Meier de cada grupo de orugas, esta se denomina intervalo de confianza y representa los límites en donde la curva debería encontrarse para que se considere confiable. La interacción entre las curvas de todos los grupos es muy cercana hasta antes del día cinco en donde la probabilidad de supervivencia es superior al 75%.

Adicionalmente, la probabilidad media de supervivencia entre los grupos alimentados con Dt2, Dt3 y Dt4 es cercana entre sí (entre 4 y 5 días).

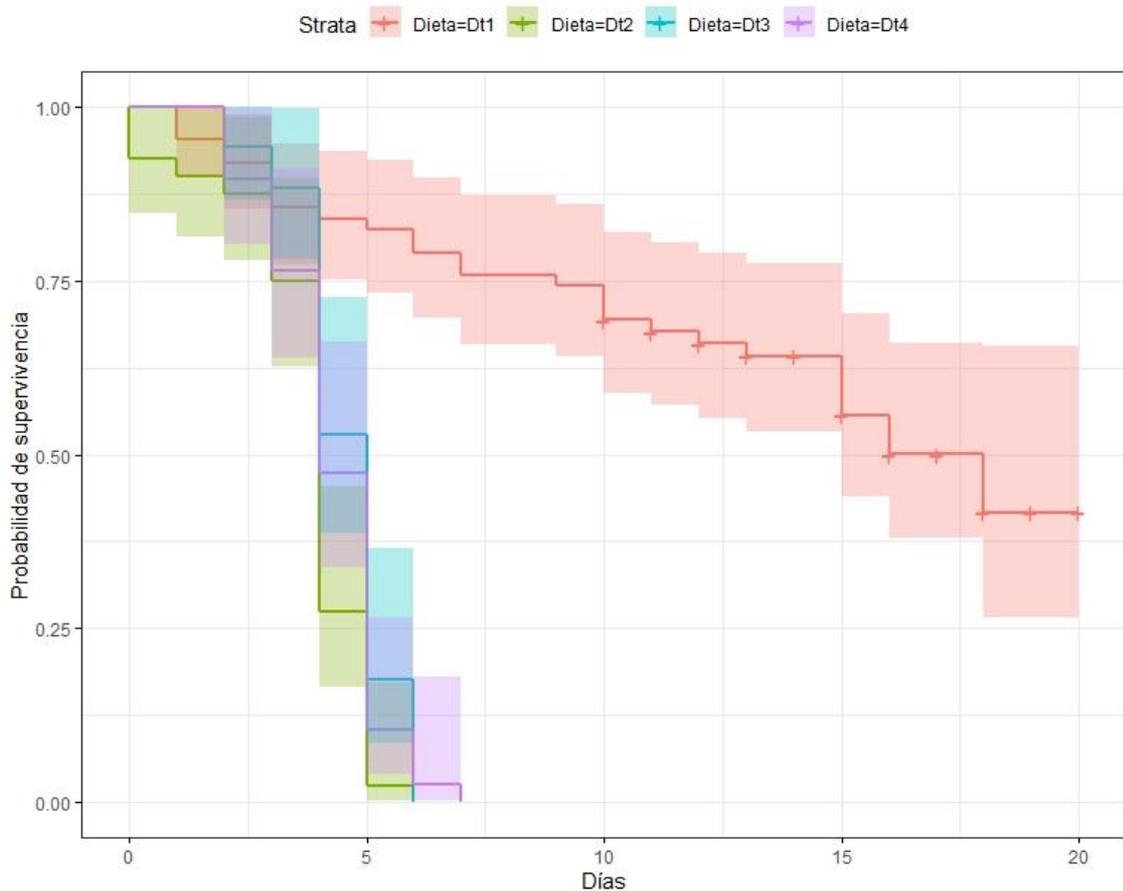


Figura 1: Curva Kaplan-Meier de las distintas poblaciones de orugas alimentadas con las diferentes dietas.

Realizado por: Andrés Arias

La gráfica de la regresión Cox generada con los datos de las orugas alimentadas con los diferentes tipos de dieta se puede apreciar en la Figura 2. Aquí, es evidente que la estimación de la tasa de supervivencia de los grupos alimentados con las dietas artificiales va más allá de los datos reales ajustándose al máximo de días de las orugas alimentadas con dieta natural, además de que se adiciona en la curva predictoría el estado de pupa (+) aun cuando la tasa de supervivencia es del 0%. Esta extrapolación de la supervivencia más allá de los límites de los datos observados es una característica inherente del modelo. Las tasas de supervivencia aumentan para todos los grupos desde el primer día y la cercanía entre las curvas de los grupos de orugas alimentadas con Dt2, Dt3 y Dt4 parecen acercarse entre sí y no poseen interacción con la curva de orugas alimentadas con Dt1.

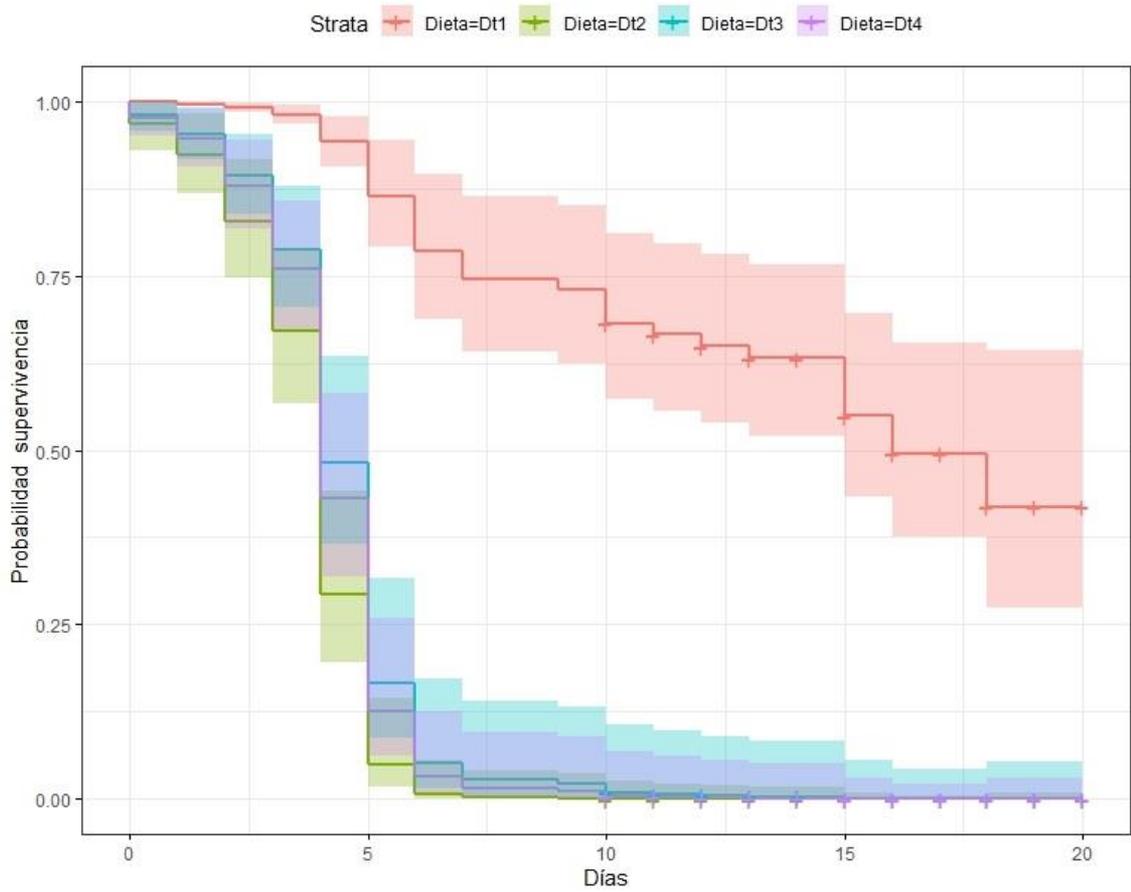


Figura 2: Curva de regresión de Cox de las distintas poblaciones de orugas alimentadas con las diferentes dietas.

Realizado por: Andrés Arias

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

La dieta común de los lepidópteros fitófagos cumple con requisitos nutricionales fundamentales para su correcto desarrollo durante sus etapas de vida. Dentro de estos requisitos pueden abarcarse factores químicos determinados por el metabolismo de la planta o físicos como la textura, estos factores pueden influir en el comportamiento alimentario normal del insecto [42]. A lo largo del trabajo se ha establecido la estrecha relación que *Heliconius erato* ha desarrollado con *Passiflora punctata*, por lo que dentro de los factores químicos clave en la supervivencia de las larvas podrían ejemplificarse a los CNgls. No obstante, se ha demostrado que las orugas de la tribu Heliconini pueden biosintetizar independientemente de su dieta determinados CNgls [18,43]. Esto sugiere que en el curso de la interacción entre *Passiflora* y *Heliconius*, es posible que *Passiflora* haya experimentado una diversificación en su perfil cianogénico como una estrategia evolutiva para evadir la herbivoría por parte de *Heliconius*, consiguiendo que los nuevos CNgls sean secuestrados por las larvas ampliando su arsenal químico de defensa e intensificando su supervivencia [16,18,43,44]. En otras palabras, la capacidad de *H. erato* para alimentarse de plantas con presencia de CNgls es una derivación de su capacidad de biosintetizarlos mas no una necesidad específica en su dieta. Dos de las dietas sintéticas empleadas en este experimento consideraron la presencia de la planta en su elaboración. En un principio se especuló que las larvas tendrían una mayor preferencia por estas dietas, esencialmente, por la presencia de estos CNgls. En un estudio que evaluó glicósidos de iridoide (un CNgls para evitar la herbivoría) en dietas artificiales, las larvas respondieron positivamente a la presencia de estos, presentando un mejor desarrollo al ingerir las dietas que los contenían [45]. Contrariamente, las orugas de *H. erato* no desarrollaron una preferencia visualmente significativa comparable entre las dietas artificiales de este trabajo, aunque las orugas que se alimentaron con Dt4 sobrevivieron un par de días más. Se presume que todas las larvas alimentadas con una dieta artificial lograron únicamente un desarrollo parcial debido a sus reservas energéticas.

Así mismo es posible que el tratamiento térmico de la *Passiflora p.* pudiera haber influido en la cantidad y calidad de los nutrientes que esta aportaría a las dietas. Si bien no hay estudios que evalúen la pérdida de nutrientes por calentamiento en la elaboración de dietas para lepidópteros fitófagos, se sabe que algunas plantas pueden perder nutrientes al calentarse. El calentamiento de las plantas puede tener varios efectos como la pérdida de nutrientes volátiles,

degradación de proteínas y degradación de compuestos orgánicos, lo que a su vez afectaría la digestibilidad de los alimentos [46–48]. No obstante se conoce además que existen compuestos bastante estables frente a la cocción prolongada tales como los minerales, algunos carbohidratos y grasas [49,50]. Debido a la escasa información al respecto del tratamiento térmico de plantas, no se podría afirmar con certeza los nutrientes que la planta perdería en este escenario específico.

Por otro lado, se creyó que posiblemente el rechazo de las orugas por las dietas artificiales se debió a otro de los factores que pueden afectar la alimentación: la textura. Visiblemente la textura de las hojas de *P. punctata* es diferente de la textura de las dietas sintéticas, cuya robustez estuvo definida por la concentración de agar, siendo esta última, lo suficientemente blanda para no interferir con la capacidad morfológica de las larvas recién eclosionadas para su alimentación [15].

El crecimiento, el mantenimiento de los tejidos, la reproducción y la obtención de energía en un organismo se vinculan con la nutrición, que se refiere a la ingesta de sustancias químicas [51]. Esencialmente, los factores a considerar para el desarrollo de una dieta artificial que cumplan estos criterios son la presencia de carbohidratos y lípidos, que funcionan como fuentes de energía y para la síntesis de grasas y glucógeno; la presencia de proteínas, como fuente de aminoácidos; y la presencia de vitaminas, precursores coenzimáticos imperativos en el metabolismo central [52]. Aparentemente la dieta McMorran cubre con todos estos requerimientos esenciales ya que ha sido desarrollada en torno a las necesidades nutricionales intrínsecas de un lepidóptero, sin embargo las orugas no pudieron completar un estadio con esta ni ninguna otra dieta artificial probada en este trabajo. Hasta el momento no existe documentación que aborde específicamente la crianza de la tribu Heliconnini mediante la dieta McMorran por lo que no existen parámetros comparables dentro de las necesidades nutricionales de la tribu Heliconnini.

Tras su eclosión, las orugas se notaron curiosas con respecto a las dietas Dt2, Dt3 y Dt4, las señales de mordeduras alrededor de las dietas fueron visibles pero estas no vivieron más de 6 días. Esto puede significar que uno o más criterios fundamentales de las necesidades nutricionales de *H. erato* no se están cumpliendo en la dieta McMorran y que la adición de la planta a la dieta no necesariamente proporciona un estímulo a la alimentación ya que una de las dietas artificiales no contaba con la presencia de la planta, sin embargo, las larvas se alimentaban

de esta. Los carbohidratos, lípidos, proteínas y vitaminas incluidas en la dieta artificial no pudieron ser aprovechados por las orugas lo que ocasionalmente les causo muerte por inanición. Se ha establecido que durante su proceso de alimentación, las orugas liberan saliva que contiene compuestos capaces de ser reconocidos por las plantas. Estos componentes cumplen la función de señalizadores, lo que puede resultar en la inducción o supresión de respuestas defensivas en las propias plantas [53–56], por lo que la interacción de la saliva con la planta podría aportar información química a la oruga acerca de si la hoja se encuentra en un estado óptimo para ser consumida y, debido a que la hoja pudo haber sufrido la pérdida de esta información química durante la trituración de las hojas o durante su tratamiento térmico, la oruga rechazó el alimento debido a su interpretación química (desfavorable) de la dieta.

Ahora bien, un notable número de las orugas que se alimentaron con zarcillos y hojas de *P. punctata* pudieron completar todos sus estadíos, sin embargo varias de las orugas murieron durante alguno de sus estadíos o no emergieron de las pupas. Todas las orugas que murieron en la etapa larvaria presentaron una coloración más oscura en sus tegumentos y una aparente desintegración de los mismos. Esta característica forma de deceso coincide con la poliedrosis citoplásmica, un padecimiento de transmisión principalmente oral producida por virus del género *Cypovirus* [57]. Los virus que causan esta patología se encuentran en los suelos y pueden prevalecer durante años ya que se encuentran protegidos por estructuras cristalinas llamadas cuerpos de inclusión (“OBs”, del inglés “occlusion bodies”). Estas estructuras están formadas por agregaciones de una proteína llamada poliedrina, que los protege de los rayos UV, degradación bacteriana y cambios bruscos de pH [57–59]. Los OBs son movidos hacia las hojas de las plantas hospederas por el viento o lluvia en donde son ingeridos por los insectos fitófagos [60]. Al no considerarse la presencia de estos agentes patogénicos en *P. punctata*, no se tomaron acciones desinfectantes. Tampoco se encontraron protocolos que sugieran la desinfección de hojas o zarcillos antes de proveérselo a las orugas, aunque si se sabe que los OBs pueden ser degradados en condiciones de elevada alcalinidad [57].

Así mismo, existieron 4 pupas que no pudieron emerger. El no poder emerger de la pupa se entiende como una falla en la metamorfosis y pudo deberse a factores ambientales desfavorables, lesiones o daños durante la pupación o enfermedad pues se ha visto que estos y otros factores pueden impedir la metamorfosis de otros lepidópteros [61,62]. Visiblemente las pupas que no emergieron no mostraron un cambio en su coloración o morfología durante el tiempo promedio de pupa en contraste con las que si emergieron. Posiblemente ocurrió una

lesión o estrés durante la manipulación ya que las pupas eran movidas solo un par de días tras su formación. Adicionalmente, las larvas que lograron completar su metamorfosis no presentaron ningún tipo de anomalías en su etapa adulta lo que sugiere que la dieta natural para este caso, resultó la más adecuada para la crianza de *Heliconius erato*.

La gráfica de desarrollo de los diferentes grupos (Figura 1) es clara en cuanto a que las dietas artificiales no sirven para la crianza de *Heliconius erato*, o al menos, esta dieta no cumple con las necesidades nutricionales de las orugas. Para que una dieta artificial pueda llegar a considerarse óptima, se esperaría que la curva de supervivencia de las orugas alimentadas con la dieta artificial se aproximara a la proyección de la curva del grupo de orugas alimentadas con su dieta natural, o al menos estuviera dentro de los límites del intervalo de confianza

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se determinó que una comprensión general de los requerimientos nutricionales esenciales en la dieta de los insectos fitófagos parece ser el mejor camino para el desarrollo de una dieta artificial, sin embargo, el conocer la relación entre el insecto y su planta hospedera parece ser más importante ya que podrían existir un nutriente desconocido dentro de la planta o a su vez un estimulante químico de la fitofagia. La mayor mortalidad ocurrió luego de los cinco días de iniciada la vida de las orugas que se alimentaron con las dietas sintéticas finiquitando la posibilidad de considerar las dietas artificiales empleadas en este trabajo como una opción para la cría de *H. erato* en insectarios. El éxito en el desarrollo de una dieta artificial para la crianza de *H. erato* en cautiverio podría estar en la elaboración de un perfil nutricional detallado de la especie, además, este podría extrapolarse a otras especies del género *Heliconius* y debido a su proximidad taxonómica las modificaciones nutricionales necesarias en la dieta podrían ser mínúsculas, facilitando así la adaptación de la dieta para sus congéneres. El desarrollo de un alimento sintético para la crianza de *H. erato* podría evitar en cierta medida la mortandad de las orugas, ya que la sepsis del alimento es controlable, no obstante haría falta un estudio de alimentación con varias generaciones para elucidar anomalías morfológicas o de comportamiento. Por otra parte, la cría en cautiverio de *H. erato* con hojas y zarcillos de *P. punctata* debería considerar la desinfección de dichas partes de la planta para evitar así la poliedrosis citoplasmática o cualquier otra enfermedad que pudiera ser causada por la presencia de algún agente patogénico en la superficie de la planta.

REFERENCIAS

1. Giribet G, Edgecombe GD. Reevaluating the Arthropod Tree of Life. *Annu Rev Entomol.* 2012;57: 167–186. doi:10.1146/annurev-ento-120710-100659
2. Zumbado M, Azofeifa Daniela. Insectos de importancia agrícola. Guía básica de entomología. 1st ed. Programa Nacional de Agricultura Orgánica (PNAO), Corporardis SA, editors. MAG; 2018. Available: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/H10-10951.pdf>
3. Engel MS, Grimaldi DA. New light shed on the oldest insect. *Nature.* 2004;427: 627–630. doi:10.1038/nature02291
4. Villalobos A, Agudelo J, Salazar J. MARIPOSAS (LEPIDOPTERA: PAPILIONOIDEA) DE UN BOSQUE TROPICAL EN LA CUENCA DEL RÍO PLAYONERO, ANDES NORORIENTALES DE COLOMBIA. *Folia Entomológica Mexicana (Nueva Serie).* 2020;6: 64–76. Available: <https://revistas.acaentmex.org/index.php/fofia/article/download/78/76/99>
5. Lazzeri M, Bar M, Pieri M. Diversidad del orden Lepidoptera (Hesperioidea y Papilionoidea) de la ciudad Corrientes, Argentina. *Rev Biol Trop.* 2011;59: 299–308.
6. Blair R. BIRDS AND BUTTERFLIES ALONG AN URBAN GRADIENT: SURROGATE TAXA FOR ASSESSING BIODIVERSITY? *Ecological Applications.* 1999;9: 164–170. doi:[https://doi.org/10.1890/1051-0761\(1999\)009\[0164:BABAAU\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(1999)009[0164:BABAAU]2.0.CO;2)
7. KRISTENSEN NP, SCOBLE MJ, KARSHOLT O. Lepidoptera phylogeny and systematics: the state of inventorying moth and butterfly diversity. *Zootaxa.* 2007;1668: 699–747. doi:10.11646/zootaxa.1668.1.30
8. Orta S. C, Reyes-Agüero JA, Luis-Martínez MA, Muñoz-Robles CA, Méndez C. H. Mariposas bioindicadoras ecológicas en México. Artículo de revisión. *ACTA ZOOLOGICA MEXICANA (NS).* 2022; 1–33. doi:10.21829/azm.2022.3812488
9. Flores J, Saldivar D, Rigby K, Murillo Y. Inventario de mariposas diurnas en agroecosistemas tropicales como bioindicadores de la calidad ambiental. *Revista Torreón Universitario.* 2021;10: 92–107. doi:10.5377/torreon.v10i27.10843
10. GÓMEZ J. Generalización en las interacciones entre plantas y polinizadores. *Revista chilena de historia natural.* 2002;75. doi:10.4067/S0716-078X2002000100010
11. Cornejo D. Especial Microglobales: la vuelta al mundo en envase chico. 4 Jun 2012. Available: <https://www.americaeconomia.com/negocios-industrias/especial-microglobales-la-vuelta-al-mundo-en-envase-chico>. Accessed 11 May 2023.
12. Gómez R. Plan de manejo propuesto para la cría de mariposas promisorias como alternativa productiva para comunidades indígenas de la Amazonia colombiana. *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa.* 2006; 451–460. Available: http://sea-entomologia.org/Publicaciones/PDF/BOLN38/451_460BolnSEA38EAMariposasColombia.pdf
13. Benson WW, Brown KS, Gilbert LE. Coevolution of plants and herbivores: passion flower butterflies. *Evolution (N Y).* 1975;29: 659–680. doi:10.1111/j.1558-5646.1975.tb00861.x
14. Sáenz P, Morales C, Quevedo V, Calixta M. Estrategia de manejo para la

- comunidad de mariposas en el área mitigada en el antiguo cause del río Bayamón de la reserva natural Ciénaga Las Cucharillas. *Perspectivas en Asuntos Ambientales*. 2013;2: 82–93.
15. Millan C, Fornel R, Moreira GRP. Plasticidad fenotípica en mandíbulas de *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae) inducida por diferentes plantas hospederas (Passifloraceae). *Rev Colomb Entomol*. 2018;44: 273–282. doi:10.25100/socolen.v44i2.7331
 16. Pinheiro de Castro ÉC, Demirtas R, Orteu A, Olsen CE, Motawie MS, Zikan Cardoso M, et al. The dynamics of cyanide defences in the life cycle of an aposematic butterfly: Biosynthesis versus sequestration. *Insect Biochem Mol Biol*. 2020;116: 103259. doi:10.1016/j.ibmb.2019.103259
 17. de Castro ÉCP, Zagrobelny M, Cardoso MZ, Bak S. The arms race between heliconiine butterflies and *Passiflora* plants – new insights on an ancient subject. *Biological Reviews*. 2018;93: 555–573. doi:10.1111/brv.12357
 18. Pinheiro de Castro ÉC, Zagrobelny M, Zurano JP, Zikan Cardoso M, Feyereisen R, Bak S. Sequestration and biosynthesis of cyanogenic glucosides in passion vine butterflies and consequences for the diversification of their host plants. *Ecol Evol*. 2019;9: 5079–5093. doi:10.1002/ece3.5062
 19. Nahrstedt A, Davis RH. Occurrence, variation and biosynthesis of the cyanogenic glucosides linamarin and lotaustralin in species of the Heliconiini (Insecta: Lepidoptera). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. 1983;75: 65–73. doi:https://doi.org/10.1016/0305-0491(83)90041-X
 20. Petschenka G, Wagschal V, von Tschirnhaus M, Donath A, Dobler S. Convergently Evolved Toxic Secondary Metabolites in Plants Drive the Parallel Molecular Evolution of Insect Resistance. *Am Nat*. 2017;190: S29–S43. doi:https://doi.org/10.1086/691711
 21. Browell L, Edmunds M, Moffit C. Cardenolide content and palatability of a population of *Danaus chrysippus* butterflies from West Africa. *Journal of Entomology*. 1975;49: 97–108.
 22. Cardoso MZ. The effect of cyanogenic glucosides and their breakdown products on predation by domestic chicks. *Chemoecology*. 2020;30: 131–138. doi:10.1007/s00049-020-00304-6
 23. Montejo-Kovacevich G, Meier JI, Bacquet CN, Warren IA, Chan YF, Kucka M, et al. Repeated genetic adaptation to altitude in two tropical butterflies. *Nat Commun*. 2022;13: 4676. doi:10.1038/s41467-022-32316-x
 24. DeVries PJ. *The Butterflies of Costa Rica and their Natural History*. Papilionidae, Pieridae, Nymphalidae. Princeton University Press. 1988;43: 99. Available: www.persee.fr/doc/revec_0249-7395_1988_num_43_1_6567_t1_0099_0000_2
 25. Wink M. Plant Secondary Metabolites Modulate Insect Behavior-Steps Toward Addiction? *Front Physiol*. 2018;9. doi:10.3389/fphys.2018.00364
 26. WELLINGTON EF. Artificial Media for Rearing some Phytophagous Lepidoptera. *Nature*. 1949;163: 574–574. doi:10.1038/163574a0
 27. Stehr G. A Laboratory Method for Rearing the Spruce Budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.), (Lepidoptera: Tortricidae). *Can Entomol*. 1954;86: 423–428. doi:10.4039/Ent86423-9
 28. Berger R. Laboratory techniques for rearing *Heliothis* species on artificial medium. *US Dep Agric*. 1963; 1–4. Available: <https://archive.org/details/laboratorytechni84berg/page/n1/mode/2up>
 29. McMorran A. A Synthetic Diet for the Spruce Budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera: Tortricidae). *Can Entomol*. 1965;97: 58–62.

- doi:10.4039/Ent9758-1
30. Hervet VAD, Laird RA, Floate KD. A Review of the McMorran Diet for Rearing Lepidoptera Species With Addition of a Further 39 Species. *Journal of Insect Science*. 2016;16: 19. doi:10.1093/jisesa/iev151
 31. Braatz E, Sincage J, Gezon ZJ, Maynard LT, Ardente A, Savage A, et al. A modified diet to support conservation of the *Atala* hairstreak butterfly (*Eumaeus atala* Poey). *Zoo Biol*. 2021;40: 429–435. doi:10.1002/zoo.21628
 32. RODRIGUES D, MOREIRA GRP. Geographical variation in larval host-plant use by *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae) and consequences for adult life history. *Brazilian Journal of Biology*. 2002;62: 321–332. doi:10.1590/S1519-69842002000200016
 33. Rodrigues D, Moreira G. Feeding preference of *Heliconius erato* (Lep.: Nymphalidae) in relation to leaf age and consequences for larval performance. *JOURNAL-LEPIDOPTERISTS SOCIETY*. 1999;53: 108–113. Available: [https://images.peabody.yale.edu/lepsoc/jls/1990s/1999/1999-53\(3\)108-Rodrigues.pdf](https://images.peabody.yale.edu/lepsoc/jls/1990s/1999/1999-53(3)108-Rodrigues.pdf)
 34. Retnakaran A, Grisdale D, Percy J. Regulation of juvenile hormone metabolism in the oleander hawkmoth, *Deilephila nerii* (L.). *Comp Biochem Physiol A Physiol*. 1985;82: 117–124. doi:10.1016/0300-9629(85)90714-5
 35. RStudio Team. *RStudio: Integrated Development for R*. Boston: RStudio; 2023. Available: <http://www.rstudio.com/>
 36. Clark TG, Bradburn MJ, Love SB, Altman DG. *Survival Analysis Part I: Basic concepts and first analyses*. *Br J Cancer*. 2003;89: 232–238. doi:10.1038/sj.bjc.6601118
 37. Hemerik L, Bianchi F, van de Wiel I, Fu D, Zou Y, Xiao H, et al. Survival analysis of brown plant hoppers (*Nilaparvata lugens*) in rice using video recordings of predation events. *Biological Control*. 2018;127: 155–161. doi:10.1016/j.biocontrol.2018.08.023
 38. Ma Z. A unified survival-analysis approach to insect population development and survival times. *Sci Rep*. 2021;11: 8223. doi:10.1038/s41598-021-87264-1
 39. Boff S, Scheiner R, Raizer J, Lupi D. Survival rate and changes in foraging performances of solitary bees exposed to a novel insecticide. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2021;211: 111869. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111869
 40. Malekera MJ, Acharya R, Mostafiz MM, Hwang H-S, Bhusal N, Lee K-Y. Temperature-Dependent Development Models Describing the Effects of Temperature on the Development of the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Insects*. 2022;13: 1084. doi:10.3390/insects13121084
 41. Martins Filho S, Duarte ML, Venzon M. Survival Analysis of the Green Lacewing, *Chrysoperla externa* (Hagen) Exposed to Neem-Based Products. *Agriculture*. 2023;13: 292. doi:10.3390/agriculture13020292
 42. Vanderzant ES. Development, Significance, and Application of Artificial Diets for Insects. *Annu Rev Entomol*. 1974;19: 139–160. doi:10.1146/annurev.en.19.010174.001035
 43. Mattila ALK, Jiggins CD, Opedal ØH, Montejo-Kovacevich G, Pinheiro de castro ÉC, McMillan WO, et al. Evolutionary and ecological processes influencing chemical defense variation in an aposematic and mimetic *Heliconius* butterfly. *PeerJ*. 2021;9: e11523. doi:10.7717/peerj.11523
 44. Zagrobelny M, Jensen MK, Vogel H, Feyereisen R, Bak S. Evolution of the Biosynthetic Pathway for Cyanogenic Glucosides in Lepidoptera. *J Mol Evol*. 2018;86: 379–394. doi:10.1007/s00239-018-9854-8
 45. Bowers MD. The role of iridoid glycosides in host-plant specificity of

- checkerspot butterflies. *J Chem Ecol.* 1983;9: 475–493.
doi:10.1007/BF00990220
46. ITO H, KIKUZAKI H, UENO H. Effects of Cooking Methods on Free Amino Acid Contents in Vegetables. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2019;65: 264–271. doi:10.3177/jnsv.65.264
 47. Palermo M, Pellegrini N, Fogliano V. The effect of cooking on the phytochemical content of vegetables. *J Sci Food Agric.* 2014;94: 1057–1070. doi:10.1002/jsfa.6478
 48. Reddy MB, Love M. The Impact of Food Processing on the Nutritional Quality of Vitamins and Minerals. 1999. pp. 99–106. doi:10.1007/978-1-4615-4853-9_7
 49. Mueller HR. The Effect of Industrial Handling on Micronutrients. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 1990;36: S47–S55. doi:10.3177/jnsv.36.4-SupplementI_S47
 50. Severi S, Bedogni G, Zoboli GP, Manzieri AM, Poli M, Gatti G, et al. Effects of home-based food preparation practices on the micronutrient content of foods. *European Journal of Cancer Prevention.* 1998;7: 331–335. doi:10.1097/00008469-199808000-00009
 51. Chapman RF. *The Insects. Structure and function.* 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1998.
 52. Friend WG. Nutritional Requirements of Phytophagous Insects. *Annu Rev Entomol.* 1958;3: 57–74. doi:10.1146/annurev.en.03.010158.000421
 53. Peiffer M, Felton GW. The host plant as a factor in the synthesis and secretion of salivary glucose oxidase in larval *Helicoverpa zea*. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2005;58: 106–113. doi:10.1002/arch.20034
 54. Tian D, Peiffer M, Shoemaker E, Tooker J, Haubruge E, Francis F, et al. Salivary Glucose Oxidase from Caterpillars Mediates the Induction of Rapid and Delayed-Induced Defenses in the Tomato Plant. *PLoS One.* 2012;7: e36168. doi:10.1371/journal.pone.0036168
 55. Chuang W-P, Ray S, Acevedo FE, Peiffer M, Felton GW, Luthe DS. Herbivore Cues from the Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*) Larvae Trigger Direct Defenses in Maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions®.* 2014;27: 461–470. doi:10.1094/MPMI-07-13-0193-R
 56. Dussourd DE, Peiffer M, Felton GW. Chew and spit: tree-feeding notodontid caterpillars anoint girdles with saliva. *Arthropod Plant Interact.* 2016;10: 143–150. doi:10.1007/s11829-016-9416-1
 57. Mori H, Nakazawa H, Ikeda K. Entomovirus. Cytoplasmic polyhedrosis virus and polyhedrin. *Uirusu.* 1998;48: 81–88. doi:10.2222/jsv.48.81
 58. Peng F, Fuxa JR, Richter AR, Johnson SJ. Effects of Heat-Sensitive Agents, Soil Type, Moisture, and Leaf Surface on Persistence of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) Nucleopolyhedrovirus. *Environ Entomol.* 1999;28: 330–338. doi:10.1093/ee/28.2.330
 59. Fuxa JR. Ecology of insect nucleopolyhedroviruses. *Agric Ecosyst Environ.* 2004;103: 27–43. doi:10.1016/j.agee.2003.10.013
 60. Young SY, Yearian WC. Movement of a Nuclear Polyhedrosis Virus from Soil to Soybean and Transmission in *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) Populations on Soybean. *Environ Entomol.* 1986;15: 573–580. doi:10.1093/ee/15.3.573
 61. Greeney HF, Hill RI, Rosendo Simbaña W, Gentry G. The Immature Stages and Natural History of *Veladyris pardalis* (Salvin, 1869) in Eastern Ecuador (Lepidoptera: Nymphalidae: Lthomiinae). *Journal of Insect Science.* 2009;9: 1–6. doi:10.1673/031.009.3501

62. Kring TJ, Ruberson JR, Steinkraus DC, Jacobson DA. Mortality of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) Pupae in Ear-Stage Field Com. *Environ Entomol.* 1993;22: 1338–1343. doi:10.1093/ee/22.6.1338

ANEXOS

Anexo 1: Reactivos para la receta McMorran y la solución vitamínica que la compone.

Receta McMorran		Solución vitamínica	
Reactivo	Cantidad por cada 100 ml de dieta	Reactivo	Cantidad por cada 2L de solución
Agua destilada	86 mL	Ácido fólico	0,5 g
Agar	1,73 g	Ácido nicotínico	2 g
Sacarosa	3,5 g	Pantotenato calcio	2 g
KOH	0,5 g	Riboflavina	2 g
Ácido ascórbico	0,4 g	Clorhidrato tiamina	0,5 g
Cloruro colina	0,1 g	Clorhidrato piridoxina	0,5 g
Caseína	3,5 g	Biotina	0,04 g
Germen de trigo tostado	3,06 g	Vitamina B12	0,004 g
Sal Wesson	1 g	Agua destilada	2 L
Aceite linaza	0,5 mL		
Celulosa	0,5 mL		
Aureomicina	0,21 g		
Hidroxibenzoato de metilo	0,15 g		
Formalina al 37 %	0,05 mL		
Solución vitamínica	1 mL		

Realizado por: Andrés Arias

Anexo 2: Fotos de las diferentes dietas.



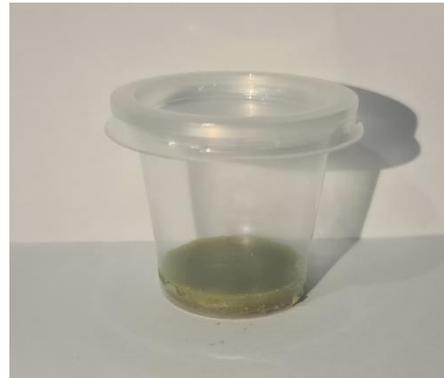
Dt1: *Passiflora punctata* L.



Dt2: Agar + *Passiflora punctata* L.

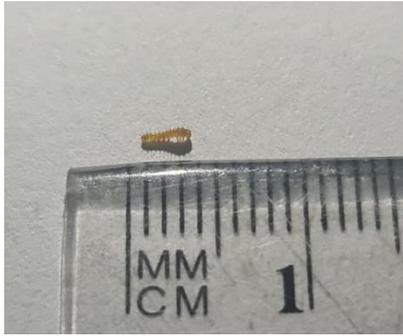


Dt3: Dieta McMorran



Dt4: Dieta McMorran + *Passiflora punctata* L.

Anexo 3: Orugas en sus distintas etapas de vida.



Oruga de *Heliconius erato* en su primer estadio, 0.4cm ~



Oruga de *Heliconius erato* en su segundo estadio, 1 cm ~



Oruga de *Heliconius erato* en su tercer estadio, 2.5 cm ~



Oruga de *Heliconius erato* en su cuarto estadio, 3.5 cm ~



Oruga de *Heliconius erato* en su quinto estadio, 3.7cm ~

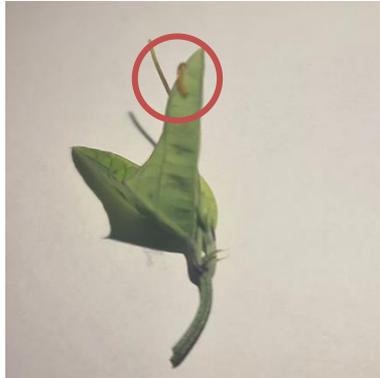


Oruga de *Heliconius erato* en pupa



Mariposa *Heliconius erato* adulta

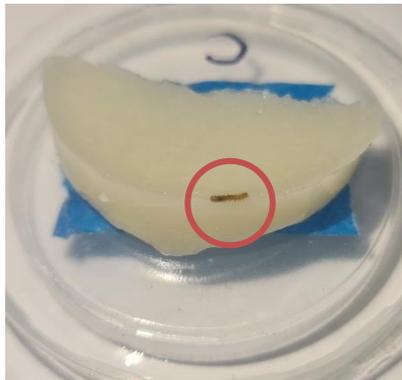
Anexo 4: Orugas junto a las diferentes dietas.



Oruga de *Heliconius erato* recién eclosionada sobre Dt1



Oruga de *Heliconius erato* recién eclosionada sobre Dt2



Oruga de *Heliconius erato* recién eclosionada sobre Dt3



Oruga de *Heliconius erato* recién eclosionada sobre Dt4

Anexo 5: Comandos ejecutados en el entorno virtual R para la obtención de las curvas Kaplan-Meier y las curvas de la regresión Cox de los diferentes grupos de orugas.

```
# Primero se cargan los paquetes
library(lubridate)
library(survival)
library(readxl)
library(ggplot2)
library(ggpubr)
library(survminer)

# Se carga la data
orugas <- read_excel("C:/Users/Dell/Desktop/Medicion de orugas/orugas_all.xlsx")
view(orugas)

# Se ajusta los datos a la función Kaplan-Meier para modelar las curvas
s1 <- survfit(Surv(T_vid, Pupa) ~ Dieta, data = orugas)

# Se grafican las curvas y sus respectivos intervalos de confianza
plot_super <- ggsurvplot(s1,
  lwd = 1,
  xlab = "Días", ylab = "Probabilidad de supervivencia",
  conf.int = TRUE,
  ggtheme = theme_bw())
plot_super

# Para la regresión Cox se ajustan los datos a la función
cox_orugas <- coxph(Surv(T_vid, Pupa) ~ Dieta, data = orugas)

# Se crea una nueva fila de variable "dt" asumiendo los mismos valores de la variable "Dieta" pero como factores
orugas$dt <- factor(orugas$Dieta)

estimacion_de_riesgo <- survfit(cox_orugas, newdata = data.frame(Dieta = levels(orugas$dt)))

# Se Grafican las curvas y sus respectivos intervalos de confianza
plot_super_cox <- ggsurvplot(estimacion_de_riesgo, data = orugas,
  xlab = "Días", ylab = "Probabilidad supervivencia",
  ggtheme = theme_bw())

plot_super_cox
```