



El Colegio de la Frontera Sur

Identificación de Lepidópteros (Clase Insecta) de la
Península de Yucatán, mediante técnicas moleculares

TESIS

presentada como requisito parcial para optar al grado de
Maestría en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural

por

Blanca Rosa Prado Cuéllar

2012

Dedicatoria

*A mi mamá, por creer en este sueño, motivarme y darme todo su amor y apoyo
incondicional para hacerlo realidad*

*A mi familia, mi papá, mis hermanas Adriana, Alejandra y Celina que siempre
estuvieron presente en los momentos más difíciles, aconsejándome y alentándome,
gracias por estar ahí*

*A mis sobrinos Uriel, Cielo, Haziel, Zara y Liam, por alegrar mis días; a Joseito (qepd)
que con su efímera existencia terrenal me regaló la mejor lección de vida*

Agradecimientos

A ECOSUR por todas las facilidades otorgadas para la realización del trabajo de tesis. A CONACyT por la beca otorgada durante la maestría. A todo personal del Museo de Zoología, a la Bióloga Noemí Salas por sus enseñanzas, consejos y compañía en el campo. A Estela Domínguez, Domingo Cahuich, Heiner Suárez y Pablo Beutelspacher por su apoyo en campo y en el trabajo curatorial. A Humberto Bahena por la toma de fotografías para el artículo.

Al personal del laboratorio del Biodiversity Institute of Ontario por el procesamiento de muestras. El financiamiento para la secuenciación fue otorgado a través del Dr. Paul Hebert por un beca Discovery of Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC); una beca otorgada por el gobierno de Canadá mediante Genome Canada en apoyo al Proyecto Internacional de los Códigos de Barras de la vida y por fondos del Ministerio de Investigación e Innovación de Ontario.

A la Dra. Carmen Pozo por todo el apoyo brindado durante la maestría y por su paciencia, dedicación y aportaciones en la revisión del artículo y la tesis. A la Dra. Martha Valdez Moreno y al Dr. Paul Hebert por sus contribuciones, sugerencias y comentarios a la tesis y al artículo. Al Dr. Manuel Elías Gutiérrez por sus consejos y comentarios durante la elaboración del trabajo.

Resumen

Los lepidópteros (mariposas y palomillas) son insectos holometábolos; cuando son larvas se alimentan de plantas y en la etapa adulta principalmente de néctar. Su sensibilidad a los cambios ambientales y su relativa fácil identificación en estado adulto, han hecho que se utilicen como especies indicadoras. No obstante, identificarlas como larvas es complicado porque las estructuras para discriminar entre especies no son evidentes y no existen claves de identificación a nivel de especie. Por este motivo se decidió aplicar las herramientas moleculares (los códigos de barras para la vida) en la identificación de especies de larvas de Lepidoptera de la Península de Yucatán. Se secuenciaron larvas y adultos de la colección de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Unidad Chetumal. Además, se inició la colección de referencia de las especies de palomillas de la Península con la finalidad de elevar el éxito de identificación de las larvas. En total se obtuvo la secuencia de 6,728 ejemplares de Lepidoptera, de los cuales 4,692 son adultos, 2,014 larvas, 18 pupas, tres huevos y una prepupa. Se determinaron 1,489 especies, corroborándose 595 y registrándose 894 más. Se analizó a detalle la familia Nymphalidae, encontrándose cuatro registros nuevos para la colección que habían pasado desapercibidas, *Adelpha malea*, *Adelpha iphiclus*, *Hamadryas iphitime* y *Taygetis laches*, siendo el registro de esta última la confirmación de su presencia en México. Se reporta por primera vez la larva de la especie *Hamadryas julitta* y su planta hospedera *Dalechampia schotti*, ambas endémicas para la Península de Yucatán. Así mismo, existen nueve casos de posibles especies crípticas en espera de caracterización completa para definir su estatus.

Palabras clave: Larvas, código de barras, COI, barcode y especies crípticas

Índice

Resumen.....	i
Índice.....	ii
1. Introducción.....	1
2. Resultados.....	11
2.1 Adultos.....	13
2.2 Larvas.....	14
3. Artículo: “Beyond the colours: Discovering hidden diversity in the Nymphalidae of the Yucatan Peninsula in Mexico through DNA barcoding”.....	15
4. Discusión.....	27
4.1 El caso de Nymphalidae.....	30
4.2 Identificación de larvas.....	32
4.3 Comentarios finales.....	35
5. Conclusiones.....	36
6. Literatura citada.....	38

1. Introducción

Las mariposas y palomillas (o mariposas nocturnas) conforman el Orden Lepidoptera. Son insectos holometábolos, es decir sufren una transformación completa del estado juvenil al adulto llamada metamorfosis. A largo de su ciclo de vida, presentan cuatro estados bien definidos: huevo, larva, pupa o crisálida y adulto, cada uno con características morfológicas y requerimientos ecológicos distintos (Scoble, 1995). Como consecuencia de estas diferencias ecológicas y necesidades específicas a lo largo de su ciclo de vida, los lepidópteros guardan una estrecha relación con su ambiente. La dependencia en estado larval a una especie de planta hospedera, su capacidad como agente polinizador en estado adulto y su naturaleza holometábola, hacen a los lepidópteros sensibles a las condiciones del ambiente (Ehrlich y Raven, 1965; Ehrlich, 1984; Murphy y Wilcox, 1986). Estas características han estimulado trabajos que van enfocados a consideraciones ecológicas, ambientales y económicas. Por ejemplo, las larvas al ser fitófagas muchas veces se convierten en plagas de cultivos causando grandes pérdidas económicas a la agricultura y a la industria forestal. En cuanto a lo ecológico y ambiental, los adultos se han usado como indicadores ambientales debido a su rápida respuesta a los cambios y su relativa facilidad de identificación a nivel de especie por el patrón de coloración alar (Scoble, 1995).

El Orden Lepidoptera está integrado por 121 familias (Heppner, 1991) y se han reconocido aproximadamente entre 160,000 y 180,000 especies, aunque se estima que pueden existir más de 350,000 especies en el mundo (Llorente-Bousquets et al., 1996; Powell y Opler, 2009). Norteamérica (región Neártica), es una zona relativamente bien estudiada, con 13,000 especies de lepidópteros de las cuales 94% son palomillas (Powell y Opler, 2009), nos da una idea de la proporción de mariposas y palomillas

dentro del Orden. Para la región Neotropical, hay descritas 46,313 especies, de las cuales, 83% son palomillas (Heppner, 1991). Las regiones Neártica y Neotropical en conjunto poseen 40% de la riqueza total de los lepidópteros y se estima que México podría presentar hasta 25,000 especies por ser un área de transición entre estas dos regiones (Llorente-Bousquets et al., 1996).

Hasta este momento se han reportado para el país aproximadamente 1,800 mariposas (Llorente-Bousquets et al., 1996) y 4,200 palomillas (Beutelspacher, 1992; Razowski, 1996; Solís, 1996; Balcázar y Beutelspacher, 2000a, 2000b; Davis, 2000; León-Cortés, 2000; Miller, Y. 2000; Hernández-Baz, 2011), lo que corresponde a un poco menos de la cuarta parte de la estimación mencionada anteriormente.

Debido a la proporción que ocupan las mariposas y palomillas en el Orden y al esfuerzo que se ha invertido en los estudios de mariposas en México (Michán et al., 2005) podría esperarse que, el 75% aún desconocido lo comprendieran principalmente las palomillas, por lo tanto los estudios deberían dirigirse hacia este grupo.

Históricamente los trabajos lepidopterológicos en México se han enfocado principalmente a mariposas diurnas (Michán et al., 2005). Lo que se conoce de palomillas para el país es principalmente por las investigaciones realizadas por Beutelspacher (1992) y a la contribución de pocos especialistas en diferentes familias de palomillas, incluidas en dos ediciones realizadas por Llorente-Bousquets y colaboradores (1996: Tortricidae por Razowski y Pyraloidea por Solís; 2000: Tineoidea y Gracillarioidea por Davis, Sphingoidea por León-Cortés, Saturniidae y Arctiidae por Balcázar y Beutelspacher, y Castniidae por Miller, JY). Tomando en cuenta lo reportado en la literatura y en un estudio de palomillas para Quintana Roo (Hernández-Baz, 2011), se tienen registradas 157 especies de palomillas para la Península de Yucatán.

Ante la ausencia de estudios sobre mariposas en esta área geográfica, en 1990 se inició la colección de mariposas en el Centro de Investigaciones de Quintana Roo (CIQRO), que actualmente es El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) unidad Chetumal, con el objetivo principal de tener referencias de las especies que se encuentran en la región (Pozo et al., 2003a). En el 2006 se comenzó la colección de referencia de larvas y en 2008 la de palomillas. A 20 años de su establecimiento, la colección ha servido para realizar investigaciones acerca de la taxonomía, ecología y distribución de estos organismos (Pozo et al., 1991, 2002, 2003b, 2009; Salas, 1995; Warren y Warren, 2004; Berdugo, 2005; Vázquez, 2005; Maya et al., 2005; May, 2006; Vargas-Fernández et al., 2008). Esta colección está registrada ante el Instituto Nacional de Ecología con el número QNR.IN.018.0497, es la única en su tipo en la región y contiene registros de Quintana Roo, Campeche y Yucatán y en los diferentes sitios de recolecta se encuentran representados los tipos de vegetación reportados para la región. Es importante señalar que la colección antes de la presente tesis, tenía un aproximado de 90,000 ejemplares de mariposas diurnas, poco menos de 1,800 larvas y 150 ejemplares de palomillas. Las mariposas diurnas son las que tenían trabajo curatorial completo con 464 especies identificadas por diversos especialistas, las larvas se encontraban identificadas hasta nivel de familia o como Orden y las palomillas no tenían un trabajo curatorial formal.

El trabajar con grupos poco estudiados en la región e inclusive en el mundo, supone grandes desafíos taxonómicos, especialmente la identificación a nivel específico de los estados inmaduros. No obstante, es necesario invertir esfuerzos en su estudio ya que tienen importancia fundamental para conocer la historia natural de las especies y así ayudar a establecer relaciones filogenéticas dentro del Orden

Lepidoptera (Müller, 1886; Llorente-Bousquets et al., 1993; Freitas y Brown, 2004), entre otras aportaciones.

En el caso de las larvas, la información para poder identificarlas es escasa. Las únicas claves de identificación taxonómica para los estados inmaduros de Lepidoptera son las obras de Peterson (1962) y Stehr (1987), pero tienen el inconveniente de que solo son útiles a nivel de familia. Otra forma de identificación es por comparación con fotografías, pero también es limitado para estos estados debido a que la discriminación a nivel específico es mediante estructuras morfológicas finas, apreciables solo bajo microscopio.

El método ideal y tradicional para asociar estados larvales y adultos es criar los inmaduros hasta que son adultos, es decir hacer un seguimiento del ciclo de vida de las especies y registrar cada etapa. Esto se viene realizando desde hace 32 años en el Área de Conservación Guanacaste (ACG) en Costa Rica, donde el grupo de trabajo de Janzen y Hallwachs (2011a) ha criado 4,500 especies desde el estado larval, lo que representa la mitad de la fauna local (Janzen y Hallwachs, 2011a, 2011b; Miller et al., 2006, 2007). Sin embargo, esto toma mucho tiempo, personal capacitado y financiamiento sustancial y constante (Janzen y Hallwachs, 2011b).

Para la identificación de adultos existen muchas claves; sin embargo, el método por comparación directa con fotografías es el más utilizado debido a la relativa facilidad de reconocer las especies de mariposas por los patrones de coloración alar (especies mexicanas: De la Maza, 1987; Llorente-Bousquets et al., 1997; Luis-Martínez et al., 2003, 2010; Vargas-Fernández et al., 2008; especies neotropicales: DeVries, 1987, 1997; D'Abbrera, 1981-1995; Janzen y Hallwachs, 2011a) y en el caso de las palomillas, este método es cada día más común (Pescador, 1994; Piñas et al., 2000; Miller et al.,

2007; Janzen y Hallwachs, 2011a). Cabe mencionar que para éstas últimas, la mayoría de la literatura disponible corresponde a faunas de otros países. El método de identificación por comparación tiene sus limitantes debido a que en los últimos años se ha demostrado que las especies crípticas son frecuentes en Lepidoptera, lo que implica el análisis de genitalia en adultos para su identificación. Esto requiere de técnicas específicas y un profundo conocimiento de las estructuras genitales (Klots, 1956; Robinson, 1976; Kristensen, 2003).

Con el desarrollo de nuevas tecnologías moleculares, la tendencia en la actualidad es adoptar estas herramientas en el trabajo del taxónomo con la finalidad de agilizar la identificación, el descubrimiento de especies, su descripción y precisar relaciones filogenéticas entre ellas, de tal manera que se complemente con el uso tradicional de caracteres morfológicos (Hoy, 2003; Sperling, 2003; Miller S., 2007; Adamski et al., 2009). Para estudios taxonómicos es requerido cierto nivel de variabilidad en el marcador molecular, lo suficiente para discriminar entre especies pero que no haga distinción entre las poblaciones de una misma especie. El ADN mitocondrial (a diferencia del nuclear) cumple con estas características porque solamente es heredable por vía materna. Técnicamente también tiene más ventajas que el nuclear debido al número de copias que se pueden obtener (Hoy, 2003; Chenuil, 2006). Así mismo, los genes ribosomales se han usado frecuentemente, pero tienen la desventaja de tener regiones que cambian rápidamente y otras que lo hacen lentamente. El ADN mitocondrial contiene genes que codifican proteínas, carece de intrones (secuencias sin codificación), es pequeño y circular (fig. 1). Los genes más usados son los que codifican para el citocromo b (cyt b) y el citocromo oxidasa subunidad I (COI) y la diferencia entre estos dos radica en las tasas de evolución,

dando como resultado que el cyt b sea efectivo para identificaciones superiores a la especie, mientras que el COI es útil para distinguir a nivel específico (Chenuil, 2006), debido a su baja variabilidad intraespecífica y su alta variabilidad interespecífica. Esto aunado al número de copias que se pueden obtener de una célula (cada célula contiene dos copias de ADN nuclear, mientras que de genoma mitocondrial puede tener de 100 a 10,000 copias) y a la ausencia de intrones, el COI es ideal para la identificación de especies (Hebert 2003a).

Tomando en cuenta lo anterior, Hebert y colaboradores (2003a, 2003b) propusieron que un fragmento (de aproximadamente 600 pares de bases) de un gen estandarizado del DNA mitocondrial que codifica para la citocromo C oxidasa de la cadena respiratoria, es distinto y único en cada especie animal de nuestro planeta al cual denominó código de barras (barcode, COI, COX), por lo que puede utilizarse como un marcador universal para el reconocimiento de las especies.

Este método incluye la extracción del ADN, la amplificación con PCR y la secuenciación de las pares de bases, para después comparar la secuencia con una base de datos existente de secuencias de especímenes previamente identificados por taxónomos especialistas. Esto se puede hacer de una manera relativamente rápida a través de la base de datos Barcode of Life Data System (BOLD, <http://www.boldsystems.org/>) (Ratnasingham y Hebert, 2007).

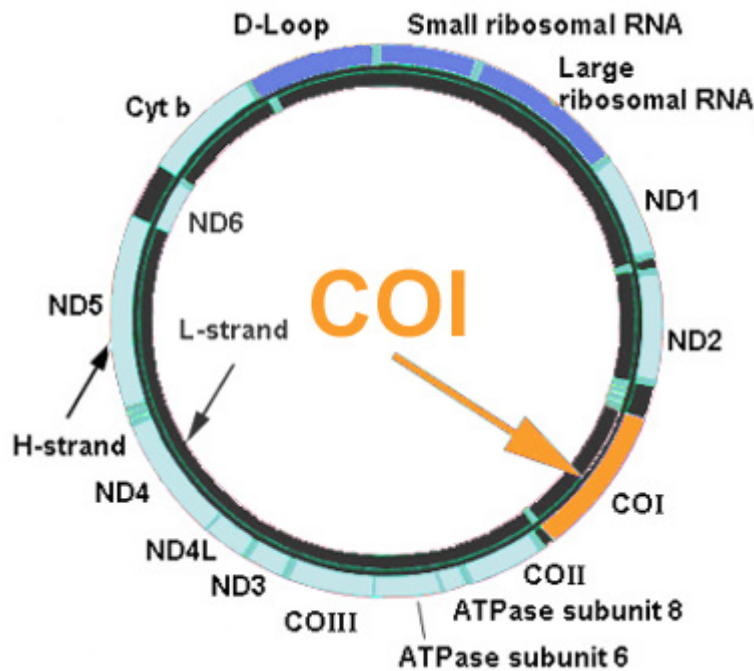


Figura 1. ADN mitocondrial, mostrándose su forma circular y genes que lo conforman. Resalta el COI, utilizado como el sistema de códigos de barras para la identificación de especies. Tomado de Hebert Lab <<http://www.dnabarcoding.ca/primer/Target.html>>

A partir de entonces se ha aplicado en la identificación de especies en diferentes grupos faunísticos (por ejemplo, aves: Hebert et al., 2004b; Kerr et al., 2007, 2009; Johnsen et al., 2010; gasterópodos: Remigio y Hebert, 2003; collembola: Hogg y Hebert, 2004; arañas: Barret y Hebert, 2005, 2005; peces: Ward et al., 2005; Hubert et al., 2008; Valdez-Moreno et al., 2009, 2010; murciélagos: Clare et al., 2006, 2011; pequeños mamíferos: Borisenko et al., 2007; crustáceos: Costa et al., 2007; Jeffrey et al., 2011; insectos como en hormigas: Smith et al., 2005; Coleoptera: Caterino y Tishechkin, 2006 y Efemerópteros: Ball y Hebert, 2005). Es importante señalar que en

la gran mayoría de estos trabajos se ha obtenido una correspondencia de más del 97% de eficacia en la determinación de las especies.

En el caso de las mariposas, el primer estudio donde se utilizaron los métodos taxonómicos tradicionales, datos ecológicos y los códigos de barras fue el realizado en Costa Rica por Janzen y colaboradores (2005), donde 97%, de más de 1000 especies analizadas pertenecientes a las familias HesperIIDae, Saturniidae y Sphingiidae, obtuvieron su código de barras diagnóstico. Recientemente, resultados similares se reportaron en un estudio con la lepidopterofauna de Norteamérica (parte Este), en el que se incluyeron 1,327 especies, de las cuales, 99.3% resultaron con una secuencia del COI diagnóstica (Hebert et al., 2010). En zonas templadas también se ha probado la eficacia de los códigos de barras, como fue la investigación realizada en Rumania que es el primer país de Europa en tener completa su base de datos de referencia del COI de 180 especies de mariposas (Dincă et al., 2010).

Esta herramienta, también ha demostrado su utilidad en el descubrimiento de nuevas especies, particularmente en especies crípticas (Hebert et al., 2004a, 2010; Janzen et al., 2005, 2009, 2011; Burns et al., 2007, 2008; van Velzen et al., 2007; deWaard et al., 2009; Grund y Eastwood, 2010; Wilson et al., 2010), tal es el caso de la especie *Astrartes fulgerator* (HesperIIDae) en la cual se identificó un complejo de por lo menos 10 especies crípticas (Hebert et al., 2004a), únicamente diferenciadas por divergencia del COI, por las características ecológicas como la planta hospedera y algunas veces por variación morfológica de la larva, la cual era considerada anteriormente como variación intraespecífica.

Así mismo, los códigos de barras han sido eficientes al relacionar estados inmaduros (sin identificar) con los adultos previamente identificados por expertos a

través del sistema BOLD y de esta manera obtener las determinaciones a nivel específico (Adamski, et al., 2010; Hrcek et al., 2011). Esto ya se ha hecho en México para larvas de peces (Valdez-Moreno, et al., 2010) y recientemente en Papúa, Nueva Guinea para identificar las larvas de Lepidoptera hospederas y sus parasitoides, con lo cual pudieron mapear sus interacciones (Hrcek et al., 2011).

Tomando en cuenta lo anterior, el objetivo del presente estudio fue identificar las especies de mariposas y palomillas en estado larval utilizando los códigos de barras para la vida, a través de la comparación de la secuencia del gen mitocondrial COI de los adultos. Esto con la finalidad de completar algunos ciclos de vida de las especies antes desconocidos, establecer la colección de referencia de larvas y palomillas de la Península de Yucatán e incrementar el conocimiento de la diversidad de lepidópteros en la región.

Todos los especímenes analizados, provienen de la Península de Yucatán, en su gran mayoría de la Colección Lepidopterológica del Museo de Zoología de ECOSUR y de colectas (licencia de colector número FAUT-0119, y permiso SGPA/DGVS/03164/09) realizadas durante el presente estudio para incrementar las muestras de palomillas y la representación geográfica dentro del estado de Yucatán (figura 2). Los análisis moleculares se realizaron en el Biodiversity Institute of Ontario (BIO) mediante las técnicas y protocolos ya establecidos (Ivanova et al., 2006).

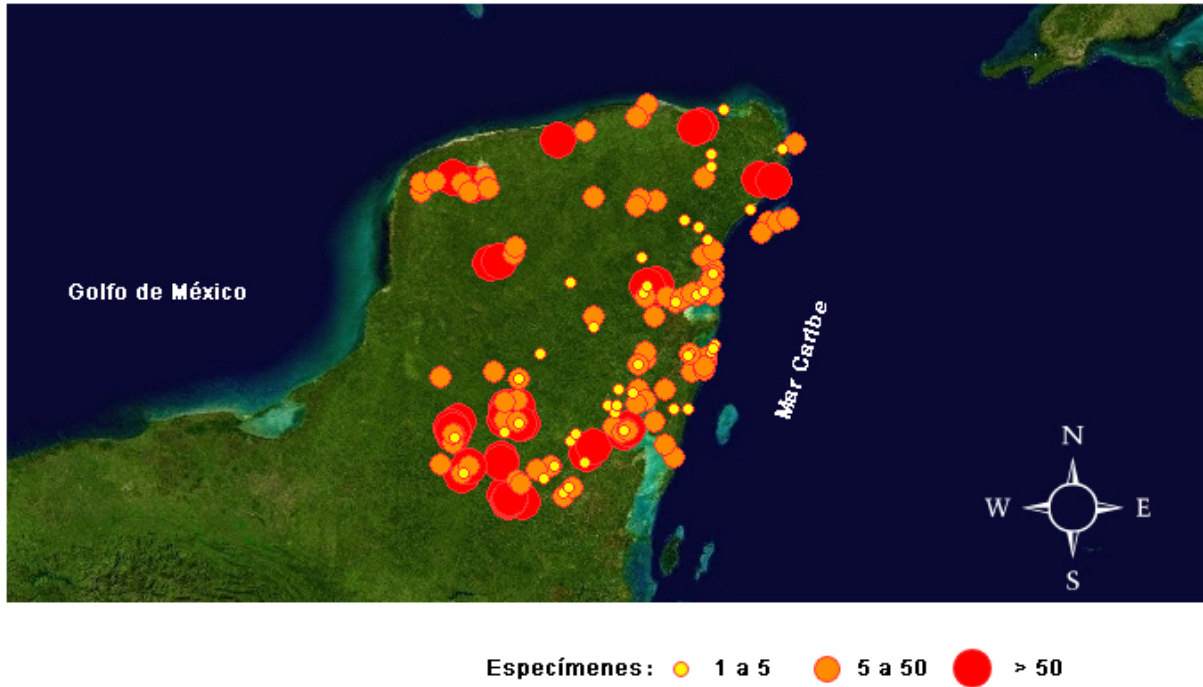


Figura 2. Mapa de las localidades de la Península de Yucatán incluidas en el presente estudio, donde se muestran las abundancias de los ejemplares de Lepidoptera analizados.

Después de los análisis realizados, se eligió a la familia Nymphalidae (larvas y adultos), que representa 14% de los especímenes secuenciados, para ejemplificar las posibilidades que tiene el uso de los códigos de barras genéticos para la identificación de especies, a través de un artículo científico en donde se muestra la aplicación del análisis utilizado y el cual fue publicado el 23 de Noviembre del año 2011 en la revista PLoS ONE (se anexa la publicación). Se espera que toda la información generada en este estudio sea publicada de forma similar para cada familia una vez se analicen los datos y en algunos casos se complementa con información de genitalia.

2. Resultados

Se analizaron 7,184 ejemplares de Lepidoptera. Mediante la identificación morfológica se determinó el 38% de las palomillas en estado adulto (152 especies). En el caso de las mariposas ya se encontraban identificadas 464 especies y los ejemplares en estado inmaduro estaban identificados a nivel de familia.

Se obtuvo la secuencia de 6,728 individuos, de las cuales, 93% tuvo de 600 a 650 pares de bases, lo que indicó que la mayoría de los ejemplares obtuvieron una secuencia de alta calidad para ser utilizada en la identificación de especies. Los ejemplares secuenciados están conformados por 4,692 adultos (2,098 mariposas y 2,594 palomillas), 2,014 larvas, 18 pupas, tres huevos y una prepupa.

El análisis de secuencias, resultó en la determinación de 1,489 especies, de las cuales 330 son clusters o grupos sin identificar formalmente a especie, por lo que se les asignó una clave o código temporal para poder diferenciarlos.

El total de especies se agrupan en seis familias de mariposas, 36 familias de palomillas y una sin determinar (Cuadro 1). La familia con más especies fue Noctuidae (palomillas) con 270, seguida de Hesperiiidae (mariposas) con 180 especies y nueve familias de palomillas se encuentran representadas por una sola especie (Cuadro 1).

De las 1,489 especies determinadas, 13% se presentan en algún estadio larval y en estado adulto, 20% únicamente como larva y 66% exclusivamente como adultos. Los demás estados conforman 1% de las especies como se puede observar en el Cuadro 2. Se realizó una búsqueda en la literatura del estado larval de las especies encontradas en este estudio (como larvas y adultos), resultando 24 especies que se desconocían como larvas.

Cuadro 1. Número de especies por familia (incluyendo
larvas y adultos)

Palomillas		Mariposas	
Familia	Especies	Familia	Especies
Noctuidae	270	Hesperiidae	180
Crambidae	137	Nymphalidae	130
Geometridae	123	Lycaenidae	76
Elachistidae	95	Riodinidae	43
Arctiidae	71	Papilionidae	24
Notodontidae	59	Pieridae	24
Pyalidae	37		
Sphingidae	31		
Limacodidae	28		
Saturniidae	28		
Tortricidae	16		
Bombycidae	14		
Gracillariidae	13		
No determinada	12		
Thyrididae	10		
Megalopygidae	9		
Lasiocampidae	8		
Cossidae	6		
Mimallonidae	6		
Acrolophidae	5		
Psychidae	5		
Lymantriidae	4		
Urodidae	4		
Castniidae	3		
Gelechiidae	3		
Dalceridae	2		
Pterophoridae	2		
Xyloryctidae	2		
Aididae	1		
Epipleidae	1		
Hedylidae	1		
Hepialidae	1		
Hyblaeidae	1		
Tineidae	1		
Uraniidae	1		
Yponomeutidae	1		
Zygaenidae	1		
Total	1012		477

Cuadro 2. Número de especies por etapa de desarrollo

Estado	Especies
Adulto	984
Larva	296
Adulto-Larva	189
Pupa	6
Adulto-Larva-Pupa	5
Larva-Pupa	4
Adulto-Larva-Huevo	2
Adulto-Larva-Prepupa	1
Adulto-Pupa	1
Larva-Huevo	1
Total	1,489

2.1 Adultos

Se obtuvo la secuencia de 4,692 ejemplares de adultos de Lepidoptera (2,594 palomillas y 2,098 de mariposas), comprendidos en 1,182 especies.

Con el análisis de los códigos de barras se identificó 62% de los ejemplares de palomillas que no se pudieron identificar previamente en el análisis morfológico y se corroboraron 80% de las 152 especies identificadas morfológicamente, resultando finalmente 719 especies de palomillas. Con respecto a las mariposas, se identificaron cuatro especies más de la familia Nymphalidae y se descubrieron nueve posibles nuevas especies crípticas, solo una especie de Lycaenidae permanece sin identificación y se mantuvo con un código temporal. De esta manera, como resultado del análisis con los códigos de barras, se obtuvo un total de 477 especies de mariposas.

Cabe señalar que del total de adultos, 259 ejemplares no pudieron ser identificados, sin embargo, de acuerdo al análisis de las secuencias, se pudieron

determinar 135 grupos bien definidos en el árbol de Neighbor-joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987) y se incluyeron en el total de especies. La familia Crambidae, Noctuidae y Geometridae con 32, 30 y 22 grupos respectivamente son las que presentaron más de estos casos y cinco clusters no pudieron determinarse a nivel de familia.

2.2 Larvas

Las 2,014 secuencias de larvas analizadas mediante los códigos de barras, resultó en la determinación de 498 grupos bien definidos, de los cuales se logró la identificación a nivel de género de 84 grupos y a nivel de especie de 198 grupos (51% de los ejemplares en estado larval). Los 216 grupos restantes solo se determinaron a nivel de familia, con el mismo número de especies; sin embargo, por el momento se encuentran con clave temporal.

Las 498 especies determinadas en estado larval se encuentran agrupadas en 34 familias. Elachistidae, a este nivel presento la mayor riqueza con 89 especies y el 84% con clave temporal. Es importante señalar que a partir de los códigos de barras se registraron las familias Hepialidae, Pterophoridae, Xyloryctidae y Zygaenidae, que no habían sido reportadas para la Península de Yucatán.

3. Artículo: “Beyond the colours: Discovering hidden diversity in the Nymphalidae of the Yucatan Peninsula in Mexico through DNA barcoding”

Beyond the Colours: Discovering Hidden Diversity in the Nymphalidae of the Yucatan Peninsula in Mexico through DNA Barcoding

Blanca R. Prado¹, Carmen Pozo^{1*}, Martha Valdez-Moreno¹, Paul D. N. Hebert²

¹ El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Chetumal, Quintana Roo, Mexico, ² Biodiversity Institute of Ontario, University of Guelph, Ontario, Canada

Abstract

Background: Recent studies have demonstrated the utility of DNA barcoding in the discovery of overlooked species and in the connection of immature and adult stages. In this study, we use DNA barcoding to examine diversity patterns in 121 species of Nymphalidae from the Yucatan Peninsula in Mexico. Our results suggest the presence of cryptic species in 8 of these 121 taxa. As well, the reference database derived from the analysis of adult specimens allowed the identification of nymphalid caterpillars providing new details on host plant use.

Methodology/Principal Findings: We gathered DNA barcode sequences from 857 adult Nymphalidae representing 121 different species. This total includes four species (*Adelpha iphiclus*, *Adelpha malea*, *Hamadryas iphitime* and *Taygetis laches*) that were initially overlooked because of their close morphological similarity to other species. The barcode results showed that each of the 121 species possessed a diagnostic array of barcode sequences. In addition, there was evidence of cryptic taxa; seven species included two barcode clusters showing more than 2% sequence divergence while one species included three clusters. All 71 nymphalid caterpillars were identified to a species level by their sequence congruence to adult sequences. These caterpillars represented 16 species, and included *Hamadryas julitta*, an endemic species from the Yucatan Peninsula whose larval stages and host plant (*Dalechampia schottii*, also endemic to the Yucatan Peninsula) were previously unknown.

Conclusions/Significance: This investigation has revealed overlooked species in a well-studied museum collection of nymphalid butterflies and suggests that there is a substantial incidence of cryptic species that await full characterization. The utility of barcoding in the rapid identification of caterpillars also promises to accelerate the assembly of information on life histories, a particularly important advance for hyperdiverse tropical insect assemblages.

Citation: Prado BR, Pozo C, Valdez-Moreno M, Hebert PDN (2011) Beyond the Colours: Discovering Hidden Diversity in the Nymphalidae of the Yucatan Peninsula in Mexico through DNA Barcoding. PLoS ONE 6(11): e27776. doi:10.1371/journal.pone.0027776

Editor: M. Alex Smith, University of Guelph, Canada

Received: August 18, 2011; **Accepted:** October 25, 2011; **Published:** November 23, 2011

Copyright: © 2011 Prado et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Funding for sequence analysis was provided by a Discovery Grant from Natural Sciences and Engineering Research Council to PH and by a grant from the Government of Canada through Genome Canada and the Ontario Genomics Institute in support of the International Barcode of Life Project. The Ontario Ministry of Research and Innovation provided funds for the analysis and curation of the barcode records. This work is part of the MSc thesis of Blanca R. Prado and was supported with a grant provided by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT grant 207930). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: cpozo@ecosur.mx; cpozo2@gmail.com

Introduction

The Order Lepidoptera includes about 160,000 described species of butterflies and moths [1–3], and it is thought that a similar number await discovery [3,4]. For example, Lamas [5] noted that collections hold numerous undescribed species and concluded that many more species await discovery in the Neotropics. One third of all butterfly species belong to the Nymphalidae [6], a family that occurs in all faunal regions, but is most diverse in the Neotropics [1]. Approximately 570 species of Nymphalidae have been reported from Mexico, representing 28% of its butterfly fauna [4]. About one quarter of this total (121 species) occur in the Yucatan Peninsula (Campeche, Quintana Roo and Yucatan States).

Although the Nymphalidae has been widely studied, gaps remain in knowledge of their systematics [7,8], life cycles and host

plants. There are some identification keys for species of economic importance [9,10], but most larval stages remain difficult to assign to a species. Rearing caterpillars is the traditional way to connect larval and adult stages, and the success of this approach has been shown in Costa Rica where Janzen and Hallwachs have now reared 4,500 species, nearly half of the local fauna [11–14]. However, this approach takes much time, staff and substantial funding [14].

DNA barcoding, the sequence analysis of a short standard segment of the cytochrome *c* oxidase subunit I gene (COI) provides a rapid way to probe biodiversity [15,16]. It also makes it possible to identify any life stage by matching barcode records from unknown caterpillars with a barcode library constructed through the analysis of adult specimens as evidenced by work on the moth *Exoteleia dodecella* [17] and a study on the identification of host caterpillars to track host-parasitoids interactions [18]. DNA

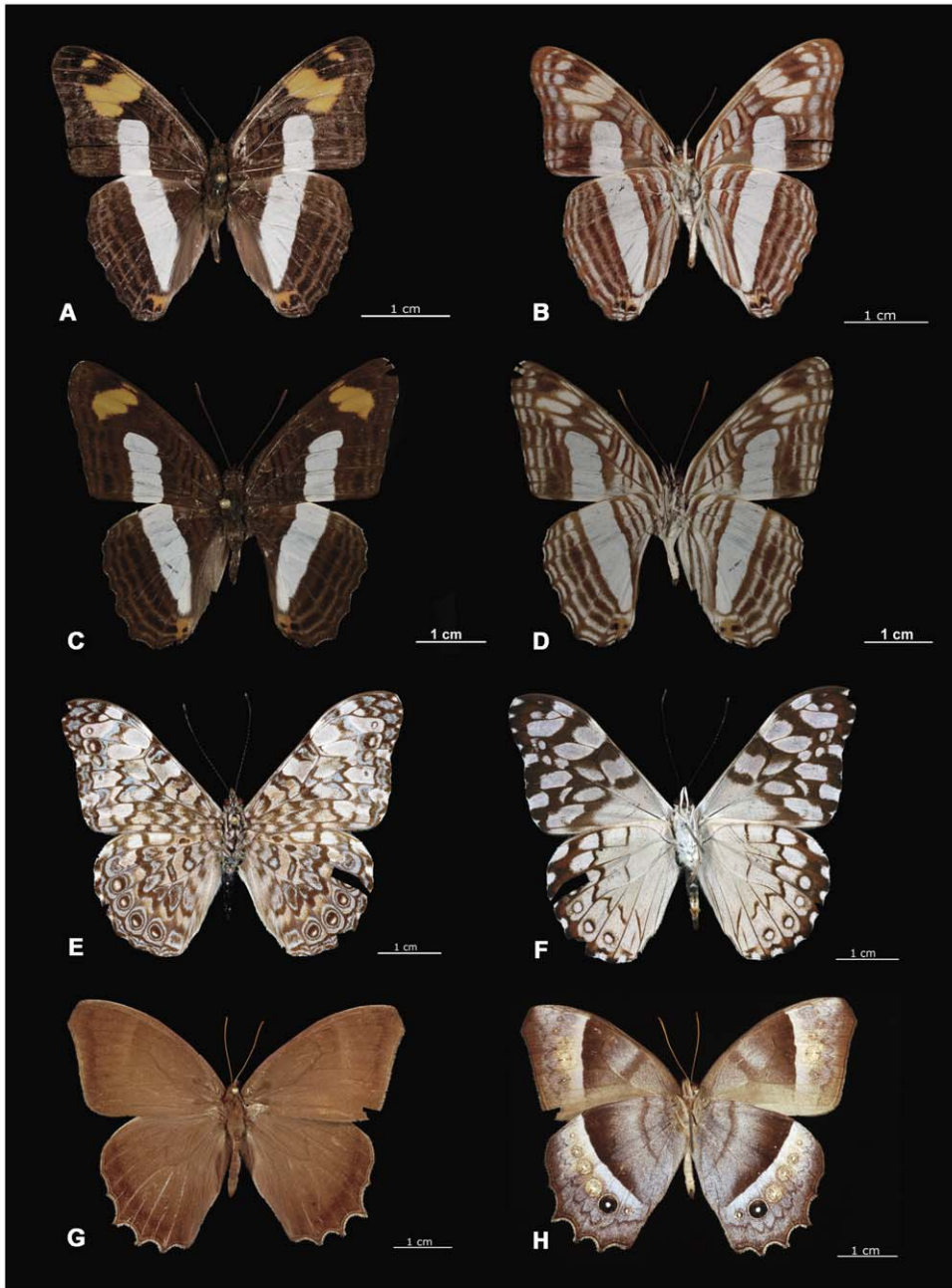


Figure 1. Four overlooked Nymphalidae species within the Lepidoptera collection of ECOSUR from the Yucatan Peninsula. A–B) *Adelpha malea*; C–D) *Adelpha iphiclus*; E–F) *Hamadryas iptime*; G–H) *Taygetis laches*. Each species is shown in dorsal and ventral view. A. *iphiclus* is a new record for the Yucatan Peninsula while *T. laches* is a new record for Mexico. Photos by Humberto Bahena.
doi:10.1371/journal.pone.0027776.g001

barcoding works particularly well for Lepidoptera and some past and recent studies have shown that it aids the discovery of new species, especially cryptic taxa [19–28]. Based on these results, we employed DNA barcoding to extend understanding of the immature stages of the Nymphalidae from the Yucatan Peninsula and the incidence of cryptic species. By providing access to new information on adult and caterpillar morphology, our work will aid better understanding of the systematics of Nymphalidae.

In this study, COI sequences were obtained from 121 species of adult Nymphalidae from the Yucatan Peninsula held in El Colegio de la Frontera Sur-Chetumal (ECOSUR) collection and previously identified through morphological study. The barcode

analysis of these species revealed both four overlooked species in the collection (known species that were misidentified) and provided evidence for several cryptic species (undescribed new species). As well, the reference sequence library created through the analysis of adults was a useful tool to identify caterpillars.

Results

We obtained sequences from 857 adult specimens and 71 caterpillars. Most (95%) of these sequences were longer than 600 bp, 3.4% ranged from 400–599 bp and 1.6% varied between 267–399 bp. The coupling of barcode results with subsequent

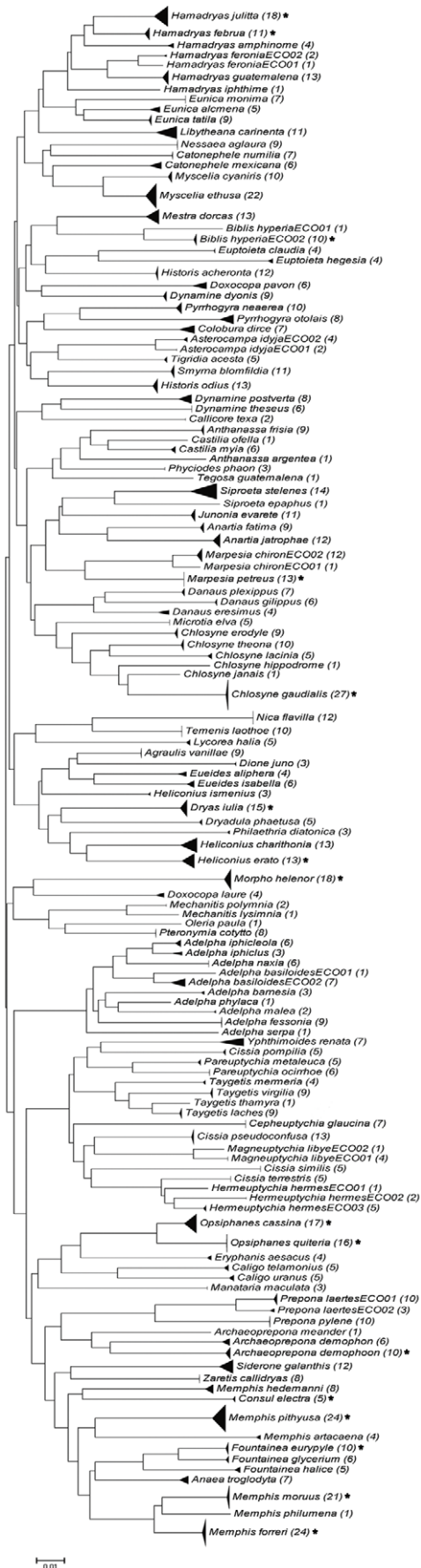


Figure 2. Neighbour Joining tree for 121 species of Nymphalidae from the Yucatan Peninsula. Tree is based on genetic distances (K2P) for the barcode region of the COI gene; the height of each triangle indicates mean intraspecific sequence divergence, while the base of the triangle provides a rough indication of the number of specimens analyzed. Brackets enclose the number of barcodes generated for each species and those with an asterisk include both caterpillars and adults.
doi:10.1371/journal.pone.0027776.g002

morphological analysis revealed four species that had been overlooked in ECOSUR collection, *Adelpha iphicles*, *Adelpha malea*, *Hamadryas iphthime* and *Taygetis laches* (Figure 1). The first of these species represents a new record for the Yucatan Peninsula, while the last is a new record for Mexico. Before barcoding these specimens were mistaken with closely morphologically similar taxa (*A. iphicleola/A. nea*, *A. barnesia*, *H. feronia* and *T. thamyra* respectively). In two other cases, the barcode results provoked the merger of specimens initially assigned to different species. Specimens originally identified as *Opsiphanes tamarindi* and *O. quiteria* showed no barcode divergence and morphological re-examination indicated that all were actually *O. quiteria*. Similarly, specimens identified as *Junonia evarete* and *J. coenia* showed no barcode divergence and morphological re-analysis indicated that all specimens were actually *J. evarete*. The NJ tree for the 121 Nymphalidae species (Figure 2) shows that each of the species possessed a diagnostic array of barcode sequences.

Eight of the 121 species included two or three barcode clusters and we assigned an interim name to each cluster (Table 1, Figure 3). We did not detect any striking differences in adult morphology between the members of the different clusters in most of these species, but we did not examine genitalia. However, there were exceptions. The two clusters of *Asterocampa idyja* showed clear morphological divergence (Figure 3, B1 and B2) which has in the past been thought to reflect melanic versus normal forms in Mexico [29]. The dorsal wing surfaces of *Hamadryas feronia* showed no obvious difference (Figure 3, D1.1, D2.1 and D3.1), but the ventral surfaces (Figure 3, D1.2, D2.2 and D3.2) showed variation that has, in the past, been viewed as seasonal or regional variation [30]. Although more detailed morphological, ecological and genetic studies need to be carried out to decide the status of the barcode clusters in these eight species, we expect that many reflect new taxa or subspecies that should be raised to species status and that were previously unknown from Mexico. After excluding these eight species, members of the remaining 113 species possessed a mean intra-specific distance of 0.27% and maximum of 1.90% (Table 2). Divergences among congeneric species were considerably higher, averaging 7.95%.

Barcode analysis enabled the identification of all 71 nymphalid caterpillars collected in a field survey, assigning them to 16 different species (Figure 4) as they showed less than 2% K2P divergence from adults sequenced in this study (Table 3).

Discussion

Adult identification

Our study has examined DNA barcode variation in all 121 species of Nymphalidae known from the Yucatan Peninsula. Our results established that most of these species (109 of 121) possess little sequence variation at COI, but revealed 12 taxa with lineages showing more than 2% divergence. Four of these cases had a simple explanation. They reflected described species (*Adelpha malea*, *Adelpha iphicles*, *Hamadryas iphthime* and *T. laches*) whose presence had been overlooked because of their morphological similarity to other species. Although *A. malea* (Figure 1, A–B) can only be

Table 1. Eight species of Nymphalidae from the Yucatan Peninsula which include two or three clusters of barcode sequences showing >2% sequence divergence.

Species	Interim name	Mean Dist(%)	BOLD ID engine (public)	Sim(%)
<i>Adelpha basiloides</i>	A. basiloidesECO01	3.15%	<i>Adelpha basiloides</i> DHJ01	99.7
	A. basiloidesECO02		<i>Adelpha basiloides</i> DHJ02	99.6
<i>Asterocampa idyja</i>	A. idyjaECO01	2.24%	<i>Asterocampa idyja</i>	99.9
	A. idyjaECO02		Not match found	
<i>Biblis hyperia</i>	B. hyperiaECO01	4.67%	<i>Biblis hyperia</i> DHJ02	99.3
	B. hyperiaECO02		<i>Biblis hyperia</i> DHJ01	100
<i>Hamadryas feronia</i>	H. feroniaECO01	2.01%	<i>Hamadryas guatemalena</i> DHJ02	100
	H. feroniaECO02		<i>Hamadryas farinulenta</i>	99.8
<i>Hermeuptychia hermes</i>	H. hermesECO01	3.64%	Not match found	
	H. hermesECO02		Not match found	
	H. hermesECO03		Not match found	
<i>Magneuptychia libye</i>	M. libyeECO01	2.32%	Not match found	
	M. libyeECO02		<i>Magneuptychia libye</i>	99.7
<i>Marpesia chiron</i>	M. chironECO01	2.10%	<i>Marpesia Chiron</i>	99.4
	M. chironECO02		<i>Marpesia chiron</i>	99.8
<i>Prepona laertes</i>	P. laertesECO01	2.82%	<i>P. laertes Octavia</i>	98.2
	P. laertesECO02		Not match found	

Also is indicated the identification through the BOLD ID engine with the percentage of similarity.
doi:10.1371/journal.pone.0027776.t001

distinguished from *A. barnesia* by careful observation of venation and colour pattern, the two taxa have a barcode divergence of 7.46%. *A. barnesia* occurs throughout the Atlantic and Pacific mid-south of Mexico including the Yucatan Peninsula [31,32]. *A. malea* has been reported from the Yucatan Peninsula [33], but Mexican collections include only one specimen from the west (Veracruz State) [31]. Our analysis reveals more specimens that have been overlooked and we expect that many individuals of this species are currently misplaced in collections as *A. barnesia*.

Adelpha iphichlus (Figure 1, C–D) and *A. iphicleola* are sister taxa whose morphological separation is extremely difficult (the orange subapical mark is slightly wider in *A. iphicleola* than in *A. iphichlus*). The two species show a mean sequence divergence of just 2.32%, suggesting that their phenotypic similarity reflects a recent evolutionary origin. Nevertheless, these species occur sympatrically through much of Central America [33]. *A. iphicleola* occurs widely in Mexico including the Yucatan Peninsula, while *A. iphichlus* was previously known from the western side of the country [31,33]. As Willmott reports *A. iphichlus* from Belize [33], our detection of its presence in the Yucatan Peninsula is not unexpected. Our work revealed one additional specimen that was originally identified as *A. nea*, but that grouped with *A. iphichlus* in the NJ tree and subsequent morphological analysis indicated that it was the latter taxon.

Species in the genus *Hamadryas* are often difficult to discriminate because different species show similar colours and patterns. Moreover, intraspecific variation is considerable and some variants were described as species, but have now been relegated to synonymy [5,30]. The most careful study on *Hamadryas* reduced the genus from 92 taxa to 41 (20 species and 21 subspecies) [30]. In Mexico 10 species are recognized from this genus [31]. Four species (*H. februa*, *H. feronia*, *H. guatemalena* and *H. amphinome*) with broad distributions in Mexico have been reported from the Yucatan Peninsula together with the endemic *H. julitta*, [31,32]. Our analyses revealed that specimens morphologically identified

as *H. feronia* fell into two clusters showing 7.28% sequence divergence, and subsequent morphological analysis revealed that *H. iphthime* had been overlooked by our morphological studies (Figures 1 E–F, 2 and 5). This species has been reported from north of Quintana Roo [30], but no prior Mexican collection contains *H. iphthime* from the Yucatan Peninsula. There remained three specimens morphologically identified as *H. feronia*, but they split into two clusters whose members show slight differences in colour (Figure 3, D). The subspecies *H. feronia farinulenta* [31,32] is known from Mexico and the ID engine on BOLD showed that the *H. feronia*ECO02 has 99.8% similarity with *H. farinulenta*. Interestingly, our *H. feronia*ECO01 matches with *Hamadryas guatemalena*DHJ02 (See Table S1 for information on specimens compared from the public database). In the past *H. guatemalena* and *H. feronia* were mistaken because of their morphological similarity [30], but *Hamadryas guatemalena* in this study is well separated from *H. feronia* (Figure 5). According to Jenkins description of *H. feronia farinulenta*, it is possible that *H. feronia*ECO01 is actually the “real” *H. feronia farinulenta* and that *H. feronia*ECO02 is the subspecies described as *Ageronia feronia nobilita* by Fruhstofer, but relegated as a variation of *H. feronia farinulenta* and later synonymized by Jenkins [30]. Although it is likely that they represent different species, we have employed interim names (*H. feronia*ECO01 and *H. feronia*ECO02) until their taxonomic status is investigated in more detail.

Another interesting species was the endemic *H. julitta* (= *honoria*) that is very morphologically similar to *H. glauconome* (not reported in the Peninsula). In fact, previous investigators have considered *H. julitta* as a subspecies of *H. glauconome*, but there are significant genitalic differences between the two species [30]. Our results support this conclusion as *H. julitta* showed 2% divergence from *H. glauconome* (Figure 5). Although the barcodes of these two species only differed by 8 diagnostic nucleotide positions, other studies have revealed cases where different species (e.g. Hesperidae species of *Polyctor*, *Neoxeniades* and *Cobalus*) show only 1–3

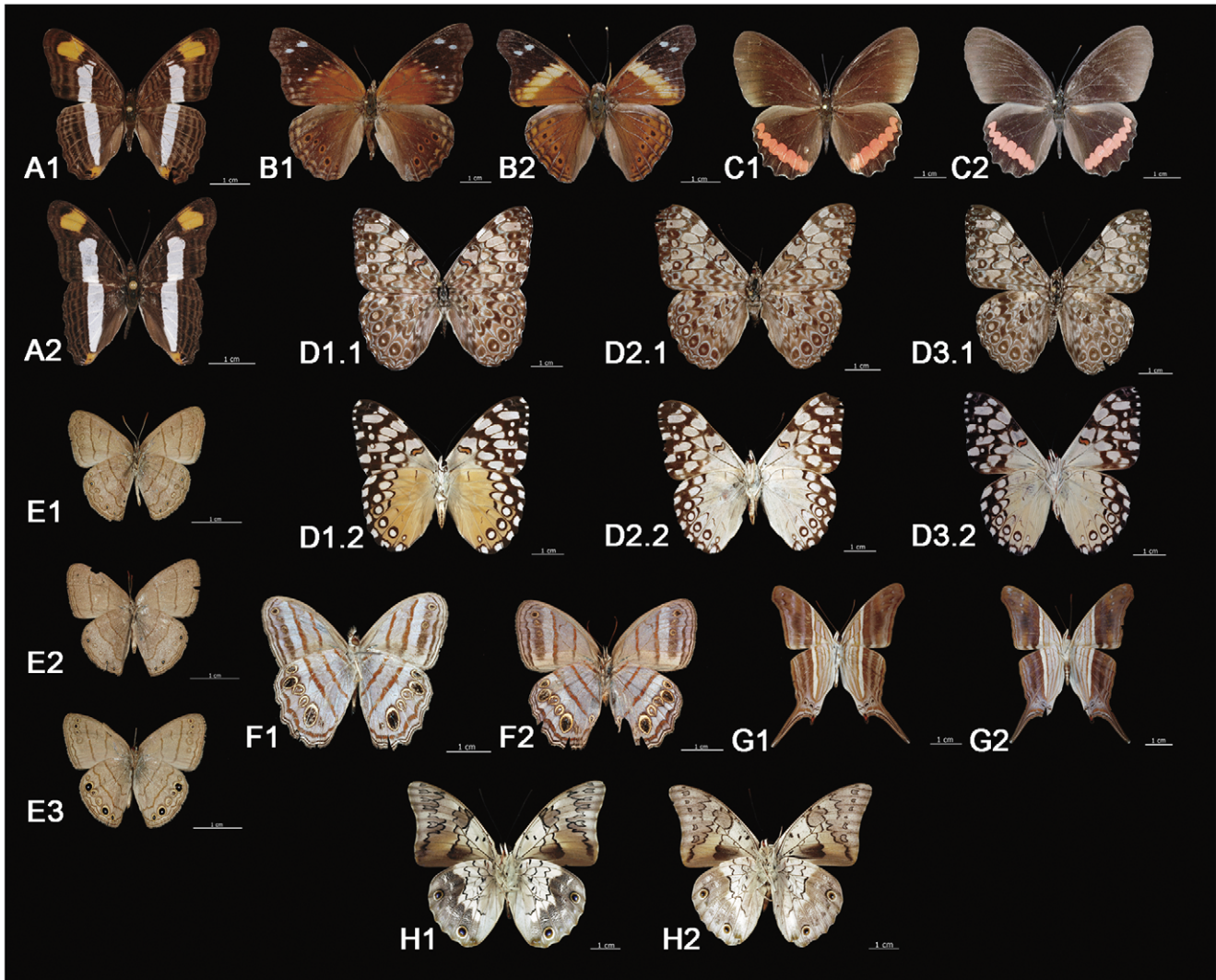


Figure 3. Species of Nymphalidae from the Yucatan Peninsula showing deep sequence divergence (>2%) at COI. Sequences in 7 species were partitioned into two clusters, while one species included three clusters. A1) *Adelpha basiloides*ECO01, A2) *A. basiloides*ECO02; B1) *Asterocampa idyja*ECO01, B2) *A. idyja*ECO02; C1) *Biblis hyperia*ECO01, C2) *B. hyperia*ECO02; D1) *Hamadryas feronia*ECO01, D2) and D3) *H. feronia*ECO02, images D1.1, D2.1 and D3.1 showing dorsal view; E1) *Hermeuptychia hermes*ECO01, E2) *H. hermes*ECO02, E3) *H. hermes*ECO03; F1) *Magneuptychia libye*ECO01, F2) *M. libye*ECO02; G1) *Marpesia chiron*ECO01, G2) *M. chiron*ECO02; H1) *Prepona laertes*ECO01 and H2) *P. laertes*ECO02. Images A, B, C and E are dorsal views while F, G and H are ventral views. Photos by Humberto Bahena.
doi:10.1371/journal.pone.0027776.g003

diagnostic substitutions in the barcode region [24]. No standard sequence threshold separates species and the discrimination of closely allied species must often rely on joint information from genetics, morphology, ecology and behavior [19].

Specimens originally identified as *Taygetis thamyra* split into two well-defined clusters. The ID function in BOLD (Table S1) confirmed that one cluster was *T. thamyra* as it showed 100% of similarity to specimens from Costa Rica, while the second cluster

Table 2. Genetic distances (K2P) for the barcode region of the COI gene for 113 species of Nymphalidae from the Yucatan Peninsula.

	Comparisons	Min Dist(%)	Mean Dist(%)	Max Dist(%)	SE Dist(%)
Within Species	4334	0	0.27	1.90	0.005
Within Genus	6605	2.10	7.95	13.33	0.029
Within Family	332267	6.88	13.53	21.04	0.003

doi:10.1371/journal.pone.0027776.t002

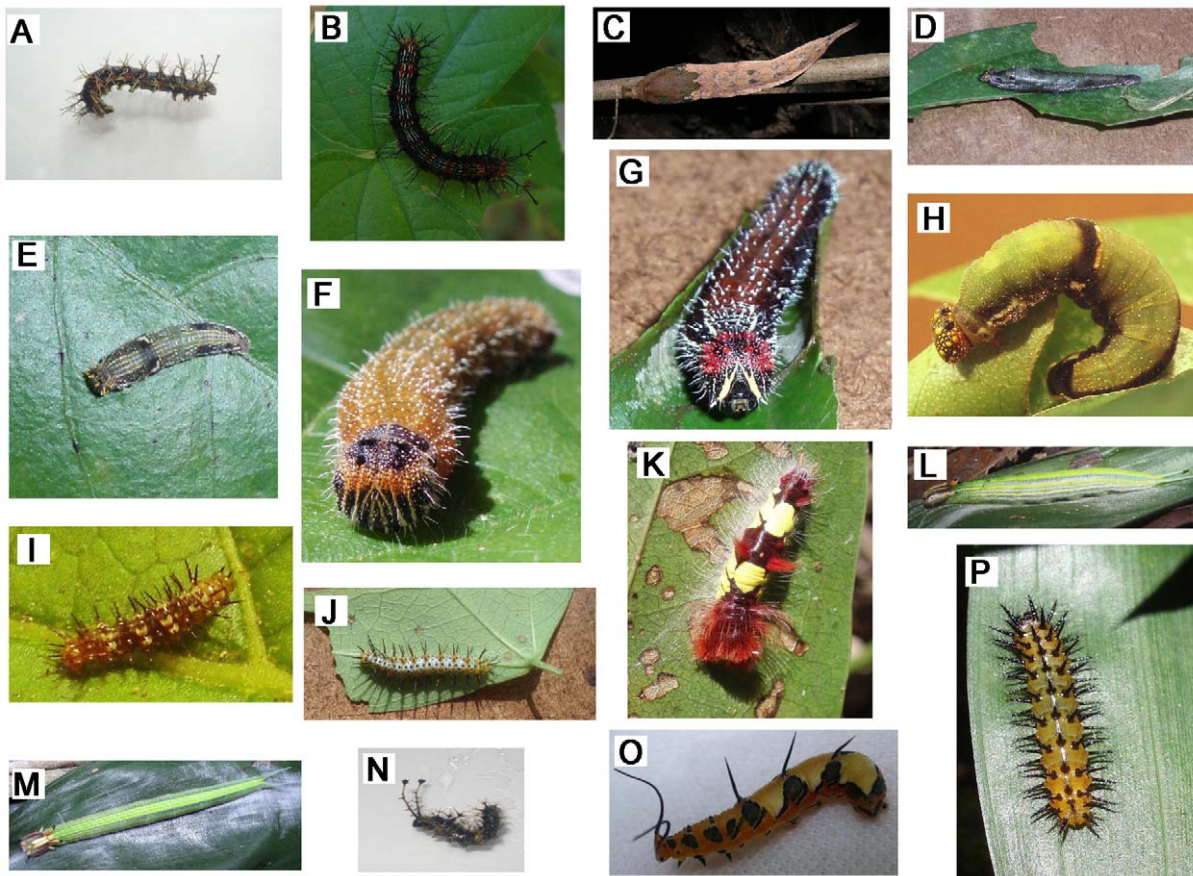


Figure 4. Caterpillars for 16 species identified by matching sequences with the adults DNA barcode reference library. A) *Hamadryas februa*, B) endemic *H. julitta*, C) *Archaeoprepona demophoon*, D) *Consul electra*, E) *Fountainea euryppyle*, F) *Memphis forreri*, G) *M. moruus* H) *M. pithyusa*, I) *Dryas iulia*, J) *Heliconius erato*, K) *Morpho helenor*, L) *Opsiphanes cassina*, M) *O. quiteria*, N) *Biblis hyperia*ECO02, O) *Marpesia petreus* and P) *Chlosyne gaudialis*. Images A and N are from specimens in alcohol. All photos by Tiji Essens and Blanca R. Prado.
doi:10.1371/journal.pone.0027776.g004

Table 3. Species assignments for caterpillars showing that the closest sequence match with adults of Nymphalidae was always much less than 2% (K2P).

Caterpillar species	Mean Dist(%)
<i>Archaeoprepona demophoon</i>	0.04
<i>Biblis hyperia</i> ECO02	0.17
<i>Chlosyne gaudialis</i>	0.22
<i>Consul electra</i>	0.04
<i>Dryas iulia</i>	0.64
<i>Fountainea euryppyle</i>	0.02
<i>Hamadryas februa</i>	0.32
<i>Hamadryas julitta</i>	0.81
<i>Heliconius erato</i>	0.40
<i>Marpesia petreus</i>	0.46
<i>Memphis forreri</i>	0.18
<i>Memphis moruus</i>	0.06
<i>Memphis pithyusa</i>	0.58
<i>Morpho helenor</i>	0.35
<i>Opsiphanes cassina</i>	0.86
<i>Opsiphanes quiteria</i>	0.02

doi:10.1371/journal.pone.0027776.t003

showed 99.7% similarity with *Taygetis laches* from Costa Rica. Past research has shown difficulty in differentiating these two species and confusion by the use of the synonym *T. andromeda* instead *T. laches* [5,34–36], but it was recently demonstrated [23] that *T. thamyra* and *T. laches* are well defined species. Figure 6 shows a NJ tree of Mexican and Costa Rican specimens for both species. Although Mexican and Costa Rican specimens of *T. laches* group together, the two clusters are distinct in the tree, indicating some phylogeographic structure. However, our results confirm the presence of *T. laches* from the Yucatan Peninsula and even from Mexico (Figure 1).

Subspecies are recognized for *Prepona laertes* (eg. *P. laertes octavia* and *P. laertes demodice*) [5], but Janzen [14,23] has suggested that they deserve species status and we support this conclusion. Our *P. laertes* (Figure 3, H) is actually *P. octavia*, while the Costa Rican species is *P. demodice* [14]. Besides this, *Prepona* species show deep sequence divergence in Mexico and Costa Rica [23], forming two clusters for both species (Figure 7). Despite this fact, Mexican specimens are so morphologically similar to their Costa Rican counterparts that they cannot easily be distinguished, suggesting the need for a detailed morphological analysis. A recent barcode study on Mexican Preponini also noted the need for more detailed work on this group [37].

Seven other species were split in two clusters and one species was partitioned into three clusters that do not correspond to any known taxa. We ran the BOLD ID engine using the public

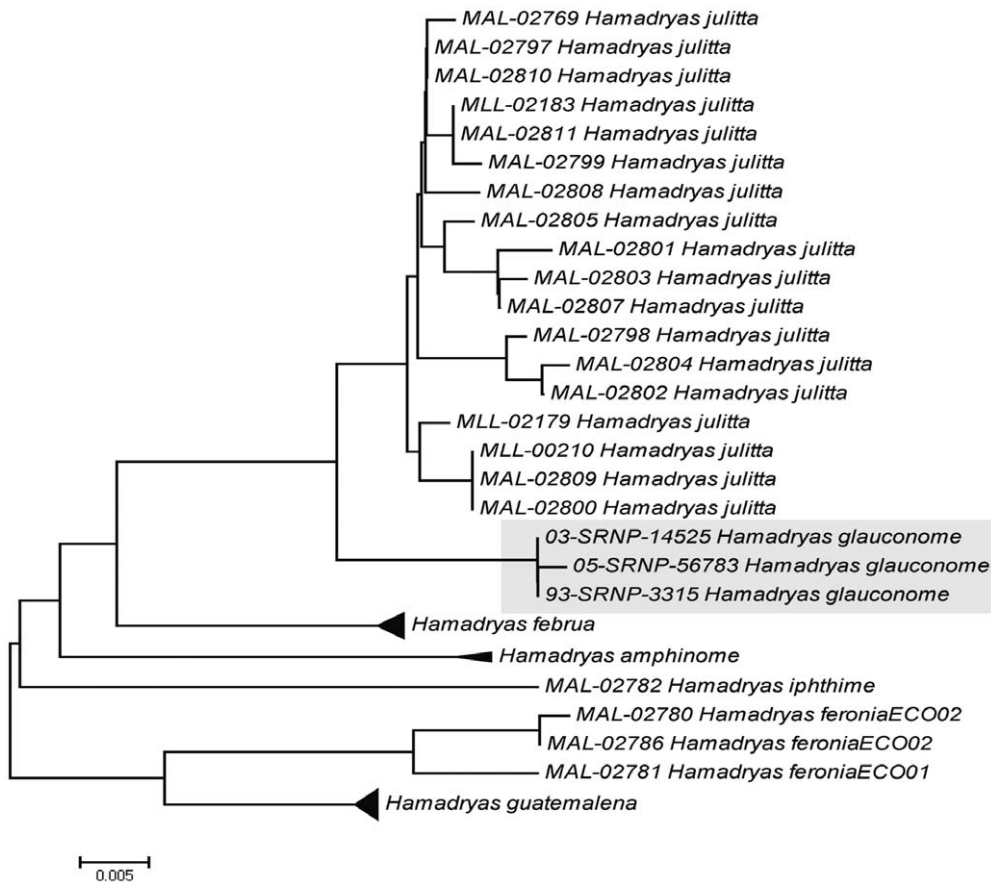


Figure 5. Neighbor-joining tree for the genus *Hamadryas*. *H. julitta*, an endemic from the Yucatan Peninsula, is most closely related to *H. glauconome* from Costa Rica (in grey). Barcoding also revealed *H. iphthime*, a species overlooked in the collection because of its close similarity to *Hamadryas feronia*, and two clusters of *H. feronia*. doi:10.1371/journal.pone.0027776.g005

database to seek matches with these splits (Table S1) and found that some of these species have similar splits in Costa Rica [11] (eg. *Adelpha basiloides* and *Biblis hyperia*, including three cluster in the latter species). Table 1 shows the species with splits and the matching taxa in the public species database on BOLD. The results also strongly suggest the presence of a cryptic species complex in *Hermempychia*, as this species splits in three clusters, but none matched with any records on BOLD (Figure 3, Table 1).

One of the clusters in three other species with splits, *A. idyja* (ECO01), *M. libye* (ECO02) and *P. laertes* (ECO01) matched with records for the same species in BOLD (Table 1). In the case of *A. idyja*, the subspecies *A. idyja argus* is reported from Mexico and a “melanic” form is recognized for this species [29]. Nevertheless, the deep divergence suggests that they are actually two species (Figure 3, B). Further work is needed to determine if this “unknown” cluster is actually the subspecies *A. idyja idyja* that has not previously been reported from Mexico as its distribution only includes Cuba, Isla de la Juventud, Hispaniola and Puerto Rico [38]. If so, both should be raised to a species level. As in this species, the other unknown clusters of *M. libye* (ECO01) and *P. laertes* (ECO02) need to be studied in detail, because current evidence indicates that they are also new species. In *Marpesia chiron* it is necessary to barcode more specimens as one cluster is only represented by one specimen and both clusters match with *Marpesia chiron* from BOLD (Table 1), and they not show any obvious morphological difference (Figure 3, G).

Caterpillar identification

As in other studies that have used the BOLD ID engine to identify caterpillars [18], our analyses unambiguously assigned the 71 caterpillars that we analyzed to adults of 16 species of Nymphalidae analyzed in this study (Figures 2 and 4). Three specimens lacked a sequence record, but after the other larvae were identified by sequence analysis, it was possible to identify them by morphological comparisons.

Our work led to the first recognition of the caterpillar of the endemic species *Hamadryas julitta* (Figure 4, B) and revealed that it feeds on *Dalechampia schottii* (identified by images), a member of Euphorbiaceae. This host plant use is interesting because *H. glauconome* feeds on *D. scandens* in Costa Rica [11,30] and both plant species occur in the Yucatan Peninsula, but *D. schottii* is endemic here [39,40]. Nevertheless, more detailed study of food plant selection might help to provide insights into the factors driving speciation in the *H. julitta-glauconome* group.

Final remarks

Extensive DNA barcode work has been carried out on several families of Lepidoptera in Costa Rica, and our study in the tropical southeast of Mexico complements this work, providing a comprehensive test of the efficacy of DNA barcoding for the most diverse of butterfly families, the Nymphalidae. Aside from confirming its effectiveness in species identification, we emphasize the utility of barcode analysis on the curation of natural history

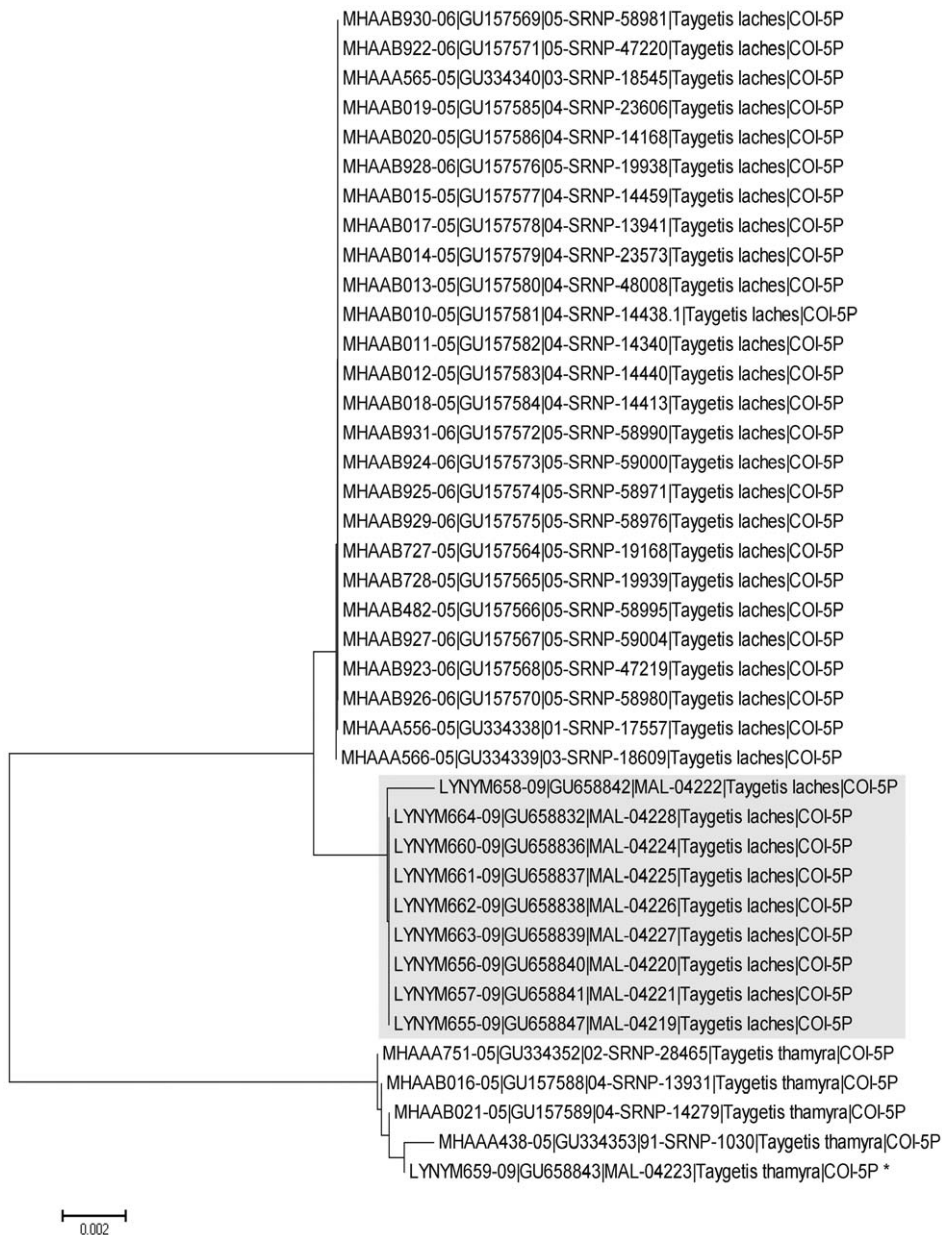


Figure 6. NJ tree showing specimens of *T. laches* and *T. thamyra* from Yucatan and Costa Rica. Specimens of *T. laches* (in grey) from the Yucatan group together and are differentiated from Costa Rican specimens, although they have less than 2% K2P divergence indicating they are likely geographic forms of a single species. The record marked with an asterisk derives from a specimen of *T. thamyra* from the Yucatan Peninsula which is grouped with Costa Rican specimens.
 doi:10.1371/journal.pone.0027776.g006

collections. Our work revealed a number of misidentified specimens and overlooked species in the ECOSUR collection. Our investigations also detected eight cases in which members of a species show substantial (>2%) sequence divergence, suggesting possible cases of cryptic species. Detailed analysis of external morphology, genitalia and ecological features are underway to determine if they are new species. We emphasize the need to analyze more specimens at least in those groups where there is either strong evidence or a suspicion of cryptic taxa. As well as its role in detecting overlooked species and misidentified specimens, DNA barcoding is a great asset in extending knowledge of life histories. The identification of immature stages is currently a very challenging task because there is no a key which provides the

diagnostic characters to identify caterpillars to a species level. By contrast, we identified all nymphalid caterpillars that we examined to a species level by matching their barcode sequence to the reference library developed through our work on adults.

The present study highlights the value of constructing barcode reference libraries at regional levels as local factors drive the formation of endemic species. Mexico is such a heterogeneous landscape that it will not be surprising if future barcode studies discover many new cryptic species. We also emphasize the importance of the collective knowledge gained by combining results from different studies such as those carried out in Costa Rica and Mexico. Because access to such data enables morphological comparisons and aids rapid identifications, we conclude

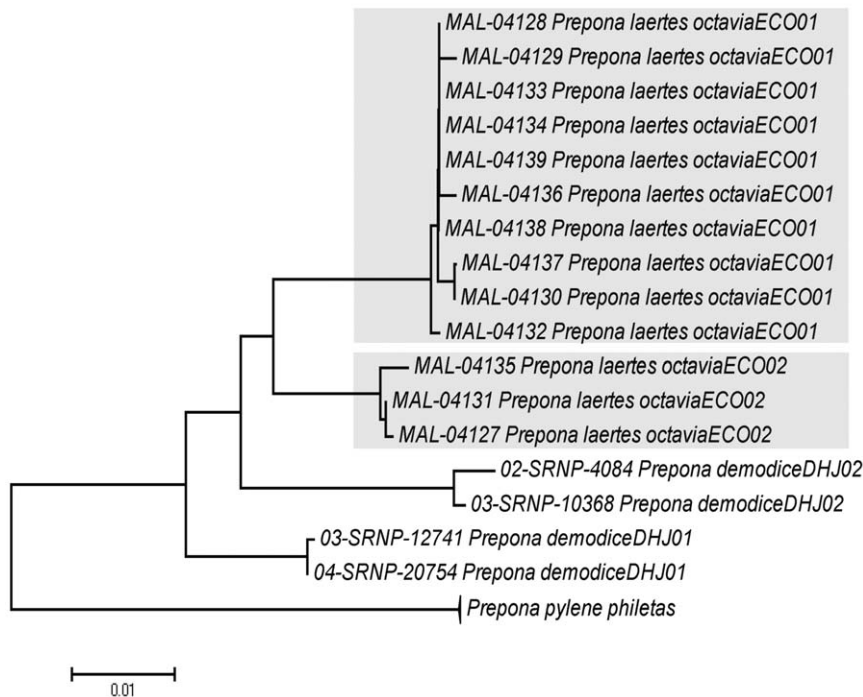


Figure 7. NJ tree showing species of *Prepona* from Yucatan Peninsula and Costa Rica. The two clusters of *P. laertes octavia* from the Yucatan are shown in grey. Note that similarly deep divergence was found in Costa Rican *P. demodice*. These two species were previously thought to be subspecies of *Prepona laertes* (*P. laertes octavia* and *P. laertes demodice*). doi:10.1371/journal.pone.0027776.g007

that is very important to move barcode records into open access as quickly as possible. This present study is just one component of a larger study on the Lepidoptera in Mexico that has already involved the sequence analysis of more than 7,000 larval and adult Lepidoptera. Subsequent studies will test the generality of results obtained in the present investigation.

Materials and Methods

Specimens

Over the past 20 years, staff, undergraduate and graduate students, and colleagues of El Colegio de la Frontera Sur-Chetumal (ECOSUR) have made extensive collections of Lepidoptera which are stored in the zoology museum under the acronym ECO-CH-L. Eight hundred and fifty-seven adults representing 121 morphologically identified species from this collection were analyzed in the present study. These specimens ranged in age from 1–30 years and all were collected from the Yucatan Peninsula including 169 from Yucatan State, 237 from Quintana Roo and 451 specimens from Campeche. Specimens were spread, photographed, labeled and morphologically examined to corroborate their identification. Morphological identifications were made through a) image comparison with specialized guides [e.g. 11,29,31,36,38]; b) specimen comparisons with other collections (e.g. Lepidoptera in the zoology museum of Facultad de Ciencias of Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM); and c) for difficult groups we used specialized identification keys [e.g. 30,33]. In addition, 74 nymphalid caterpillars collected on their host plant were photographed while alive whenever possible. These caterpillars were subsequently preserved in 96% ethanol and retained as vouchers in the Lepidoptera collection (ECO-CH-L). All specimen data including collection locality, GPS coordinates, date, collector, identifier and images are available in the

project titled “Nymphalidae of the Yucatan Peninsula” in the Barcode of Life Data System (BOLD). All COI sequences have also been deposited in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, see Table S2 for accession numbers).

We barcoded at least three adults of each species whenever possible. A 3 mm leg segment was removed from each adult, while our sampling protocol for caterpillars depended on their size. Three thoracic legs were removed from one side of the smallest larvae (2–5 mm length), while just one leg was removed from larger larvae. Each tissue sample was placed in a lysis plate well (96 wells Eppendorf® Plates) with a drop of 96% ethanol.

Barcoding

Sequence analysis was carried at the Canadian Centre for DNA Barcoding following standard protocols [41]. DNA was extracted in 50 µl of lysis mix made of insect lysis buffer with Proteinase K and overnight digestion at 56°C. DNA isolation was done using a Glass Fiber plate (PALL2). The primers LepF (5'-ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG-3') and LepR (5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA-3') were used to PCR amplify a 658 bp fragment of COI. If these primers failed to generate an amplicon, another reverse primer EnhLepR (5'-CTCCWCCAGCAGGATCAAAA-3') was combined with LepF. Finally, a barcode record was recovered from a few of the oldest specimens by using two primer pairs that amplify short segments (307, 408 bp) of the barcode region -- MLepF (5'-GCTTTCCCACGAATAAATAATA-3')-LepR and MLepR (5'-CCTGTTCCAGCTCCATTTTC-3')-LepF.

Each PCR mix contained 6.25 µl of 10% trehalose, 2 µl of ddH₂O, 1.25 µl of 10X buffer, 0.625 µl of 50 mM MgCl₂, 0.125 µl of both primers (10 µM), 0.0625 µl of 10 mM dNTPs, 0.06 µl of Taq Polymerase and DNA template (2 µl). All PCR products were bidirectionally sequenced on an ABI 3730XL and

reads were edited and assembled with Sequencher v. 4.8 (Gene Codes Corporation). Sequences and all collateral data from specimens are available on BOLD (www.boldsystems.org) in the project titled “Nymphalidae of the Yucatan Peninsula”.

Sequences analysis

Sequence divergences were estimated using the Kimura two parameter (K2P) distance model [42]. The DNA-based identifications of specimens were validated whenever possible by examining sequence similarity with public records of other Nymphalidae available on BOLD (Table S1). Through MEGA 4.0 software [43], neighbor joining (NJ) analysis was used to gain a graphic representation of divergence values and caterpillar identification.

Supporting Information

Table S1 Accession codes from specimens of the public database, that match to some of the eight split species with interim name in this study.

(XLS)

References

- Heppner JB (1991) Faunal regions and the diversity of Lepidoptera. *Tropical Lepidoptera* 2: 1–85.
- Grimaldi D, Engel MS (2005) Evolution of the insects. New York, USA: Cambridge University Press. 755 p.
- Powell JA, Opler PA (2009) Moths of western North America. Berkeley, USA. 369 p.
- Llorente-Bousquets J, Gonzalez E, Garcia AN (1996) Breve panorama de la taxonomia de artrópodos en México. In: Llorente-Bousquets J, Garcia AN, Gonzalez E (Ed.), Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: Hacia una síntesis de su conocimiento. Mexico: UNAM-CONABIO-BAYER. pp 3–14.
- Lamas G (2004) Nymphalidae. In: Lamas G (Ed.), Checklist: Part 4a. Hesperoidea-Papilionoidea. In: Heppner, JB (Ed.), Atlas of neotropical Lepidoptera. Volume 5a. Gainesville, Florida, USA: Association for Tropical Lepidoptera; Scientific Publishers. 439 p.
- Scoble MJ (1995) The Lepidoptera: form, function and diversity. New York, USA: Oxford University Press. 404 p.
- Freitas AVL, Brown KS (2004) Phylogeny of the Nymphalidae (Lepidoptera). *Systematic Biology* 53: 363–383.
- Wahlberg N, Weingartner E, Nylin S (2003) Towards a better understanding of the higher systematics of Nymphalidae (Lepidoptera: Papilionoidea). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28: 473–484.
- Peterson A (1962) Lepidoptera and plant infesting Hymenoptera. In: Larvae of insects. Ann Arbor Michigan: Edwards Brothers, Inc. pp 112–204.
- Stehr FW (1987) Order Lepidoptera. In: Immature insects. Dubuque Iowa: Kendall-Hunt Publishing Company. pp 288–596.
- Janzen DH, Hallwachs W (2006) Dynamic database for an inventory of the macrocaterpillar fauna, and its food plants and parasitoids, of Area de Conservación Guanacaste (ACG), northwestern Costa Rica (nn-SRNP-nnnnn voucher codes). <http://janzen.sas.upenn.edu>.
- Miller JC, Janzen DH, Hallwachs W (2006) 100 Caterpillars: portraits from the tropical forest of Costa Rica. Massachusetts, USA: The Belknap Press of Harvard University Press. 264 p.
- Miller JC, Janzen DH, Hallwachs W (2007) 100 Butterflies and moths: portraits from the tropical forest of Costa Rica. Massachusetts, USA: The Belknap Press of Harvard University Press. 256 p.
- Janzen DH, Hallwachs W (2011) Joining inventory by parataxonomists with DNA barcoding of a large complex tropical conserved wildland in Northwestern Costa Rica. *PLoS ONE* 6(8): e18123. doi:10.1371/journal.pone.0018123.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270: 313–321.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR (2003) Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270: S96–S99.
- Adamski D, Landry JF, Passoa S, Tracy RA (2010) History, distribution, and identification of *Exoteleia dodecella* (L.) (Lepidoptera: Gelechiidae) in North America, with insights into the systematics of *Exoteleia* Wallengren using characters of the adult, immatures, bionomics, and DNA barcodes. *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 112: 183–206.
- Hrcek J, Miller SE, Quicke DJJ, Smith A (2011) Molecular detection of trophic links in a complex insect host-parasitoid food web. *Molecular Ecology Resources* 11: 786–794.
- Janzen DH, Hallwachs W, Burns JM, Hajibabaei M, Bertrand C, et al. (2011) Reading the complex skipper butterfly fauna of one tropical place. *PLoS ONE* 6(8): e19874. doi:10.1371/journal.pone.0019874.
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 14812–14817.
- Hebert PDN, deWaard JR, Landry JF (2010) DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. *Biology Letters* 6: 359–362.
- Janzen DH, Hajibabaei M, Burns JM, Hallwachs W, Remigio E, et al. (2005) Wedding biodiversity inventory of a large and complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 360: 1835–1845.
- Janzen DH, Hallwachs W, Blandin P, Burns JM, Cadiou JM, et al. (2009) Integration of DNA barcoding into an ongoing inventory of complex tropical biodiversity. *Molecular Ecology Resources* 9: 1–26.
- Burns JM, Janzen DH, Hajibabaei M, Hallwachs W, Hebert PDN (2007) DNA barcodes of closely related (but morphologically and ecologically distinct) species of skipper butterflies (Hesperiidae) can differ by only one to three nucleotides. *Journal of the Lepidopterists' Society* 61: 138–153.
- Burns JM, Janzen DH, Hajibabaei M, Hallwachs W, Hebert PDN (2008) DNA barcodes and cryptic species of skipper butterflies in the genus *Perichares* in Area de Conservación Guanacaste, Costa Rica. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 6350–6355.
- van Velzen R, Bakker FT, van Loon JJA (2007) DNA barcoding reveals hidden species diversity in *Cymothoe* (Nymphalidae). *Proceedings of the Netherlands Entomological Society Meeting* 18: 95–103.
- Wilson JJ, Landry JF, Janzen DH, Hallwachs W, Nazari V, et al. (2010) Identity of the ailanthus webworm moth (Lepidoptera, Yponomeutidae), a complex of two species: evidence from DNA barcoding, morphology and ecology. *ZooKeys* 46: 41–60.
- Grund R, Eastwood R (2010) New Australian butterfly genus *Jameela* gen. nov (Lepidoptera: Lycaenidae: Polyommatinae: Polyommatinini) revealed by morphological, ecological and molecular data. *Entomological Science* 13: 134–143.
- De la Maza, RF (1987) Mariposas Mexicanas. Mexico City: Fondo de Cultura Económica, S. A. de C. V. 302 p.
- Jenkins DW (1983) Neotropical Nymphalidae. I. Revision of *Hamadryas*. *Bulletin of the Allyn Museum* 81: 1–146.
- Luis-Martínez A, Llorente JE, Vargas IF (2003) Nymphalidae de México I (Danainae, Apaturinae, Biblidinae y Heliconiinae): Distribución Geográfica e Ilustración. Mexico City: Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, and Comisión Nacional Para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 249 p.
- Pozo C, Luis-Martínez A, Uc S, Salas N, Maya A (2003) Butterflies (Papilionoidea and Hesperioidea) of Calakmul, Campeche, Mexico. *The Southwestern Naturalist* 48: 505–525.
- Willmott KR (2003) The Genus *Adelpha*. Its Systematics Biology and Biogeography (Lepidoptera: Nymphalidae: Limenitidini). Gainesville, Florida, USA: Scientific Publishers. 322 p.

Table S2 GenBank accession numbers for specimens in the “Nymphalidae of the Yucatan Peninsula” project.
(XLS)

Acknowledgments

Armando Luis-Martínez from UNAM kindly provided access to the MARIPOSA database and identified some specimens of Nymphalidae in the ECOSUR Lepidoptera collection. This paper represents a contribution from the Mexican Barcode of Life (MEXBOL) network and the Chetumal node where some of the samples were processed.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BP CP MV-M PH. Performed the experiments: BP. Analyzed the data: BP CP MV-M PH. Contributed reagents/materials/analysis tools: PH. Wrote the paper: BP CP MV-M PH.

34. Butler AG (1868) Catalogue of diurnal Lepidoptera of the family Satyridae in the collection of the British Museum. London: Taylor and Francis. 211 p.
35. Godman FD, Salvin O (1879) *Biologia Centrali Americana. Zoologia, Insecta*, eds. Lepidoptera-Rhopalocera. Volume I. London: Dulau & Co., Bernard Quaritch. 487 p.
36. DeVries PJ (1987) *The Butterflies of Costa Rica and Their Natural History, Papilionidae, Pieridae, Nymphalidae*. Volume 1. New Jersey, USA: Princeton University Press. 327 p.
37. Escalante P, Ibarra-Vazquez A, Rosas-Escobar P (2010) Tropical montane nymphalids in Mexico: DNA barcodes reveal greater diversity. *Mitochondrial DNA* 21(S1): 30–37.
38. Warren AD, Davis KJ, Grishin NV, Pelham JP, Stangeland EM (2011) Interactive Listing of American Butterflies.[9-VIII-11]<<http://www.butterfliesofamerica.com/>>.
39. Standley PC (1930) Flora of Yucatan. *Field Museum of Natural History, Botanical Series* 3(3): 157–492.
40. Tropicos.org (2011) Missouri Botanical Garden [13-Feb-2011] <http://www.tropicos.org/Name/12801235>.
41. Ivanova NV, deWaard JR, Hebert PDN (2006) An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes* 6: 998–1002.
42. Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111–120.
43. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596–1599.

4. Discusión

El total de especies encontradas (1,489) representa 25% de las reportadas previamente para México y 3% de las especies registradas para la región neotropical (Heppner, 1991). Sin embargo, este estudio incrementó el conocimiento de la diversidad de palomillas presentes en México de 4,200 a 4,525 especies, ya que 325 especies obtenidas en estado larval y/o adulto, es decir, 32% de lo encontrado para este grupo, son nuevos registros para el país, principalmente de las familias Noctuidae, Geometridae y Crambidae. Este porcentaje, es elevado, considerando que la Península de Yucatán constituye apenas 7.1% de la superficie del país (INEGI, 2012). Así mismo, tomando en cuenta que estos registros lo conforman familias poco estudiadas, difícilmente se consiga tal resultado con la taxonomía tradicional en un tiempo reducido. Es interesante señalar que 60 de los nuevos registros para México se colectaron únicamente en estado larval y por consiguiente solo pudieron ser identificadas a través de los códigos de barras.

De acuerdo a estimaciones de la diversidad de palomillas realizadas para Norteamérica y Centro América (Powell y Opler, 2009), es probable que existan nuevas especies entre los clusters con clave temporal que no se pudieron identificar a especie. En el caso de mariposas, a pesar de ser un grupo bien estudiado en el país (Michán et al., 2005), se pudo reconocer a tres especies que habían pasado desapercibidas en la colección y se confirmó la presencia de *Taygetis laches* en México (tratada con detalle más adelante y en el artículo). Además, una vez definido el estatus de las nueve especies crípticas encontradas, el número de especies conocidas para el grupo de mariposas aumentará.

El presente estudio aportó a la colección del Museo de Zoología de ECOSUR-Chetumal alrededor de 2,400 ejemplares de palomillas y aumentó a más de 2,000 la colección de larvas de Lepidoptera. De esta manera se establece la colección de referencia de palomillas para la Península con 719 especies. El estado curatorial de la colección de larvas mejoró notablemente debido a que los códigos de barras permitieron su identificación y por lo tanto incrementó el número de especies reconocidas a 498. En mariposas, se corroboró el 96% de las determinaciones, totalizando 477 especies analizadas, reconociendo cuatro especies de Nymphalidae que habían sido confundidas con especies más comunes y nueve casos de especies crípticas.

El alto porcentaje de especies corroboradas para mariposas, es un indicador del intensivo trabajo taxonómico invertido en este grupo en los últimos 20 años. Se tienen antecedentes de la colaboración de diversos expertos con esta colección, lo que ha ayudado a mantener la calidad de las determinaciones. A pesar de esto, los códigos de barras han resaltado la necesidad de enfocar esfuerzos en ciertos grupos ya que se han descubierto especies crípticas en algunos Nymphalidae como lo demuestran este y otros estudios (van Velzen, 2007; Janzen et al., 2009). Otro grupo dentro de las mariposas que es necesario estudiar más a fondo es la familia Hesperidae, debido a que también existen antecedentes de especies crípticas (Hebert, 2004a; Burns et al., 2008; Janzen et al., 2011), sobretodo para la especie *Astraptes fulgerator*, en la cual se ha descubierto un complejo de hasta 10 especies crípticas, distinguibles únicamente mediante los códigos de barras y aspectos ecológicos como las plantas de alimentación de sus larvas (Hebert, 2004a).

Los resultados de la identificación de 90% de los ejemplares adultos de palomillas a nivel de género o especie mediante los códigos de barras en este estudio, es comparable con lo obtenido en un estudio también con palomillas en un parque nacional de Canadá, el cual fue realizado por personal que no era experto en la taxonomía de este grupo y en el que gracias a los códigos de barras se logró la identificación de 94% de los ejemplares colectados (deWaard et al., 2009).

El trabajo de los taxónomos no expertos o parataxónomos ha sido fundamental para el desarrollo de inventarios faunísticos (Janzen y Hallwachs, 2011b), sobretodo en lugares con gran diversidad y pocos recursos económicos. Muchos de los estudios de la Península citados anteriormente y de Guanacaste en Costa Rica han sido realizados en gran parte con la ayuda de parataxónomos; sin embargo, su trabajo se encuentra limitado en ciertos grupos poco o nada estudiados, en donde es fundamental un conocimiento más especializado, siendo necesario el análisis de la genitalia para hacer posible la identificación de especies (v. gr. Hesperiidae y gran parte de las palomillas). Los estudios con lepidópteros (deWaard et al, 2009; Janzen y Hallwachs, 2011b), incluyendo el presente, demuestran la utilidad de los códigos de barras complementando el trabajo, tanto de los taxónomos como de los parataxónomos, principalmente para los segundos en aquellos sitios en donde no se tienen especialistas para todos los grupos, pero que se necesita tener una idea confiable y rápida de la diversidad presente. Así mismo, este estudio resalta la importancia de incluir los códigos de barras en el trabajo de los especialistas para el descubrimiento de nuevas especies o aclarar algunas dudas en relación a la taxonomía de grupos de difícil identificación.

4.1 El caso de Nymphalidae

La familia Nymphalidae es la más conspicua de las mariposas debido a su diversidad de formas y colores, por consiguiente ha sido objeto de diversas investigaciones. El presente trabajo complementa y reafirma lo que recientemente se ha demostrado en otros estudios de esta familia (van Velzen et al., 2007, Janzen et al., 2009), de que existen especies que pasan desapercibidas al ser confundidas con especies afines conocidas y más “comunes” o por constituir complejos de especies que no se habían descubierto y que por tal motivo representan nuevas especies en algunos casos.

Con la ayuda de los códigos de barras, se tienen reportadas posibles nuevas especies de Nymphalidae en Costa Rica, a través de especies crípticas v. gr. *Biblis hyperia*, *Adelpha basiloides*, *Hamadryas feronia* (como *Hamadryas guatemalena*DHJ02) y *Prepona laertes demodice* (como *P. demodice*) (Janzen et al., 2009; Janzen y Hallwachs, 2011a, 2011b). Estas mismas especies, con sus respectivos clusters fueron encontrados también para la Península de Yucatán, con excepción de *P. demodice*, que en su lugar se presenta *P. laertes octavia* y al igual que su especie hermana mostró divergencia intraespecífica formando dos clusters. Además para las especies *Asterocampa idyja*, *Magneuptychia libye*, *Marpesia chiron* y *Hermeuptychia hermes* se encontró divergencia intraespecífica mayor al 2%, para ser consideradas como dos o tres especies.

Los códigos de barras distinguieron cuatro especies más, *Adelpha malea*, *Adelpha iphiclus*, *Hamadryas iphitime* y *Taygetis laches* las cuales habían sido confundidas con las especies morfológicamente similares *Adelpha barnesia*, *Adelpha iphicleola*, *Hamadryas feronia* y *Taygetis thamyra* respectivamente. *T. laches* es nuevo registro para México la cual había sido mal identificada debido a su gran parecido

morfológico a la especie *T. thamyra*. Esta última previamente reportada para México por Warren et al. (2011). Con estas cuatro especies, aunadas a las nueve posibles nuevas especies crípticas, el número de registros de Nymphalidae para México en general y para la Península de Yucatán en particular, aumentarían a 580 y a 130 respectivamente. No obstante, es preciso hacer un análisis más profundo de estas especies crípticas mediante morfología para definir su estatus. Si bien los códigos de barras genéticos proveen al taxónomo de señales para enfocar la atención en aquellos organismos que podrían resultar ser nuevas especies y de esta manera acelerar su descubrimiento (Hajibabaei et al., 2007), en el caso de los lepidópteros el análisis debe complementarse con aspectos de morfología como genitalia, ecología y de ser posible tener la historia natural de las probables nuevas especies (Janzen et al., 2009, 2011).

El conocimiento de la historia natural de las especies de Lepidoptera es importante para la taxonomía y sistemática del Orden, como se ha indicado previamente en Nymphalidae (Müller, 1886; Llorente-Bousquets et al., 1993; Freitas y Brown, 2004). En este estudio, con el 100% de larvas de Nymphalidae identificadas, se demostró que los códigos de barras para la vida agilizan el conocimiento del estado larval de las especies relacionándolos mediante la comparación de secuencias con adultos, los cuales son muchos más fáciles de identificar. Por consiguiente podemos conocer los estados inmaduros de las especies de una manera más rápida y confiable (Hrcek et al., 2011). Aunque lo ideal sería hacer un seguimiento de todo el ciclo de vida registrando plantas hospederas y comportamiento (Janzen y Hallwachs, 2011a, 2011b), los códigos de barras ofrecen una excelente alternativa en lugares donde no se tienen los recursos, personal y tiempo disponible para seguir el ciclo de todas las especies.

Se reporta por vez primera la larva de *Hamadryas julitta* la cual es endémica junto con su planta hospedera *Dalechampia schottii*, para la Península (Standley, 1930; Missouri Botanical Garden, 2011). Comparaciones hechas mediante BOLD con su especie hermana *H. glauconome* (no reportada para la Península), distribuida desde el sur de Texas hasta Costa Rica y tal vez Panamá (Warren et al., 2011), demuestran la cercanía de las dos especies con una similitud en las secuencias del COI de alrededor de 98%. Es interesante señalar que *H. glauconome* se alimenta de *D. scandens* (Jenkins, 1983; Janzen y Hallwachs, 2011a) y que esta planta también se encuentra registrada para la Península (Missouri Botanical Garden, 2011). Sin embargo, la larva de *H. julitta* se encontró alimentándose precisamente de la especie endémica *D. schottii*. Pareciera que esto jugó un papel fundamental en el proceso de aislamiento y especiación y delimitó la distribución de *H. julitta* hacia la Península de Yucatán. La ausencia de *H. glauconome* en la Península, a pesar de encontrarse su planta de alimentación, podría corresponder con la altitud ya que su distribución en el país coincide con las vertientes del Atlántico y Pacífico, siguiendo el patrón del sistema montañoso, se interrumpe en la Península (Luis-Martínez et al., 2003) y continua hacia el sur en Centroamérica (Warren et al., 2011). Así mismo, la abundancia de la planta de alimentación pudo ser decisiva en determinar su distribución. Sin embargo, los estudios acerca de estas plantas se limitan a listados florísticos los cuales no reflejan las abundancias de las especies (Missouri Botanical Garden, 2011).

4.2 Identificación de larvas

El análisis morfológico y molecular permitió la identificación a nivel de familia en casi 77% de las larvas. Los demás ejemplares presentaron inconsistencias entre los dos

métodos de identificación. No obstante, 13 de estos casos son por diferencias en el sistema de clasificación (en palomillas) y de los restantes, la mayoría son casos de familias poco estudiadas como Elachistidae. Algunas de las razones para la falta de conocimiento en esta familia es que son de tamaño pequeño, poco atractivas, tienen hábitos crepusculares y los adultos no son atraídos hacia la luz. Además, hacer un seguimiento de su ciclo de vida es difícil ya que viven entre la dermis de las hojas (mineros de hojas) (Powell y Opler, 2009).

El número de las familias identificadas en estado larval se incrementó a 34 con ayuda de los códigos de barras. Siete familias de estas (Gelechiidae, Hepialidae, Pterophoridae, Tortricidae, Urodidae, Xyloryctidae y Zygaenidae) no se pudieron determinar previamente con el análisis morfológico.

Es importante señalar que del total de especies encontradas en estado larval (498), 86.75% pertenecen a palomillas y 13.25% (66 especies) pertenecen al grupo de mariposas, de las cuales más de la mitad correspondieron a especies de la familia Hesperidae. La familia Elachistidae resultó con más especies, sin embargo, la mayoría no tiene identificación específica y están con código temporal. Se tiene 43% de todas las especies en estado larval con código temporal, es decir, únicamente un poco más de la mitad pudieron ser identificadas a especie.

Al realizar la revisión de las 189 especies que fueron registradas tanto en su estado larval como adulto, no se encontró registro en la literatura acerca del estado larval de 24 de estas especies. Como era de esperarse la mayoría pertenecen a lepidópteros nocturnos (21 especies) que son los menos conocidos. Lo que resultó inesperado es no encontrar en la literatura la larva de las especies de mariposas *Zaryaspes mys* (Hesperidae), *Hamadryas julitta* (Nymphalidae) y *Emesis liodes*

(Riodinidae). En el caso de *H. julitta*, el desconocimiento se debe a que es endémica de la Península de Yucatán y los estudios con larvas en esta zona son nulos. La especie *Emesis liodes* se distribuye en México y Guatemala (Warren et al., 2011), y el registro de la larva en el presente estudio complementa el reporte realizado anteriormente acerca de los huevos, pero en el cual no se logró registrar la larva ya que se perdieron las únicas dos al eclosionar los huevos (Kendall, 1976). En el caso de *Zariaspes mys* a pesar de tener una distribución amplia (Warren et al., 2011) aparentemente es una especie poco común como lo demuestran los escasos registros reportados en Guanacaste en Costa Rica que es una zona con alta diversidad de lepidópteros (Janzen y Hallwachs, 2011a).

Como se puede observar, el éxito en la identificación de estados inmaduros radica en tener una base de referencia completa de las secuencias como también se demostró en Nueva Guinea (Hrcek et al., 2011). Ambos estudios representan los primeros trabajos realizados analizando las muestras de larvas a gran escala. Aunque Janzen y colaboradores (2005, 2009) y Janzen y Hallwachs (2011a, 2011b) también trabajan con larvas, haciendo un seguimiento del ciclo de vida hasta que son adultos y llevando un registro preciso de aspectos ecológicos y etológicos; sin embargo, no se tiene un voucher del ejemplar en algún estadio larval (solo cuenta con fotografías), a diferencia de contar con ejemplares voucher que pueden servir para encontrar caracteres diagnósticos mediante métodos de microscopía más sofisticados (Adamski et al., 2009; Francini et al., 2011). De acuerdo a lo anterior, la importancia de este trabajo es la conservación de los vouchers de todos los ejemplares analizados.

4.3 Comentarios finales

Son diversas las aplicaciones de los códigos de barras para la vida, desde la identificación de adultos y larvas hasta el descubrimiento de nuevas especies, incluso en grupos bien estudiados como los Nymphalidae. Las implicaciones y aplicaciones de estos conocimientos son numerosas, se pueden detectar especies invasoras rápidamente y con precisión (deWaard et al., 2009) e implementar de forma temprana los programas de conservación. Así mismo, se pueden usar para el conocimiento de la historia natural de las especies mediante la identificación de estados inmaduros, los cuales cada vez son más aprovechados para establecer relaciones evolutivas. También se ha usado como herramienta útil en los estudios filogenéticos corroborando las identificaciones de los ejemplares analizados (Regier et al., 2009). Se pueden estudiar las interacciones tróficas en distintos niveles v. gr. relación de las larvas con sus plantas hospederas (Hebert et al., 2004a; Janzen y Hallwachs, 2011a, 2011b), o la interacción de las larvas con sus parasitoides (Hrcek et al., 2011). Además, como lo demuestra el artículo derivado de la presente tesis, se pueden hacer comparaciones con datos provenientes de otros lugares y utilizar esta información para conocer mejor la distribución de las especies.

Este proyecto continúa en desarrollo y actualmente se tienen aproximadamente 7,500 registros de adultos y larvas, por lo que se sigue trabajando con la información generada, además de incorporar los datos de genitalia para incrementar el conocimiento de la diversidad de Lepidoptera de México y del mundo.

5. Conclusiones

1. Se reportan un total de 1,489 especies de mariposas y palomillas (larvas y adultos) de las cuales 60% fueron identificadas con los códigos de barras.

2. Con el presente estudio, el número de especies de palomillas reportado para la Península aumentó a 683, siendo alrededor de 47% nuevos registros para México, demostrando la necesidad de que el esfuerzo se enfoque a este grupo, cuya diversidad es poco conocida para el país.

3. Con los códigos de barras genéticos se logró la identificación a nivel específico de 51% de las larvas de Lepidoptera, comprendidas en 282 especies. El porcentaje restante se encuentra agrupado en 216 clusters sin identificar, con clave temporal en espera de que la base de referencia de Lepidoptera en BOLD continúe incrementándose y en un futuro se puedan obtener sus identificaciones específicas.

4. En el presente estudio se registran nueve especies crípticas de Nymphalidae. Así mismo, se reconocen cuatro especies de esta familia en la colección que habían sido mal determinadas, *Adelpha malea*, *Adelpha iphicleus*, *Hamadryas iphime* y *Taygetis laches*, las cuales fueron confundidas con especies morfológicamente parecidas y más comunes: *Adelpha barnesia*, *Adelpha iphicleola*, *Hamadryas feronia* y *Taygetis thamyra*, respectivamente.

5. Se confirma la presencia de *Taygetis laches* en México que previamente era confundida con *T. thamyra* debido a su parecido morfológico.

6. El presente estudio representa los primeros registros de lepidópteros mexicanos en el proyecto Internacional de los Códigos de barras de la vida y es el punto de partida para investigaciones futuras.

7. Es necesario trabajar más en aquellos grupos, sobretodo de palomillas, en los cuales la información es escasa para el país y complementar con información morfológica como genitalia en aquellos casos que sea necesario.

6. Literatura citada

- Adamski, D., Boege, K., Landry, J.F. y J.C. Sohn (2009) Two New Species of *Wockia* Heinemann (Lepidoptera: Urodidae) from Coastal Dry-Forests in Western Mexico. *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 111: 166-182.
- Adamski, D., Landry, J.F., Passoa, S. y R.A. Tracy (2010) History, distribution, and identification of *Exoteleia dodecella* (L.) (Lepidoptera: Gelechiidae) in North America, with insights into the systematics of *Exoteleia* Wallengren using characters of the adult, immatures, bionomics, and DNA barcodes. *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 112: 183-206.
- Balcázar-Lara, M.A. y C.R. Beutelspacher (2000a) "Saturniidae (Lepidoptera)" en Llorente-Bousquets, J., González E. y N. Papavero (eds.) *Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: Hacia una síntesis de su conocimiento*. México: UNAM-CONABIO-BAYER. pp. 501-513.
- Balcázar-Lara, M.A. y C.R. Beutelspacher (2000b) "Arctiidae: Lithosiinae, Arctiinae, Pericopinae (Lepidoptera)" en Llorente-Bousquets, J., González E. y N. Papavero (eds.) *Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: Hacia una síntesis de su conocimiento*. México: UNAM-CONABIO-BAYER. pp. 515-525.
- Ball, S.L. y P. Hebert (2005) Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. *Journal of the North American Benthological Society* 24(3): 508–524.
- Barret, R.D.H. y P. Hebert (2005) Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology* 83: 481–491.
- Berdugo, P.D. (2005) *Lepidoptera: Rhopalocera, lista de especies de la selva baja caducifolia de Umán, Yucatán*. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico Agropecuario No. 2. 58 p.
- Beutelspacher, C.R. (1992) *Catálogo de la colección Roberto Müller (Lepidoptera: Heterocera) del museo de historia natural de la ciudad de México*. Cuadernos de Biología. UNAM, 465 p.

- Borisenko, A.V., Lim, B.K., Ivanova, N.V., Hanner, R.H. y P.D.N. Hebert (2007) DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. *Molecular Ecology Notes* 8 : 471–479. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01998.x.
- Burns, J.M., Janzen, D.H., Hajibabaei, M., Hallwachs, W. y P.D.N. Hebert (2007) DNA barcodes of closely related (but morphologically and ecologically distinct) species of skipper butterflies (Hesperiidae) can differ by only one to three nucleotides. *Journal of the Lepidopterists' Society* 61: 138-153.
- Burns, J.M., Janzen, D.H., Hajibabaei, M., Hallwachs, W. y P.D.N. Hebert (2008) DNA barcodes and cryptic species of skipper butterflies in the genus *Perichares* in Area de Conservacion Guanacaste, Costa Rica. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 6350-6355.
- Caterino, M.S. y A.K. Tishechkin (2006) DNA identification and morphological description of the first confirmed larvae of Hetaeriinae (Coleoptera: Histeridae). *Systematic Entomology* 31, 405–418.
- Chenuil, A. (2006) Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genetica* 127: 101-120.
- Clare, E.L., Lim, B.K., Engstrom, M.D., Eger, J.L. y P. Hebert (2006) DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Molecular Ecology Notes*. 7: 184–190. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01657.x.
- Clare, E.L., Lim, B.K., Fenton, M.B. y P.D.N. Hebert (2011) Neotropical Bats: Estimating Species Diversity with DNA Barcodes. *PLoS ONE* 6(7): e22648. doi:10.1371/journal.pone.0022648.
- Costa, F.O., deWaard, J.R., Boutillier, J., Ratnasingham, S., Dooh, R.T., Hajibabaei, M. y P.D.N. Hebert (2007) *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 64: 272-295.
- Davis, D.R. (2000) "Tineoidea y Gracillarioidea (Lepidoptera)" en Llorente-Bousquets, J., González E. y N. Papavero (eds.) *Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de*

artrópodos de México: Hacia una síntesis de su conocimiento. México: UNAM-CONABIO-BAYER. pp. 469-482.

De la Maza, R. (1987) *Mariposas mexicanas. Guía para su colecta y determinación*. Fondo de cultura económica. México. 302 p.

D'Abrera, B. (1981) *Butterflies of the Neotropical Region. Part I: Papilionidae, Pieridae*. Hill House Publishers. Victoria, Australia. 172 p.

D'Abrera, B. (1984) *Butterflies of the Neotropical Region. Part II: Danaidae, Ithomiidae, Heliconidae, Morphidae*. Hill House Publishers. Victoria, Australia. 210 p.

D'Abrera, B. (1987a) *Butterflies of the Neotropical Region, Part III: Brassolidae, Acraeidae, Nymphalidae (Partim)*. Hill House Publishers. Victoria, Australia. 144 p.

D'Abrera, B. (1987b) *Butterflies of the Neotropical Region, Part IV: Nymphalidae (Partim)*. Hill House Publishers. Victoria, Australia. 150 p.

D'Abrera, B. (1988) *Butterflies of the Neotropical Region, Part V: Nymphalidae (conc.), Satyridae*. Hill House Publishers. Victoria, Australia. 190 p.

D'Abrera, B. (1994) *Butterflies of the Neotropical Region, Part VI: Riodinidae*. Hill House Publishers. Victoria, Australia. 216 p.

D'Abrera, B. (1995) *Butterflies of the Neotropical Region, Part VII: Lycaenidae*. Hill House Publishers. Victoria, Australia. 171 p.

DeVries, P.J. (1987) *The Butterflies of Costa Rica and Their Natural History, Papilionidae, Pieridae, Nymphalidae*. Volume 1. New Jersey, USA: Princeton University Press. 327 p.

DeVries, P.J. (1997) *The Butterflies of Costa Rica and Their Natural History, Riodinidae*. Volume 2. New Jersey, USA: Princeton University Press. 288 p.

- deWaard, J.R., Landry, J., Schmidt, B.C., Derhouseoff, J., McLean, J.A. y L.M. Humble (2009) In the dark in a large urban park: DNA barcodes illuminate cryptic and introduced moth species. *Biodiversity and Conservation* 18: 3825-3839.
- Dincă, V., Zakharov, E.V., Hebert, P.D.N. y R. Vila (2010) Complete DNA barcode reference library for a country's butterfly fauna reveals high performance for temperate Europe. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 278: 347–355.
- Ehrlich, P.R., (1984) "The structure and dynamics of butterfly populations" en Vane-Wright, R.I. y P.R. Ackery (eds.), *The Biology of Butterflies*. Symposium of the Royal Entomological Society of London, No. 11. Academic Press, Londres, Reino Unido. pp. 25-40.
- Ehrlich, P.R. y P.H. Raven, (1965) Butterflies and plants: A study in coevolution. *Evolution* 18: 586-608.
- Francini, R.B., Proença, E. y Freitas, A.V.L. (2011) Immature stages of *Actinote zikani* (Nymphalidae: Heliconiinae), a critically endangered butterfly from southeastern Brazil. *Tropical Lepidoptera Research* 21(1): 20-26.
- Freitas, A.V.L. y Brown, K.S. (2004) Phylogeny of the Nymphalidae (Lepidoptera). *Systematic Biology* 53: 363–383.
- Grund, R. y R. Eastwood (2010) New Australian butterfly genus *Jameela* gen. nov (Lepidoptera: Lycaenidae: Polyommatinae: Polyommadini) revealed by morphological, ecological and molecular data. *Entomological Science* 13: 134-143.
- Hajibabaei, M., Singer, G.A.C., Hebert, P.D.N. y D.A. Hickey (2007) DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics, *Trends in Genetics* 23(4):167-72.

- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. y J.R. deWaard (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 270: 313–321.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. y J.R. deWaard. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 270: S596–S599.
- Hebert, P.D.N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D.H. y W. Hallwachs (2004a) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 14812-14817.
- Hebert, P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S. y C.M. Francis (2004b) Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol* 2(10): e312.
- Hebert, P.D.N., deWaard, J.R. y J.F Landry (2010) DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. *Biology Letters* 6: 359-362.
- Heppner, J.B. (1991) Faunal Regions and the Diversity of Lepidoptera. *Tropical Lepidoptera* 2: 1-85.
- Hernández-Baz, F. (2011) “Palomillas nocturnas: Arctiidae” en Pozo, C. (ed.) *Riqueza biológica de Quintana Roo. Un análisis para su conservación, Tomo 2*. El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Gobierno del Estado de Quintana Roo y Programa de Pequeñas Donaciones (PPD). México, D.F. p 197-201.
- Hogg, I.D. y P. Hebert. 2004. Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial barcodes. *Canadian Journal of Zoology* 82: 749–754.
- Hoy, M. (2003) *Insect Molecular Genetics: An introduction to principles and applications*. Academic Press. San Diego, California, USA. 544 p.

Hrcek, J., Miller, S.E., Quicke, D.L.J. y A. Smith (2011) Molecular detection of trophic links in a complex insect host-parasitoid food web. *Molecular Ecology Resources* 11: 786-794.

Hubert, N., Hanner, R., Holm, E., Mandrak, N.E., Taylor, E., Burrige, M., Watkinson, D., Dumont, P., Curry, A., Bentzen, P., Zhang, J., April, J. y L. Bernatchez (2008) Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. *PLoS ONE* 3(6): e2490. doi:10.1371/journal.pone.0002490.

INEGI (2012) www.inegi.org.mx [5-II-12]

Ivanova, N.V., deWaard, J.R. y P.D.N. Hebert (2006) An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes* 6: 998-1002.

Janzen, D.H., Hajibabaei, M., Burns, J., Hallwachs, W., Remigio, E. y P.D.N Hebert (2005) Wedding biodiversity inventory of a large and complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 1-11.

Janzen, D.H., Hallwachs, W., Blandin, P., Burns, J.M., Cadiou, J.M, Chacon, I., Dapkey, T., Deans, A.R., Epstein, M.E., Espinoza, B., Franclemont, J.G., Haber, W.A., Hajibabaei, M., Hall, J.P.W., Hebert, P.D.N., Gauld, I.D., Harvey, D.J., Hausmann, A., Kitching, I.J., Lafontaine, D., Landry, J.F., Lemaire, C., Miller, J.Y., Miller, J.S., Miller, L., Miller, S.E., Montero, J., Munroe, E., Green, S.R., Ratnasingham, S., Rawlins, J.E., Robbins, R.K., Rodriguez, J.J., Rougerie, R., Sharkey, M.J., Smith, M.A., Solís, M.A., Sullivan, J.B., Thiaucourt, P., Wahl, D.B., Weller, S.J., Whitfield, J.B., Willmott, K.R., Wood, D.M., Woodley, N.E., y J.J. Wilson (2009) Integration of DNA barcoding into an ongoing inventory of complex tropical biodiversity. *Molecular Ecology Resources* 9: 1-26.

Janzen, D.H., Hallwachs, W., Burns, J.M., Hajibabaei, M., Bertrand, C. y P.D.N. Hebert (2011) Reading the complex skipper butterfly fauna of one tropical place. *PLoS ONE* 6(8): e19874. doi:10.1371/journal.pone.0019874.

- Janzen, D.H. y W. Hallwachs (2011a) Dynamic database for an inventory of the macrocaterpillar fauna, and its food plants and parasitoids, of Area de Conservacion Guanacaste (ACG), northwestern Costa Rica (nn-SRNP-nnnnn voucher codes). [10-Feb-2011] <http://janzen.sas.upenn.edu>
- Janzen, D.H. y W. Hallwachs (2011b) Joining inventory by parataxonomists with DNA barcoding of a large complex tropical conserved wildland in Northwestern Costa Rica. *PLoS ONE* 6(8): e18123. doi:10.1371/journal.pone.0018123.
- Jeffery, N.W., Elías-Gutiérrez, M. y S.J. Adamowicz (2011) Species Diversity and Phylogeographical Affinities of the Branchiopoda (Crustacea) of Churchill, Manitoba, Canada. *PLoS ONE* 6(5): e18364. doi:10.1371/journal.pone.0018364.
- Jenkins, D.W. (1983) Neotropical Nymphalidae. I. Revision of *Hamadryas*. *Bulletin of the Allyn Museum* 81: 1-146.
- Johnsen, A., Rindal, E., Ericson, P.G.P., Zuccon, D., Kerr, K.C.R., Stoeckle, M. Y. y J.T. Lifjeld (2010) DNA barcoding of Scandinavian birds reveals divergent lineages in trans-Atlantic species. *Journal of Ornithology* 151: 565-578.
- Kendall, R.O. (1976) Larval foodplants and life history notes for some metalmarks (Lepidoptera: Riodinidae) from Mexico and Texas. *Bulletin of the Allyn Muesum* 32: 1-12.
- Kerr, K.C.R., Stoeckle, M.Y., Dove, C.J., Weigt, L.A., Francis C.M. y P. Hebert (2007) Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular Ecology Notes* 7: 535–543. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01670.x.
- Kerr, K.C.R., Lijtmaer, D.A., Barreira, A.S., Hebert, P.D.N. y P.L. Tubaro (2009) Probing Evolutionary Patterns in Neotropical Birds through DNA Barcodes. *PLoS ONE* 4(2): e4379. doi:10.1371/journal.pone.0004379.
- Klots, A.B. (1956) "Lepidoptera" en Tuxen, S. L. (ed.), *Taxonomists' Glossary of Genitalia in Insects*. Munksgaard, Copenhagen. pp. 97-110.

- Kristensen, N.P. (2003) Lepidoptera, moths and butterflies: Morphology, physiology and development, Volumen 2 en Maximilian, F. (ed.) Handbook of Zoology Volume IV Arthropoda: Insecta. Walter de Gruyter, Alemania. 564 p.
- León-Cortés, J. (2000) "Sphingoidea (Lepidoptera)" en Llorente-Bousquets, J., González E. y N. Papavero (eds.) *Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: Hacia una síntesis de su conocimiento*. México: UNAM-CONABIO-BAYER. pp. 483-500.
- Llorente-Bousquets, J., Luis-Martínez, A., Vargas I. y J. Soberón (1996) "Papilionoidea (Lepidoptera)" en Llorente-Bousquets, J., García, A. y E. González (eds.) *Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: Hacia una síntesis de su conocimiento* Vol I. Facultad de Ciencias, UNAM, México. pp. 531-548.
- Llorente-Bousquets, J., Pozo, C., Luis-Martínez, A. (1993) *Anetia thirza* (Lepidoptera: Nymphalidae): Su ciclo de vida y distribución. *Publicaciones Especiales del Museo de Zoología* 7: 63-87.
- Llorente-Bousquets, J., Oñate-Ocaña, L., Luis-Martínez, A. e I. Vargas. (1997) *Papilionidae y Pieridae de México: Distribución geográfica e ilustración*. México, UNAM-CONABIO. 227 p.
- Luis-Martínez, A, Llorente-Bousquets, J.E. e I. Vargas (2003) *Nymphalidae de México I (Danainae, Apaturinae, Biblidinae y Heliconiinae): Distribución Geográfica e Ilustración*. México. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México y Comisión Nacional Para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 249 p.
- Luis-Martínez, A, Llorente-Bousquets, J.E., Vargas I. y C. Pozo (2010) *Nymphalidae de México III (Nymphalinae): Distribución Geográfica e Ilustración*. México. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México y El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR). 195 p.

- May, E. (2006) *Mariposas diurnas (Lepidoptera: Rhopalocera) presentes en el jardín botánico "Dr. Alfredo Barrera Marín", Quintana Roo, México*. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán. Conkal, Yucatán.
- Maya, A, Pozo, C y E. May (2005) Butterflies (Rhopalocera: Papilionidae, Pieridae y Nymphalidae) of the high tropical evergreen forest of the region of Calakmul, Mexico, with new records. *Folia Entomologica Mexicana* 44: 123-143.
- Michán, L., Llorente-Bousquets, J., Luis-Martínez A. y D.J. Castro (2005) Breve historia de la taxonomía de lepidoptera en México durante el siglo XX. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 29 (110): 101-132, 2005. ISSN: 0370-3908.
- Miller, J.C., Janzen, D.H. y W. Hallwachs (2006) *100 Caterpillars: portraits from the tropical forest of Costa Rica*. Massachusetts, USA: The Belknap Press of Harvard University Press. 264 p.
- Miller, J.C., Janzen, D.H. y W. Hallwachs (2007) *100 Butterflies and moths: portraits from the tropical forest of Costa Rica*. Massachusetts, USA: The Belknap Press of Harvard University Press. 256 p.
- Miller, J.Y. (2000) "Castniidae (Lepidoptera)" en Llorente-Bousquets, J., González E. y N. Papavero (eds.) *Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: Hacia una síntesis de su conocimiento*. México: UNAM-CONABIO-BAYER. pp. 527-533.
- Miller, S.E. (2007) DNA barcoding and the renaissance of taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(12): 4775-4776.
- Müller, W. (1886) Sudamerikanische Nymphalidenraupen: Versuche eines natürlichen Systems der Nymphaliden. *Zoologische Jahrbuecher (Jena)* 1:417-678.
- Murphy, D.D. y B.A. Wilcox (1986) "Butterfly diversity in natural habitat fragments: a test of the validity of vertebrate based management" en Vernier, J., Morrison, L. y Ralph, C.J. (eds.), *Wildlife 2000: modeling habitat relationships of terrestrial*

vertebrates. The University of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin, USA. pp. 287-292.

Pescador, A. (1994) *Manual de identificación para las mariposas de la familia Sphingidae (Lepidoptera) de la estación de biología "Chamela", Jalisco, México*. Instituto de Biología, UNAM. México, D.F. 103 pp.

Peterson, A. (1962) "Lepidoptera and plant infesting Hymenoptera". en *Larvae of insects*. Ann Arbor, Michigan: Edwards Brothers, Inc. pp. 112-204.

Piñas, F., Rab-Green, S., Onore, G. e I. Manzano (2000) *Mariposas del Ecuador Vol. 20. Familia: Arctiidae. Subfamilias: Arctiinae y Pericopinae*. Museo de Zoología, C.B.A., Departamento de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador. 84 láminas.

Powell, J.A. y P.A. Opler (2009) *Moths of western North America*. Berkeley, USA. 369 p.

Pozo, C., Cabrera, E., Rangel, J.L. y P. Viveros (1991) "Fauna" en Camarena, T. y S. Salazar-Vallejo, (eds.) *Estudios ecológicos preliminares de la zona sur de Quintana Roo. México*. Quintana Roo, México: Centro de Investigaciones de Quintana Roo. pp. 49-78.

Pozo, C., Luis-Martínez, A., Uc, S., Salas, N. y A. Maya (2003b) Butterflies (Papilionoidea and Hesperioidea) of Calakmul, Campeche, México. *The Southwestern Naturalist* 48: 505-525.

Pozo, C., Maya, A. y N. Salas-Suárez (2003a) "Colección Lepidopterológica" en León-Cortéz, J., Lorenzo, C., Pozo, C., (eds.) *Colecciones biológicas de El Colegio de la Frontera Sur, México*. San Cristóbal de las Casas, Chiapas: CONABIO-ECOSUR. pp. 89-105.

Pozo, C., Salas-Suárez, N., Prado, B. y E. May (2009) "Riqueza de mariposas diurnas (Lepidoptera: Rhopalocera) en el Santuario del Manatí y una propuesta para su uso en el monitoreo de ambientes terrestres del área" en Espinoza-Ávalos, J., Islebe, G.A. y H.A. Hernández-Arana (eds.) *El sistema ecológico de la bahía de*

- Chetumal/Corozal: costa occidental del Mar Caribe. Chetumal, México: El Colegio de la Frontera Sur. pp. 139-147.*
- Pozo, C., Salas Suárez, N. y S. Uc (2002) "Mariposas diurnas del santuario del manatí y su área de influencia" en Rosado, F.J., Romero, R. y A. de Jesús Navarrete (eds.) *Contribuciones de la ciencia al manejo costero integrado de la bahía de Chetumal y su área de influencia*. Universidad de Quintana Roo, Chetumal, Quintana Roo, México. pp.121-130.
- Ratnasingham, J.R. y P. Hebert (2007) BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*, p. 1-10.
- Razowski, J. (1996) "Tortricidae (Lepidoptera)" en Llorente-Bousquets, J., García, A. y E. González (eds.) *Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: Hacia una síntesis de su conocimiento* Vol I. Facultad de Ciencias, UNAM, México. pp. 513-520.
- Regier J.C., Zwick, A., Cummings, M.P., Kawahara, A., Cho, S., Weller, S., Roe, A., Baixeras, J., Brown, J.W., Parr, C., Davis, D.R., Epstein, M., Hallwachs, W., Hausmann, A., Janzen, D.H., Kitching I.J., Solís, M.A., Yen, S., Bazinet, A.L. y C. Mitter (2009) Toward reconstructing the evolution of advanced moths and butterflies (Lepidoptera: Ditrysia): an initial molecular study. *BMC Evolutionary Biology* 9: 280.
- Remigio, E.A. y P. Hebert (2003) Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 29: 641–647.
- Robinson, G.S. (1976) The preparation of slides of Lepidoptera genitalia with special reference to the Microlepidoptera. *Entomologist's Gazette*, 27: 127-132.
- Saitou, N. y M. Nei (1987) The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution* 4(4):406-25.

- Salas, N. (1995) *Listado faunístico de la familia Pieridae (Papilionoidea) del estado de Quintana Roo*. Tesis de Licenciatura. SEP, DGTI. SEIT, Instituto Tecnológico de Chetumal. Chetumal, Quintana Roo, México. 64 p.
- Scoble, M., (1995) *The Lepidoptera: Form, function and diversity*. The natural history museum, in association with Oxford University press.
- Smith, M.A., Fisher, B.L. y P. Hebert (2005) DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 1462(360): 1825-1834. doi:10.1098/rstb.2005.1714.
- Solís, M.A. (1996) "Pyraloidea (Lepidoptera)" en Llorente-Bousquets, J., García, A. y E. González (eds.) *Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: Hacia una síntesis de su conocimiento* Vol I. Facultad de Ciencias, UNAM, México. pp. 521-530.
- Sperling, F. 2003. Butterfly Molecular Systematics: from species definitions to higher-level phylogenies. En: Boggs, C., W. Watt, y P. Ehrlich (eds.), *Butterflies: Ecology and evolution taking flight*. The University of Chicago Press. Chicago, USA, p. 431-458.
- Standley, P.C. (1930) Flora of Yucatan. Field Museum of Natural History, *Botanical Series* 3(3): 157-492.
- Stehr, F.W. (1987) "Order Lepidoptera" en *Immature insects*. Dubuque, Iowa: Kendall-Hunt Publishing Company. pp. 288-596.
- Missouri Botanical Garden [13-Feb-2011] <http://www.tropicos.org/Name/12801235>
- Valdez-Moreno, M., Ivanova, N.V., Elías-Gutiérrez, M., Contreras-Balderas, S., y P.D.N. Hebert (2009) Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. *Journal of Fish Biology* 74: 377–402. doi:10.1111/J.1095-8649.2008.02077.X.

- Valdez-Moreno, M., Vásquez-Yeomans, L., Elías-Gutiérrez, M., Ivanova, N. y P.D.N. Hebert (2010) Using DNA Barcodes to connect adults and early life stages of marine fishes from the Yucatan Peninsula, Mexico: potential in fisheries management. *Marine and Freshwater Research* 61(6): 665–671.
- van Velzen, R., Bakker, F.T. y J.J.A van Loon (2007) DNA barcoding reveals hidden species diversity in *Cymothoe* (Nymphalidae). *Proceedings of the Netherlands Entomological Society Meeting* 18: 95–103.
- Vargas-Fernández, I., Llorente-Bousquets, J., Luis-Martínez, A., y C. Pozo (2008) *Nymphalidae de México II (Libytheinae, Ithomiinae, Morphinae y Charaxinae): distribución geográfica e ilustración*. México: UNAM-CONABIO. 225 p.
- Vázquez, Y.K. (2005) *Lepidoptera: Rhopalocera, lista de especies de la reserva Cuxtal, Yucatán*. Memoria de Residencia Profesional. Instituto Tecnológico Agropecuario No. 2. Conkal, Yucatán. 60 pp.
- Ward, R.D., Zemplak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R. y P. Hebert (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 1462(360): 1847-1857. doi:10.1098/rstb.2005.1716.
- Warren, A.D. y S. Warren (2004) Mexico and the Caribbean Island. *News of the Lepidopterists' Society 2003 Season Summary. Vol. 46 Supplement S1*. 78- 86.
- Warren, A.D., Davis, K.J., Grishin, N.V., Pelham, J.P. y E.M. Stangeland (2011) Interactive Listing of American Butterflies. [9-VIII-11] <<http://www.butterfliesofamerica.com/>>
- Wilson, J.J., Landry, J.F., Janzen, D.H., Hallwachs, W., Nazari, V., Hajibabaei, M. y P.D.N. Hebert (2010) Identity of the ailanthus webworm moth (Lepidoptera, Yponomeutidae), a complex of two species: evidence from DNA barcoding, morphology and ecology. *ZooKeys* 46: 41-60.