



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

CONSERVACIÓN Y MANEJO DE RECURSOS NATURALES

“EVALUACIÓN DE LA SOBREVIVENCIA LARVAL, EN POBLACIONES DE
MARIPOSA MONARCA (*Danaus plexippus*), ANTE DOSIS MEDIAS Y MÁXIMAS
DE INSECTICIDAS CARBAMATOS EN MÉXICO”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
M. EN CARN

P R E S E N T A:

BIÓLOGA SIMONA FERNANDA BERNAL PICHARDO

ASESOR

DR. JOSELE RICARDO FLORES SANTÍN

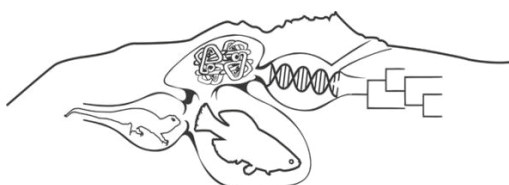
CO- ASESORES

DR. JOSÉ FERNANDO MENDEZ SÁNCHEZ

DR. JOSÉ FRANCISCO RAMÍREZ DÁVILA

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO

MAYO 2023



ÍNDICE

1. ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
2. ÍNDICE DE CUADROS	6
3. RESUMEN.....	7
4. ABSTRACT	8
5. INTRODUCCIÓN.....	9
6. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO	12
7.0. JUSTIFICACIÓN	23
8.0. HIPÓTESIS	24
9.0. OBJETIVOS.....	24
10.0. MÉTODOS	25
11.0. RESULTADOS.....	29
12.0. DISCUSIÓN GENERAL.....	53
13.0. CONCLUSIÓN GENERAL.....	55
14.0. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. ÍNDICE DE FIGURAS

- **Figura 1.** Reserva de la Biosfera de la mariposa monarca.
- **Figura 2.** Observación mariposa monarca residente.
- **Figura 3.** Observación de una larva en estadio V de mariposa monarca.
- **Figura 4.** Observación de un macho y dos hembras adulto de mariposa monarca.
- **Figure 5.** *Danaus plexippus* larval survival curves of treatments with insecticide and without Insecticide.
- **Figure 6.** Survival curve illustrating the median lethal dose LD₅₀.
- **Figure 7.** Malformation curve of the insecticide treatments.
- **Figure 8.** Malformations from insecticide treatments.
- **Figure 9 y 10.** Head capsule size in larvae treated with Insecticide.
- **Figure 11 y 12.** Body size in larvae treated with Insecticide.
- **Figure 13 y 14.** Foliar consumption in treatments with insecticide

2. ÍNDICE DE CUADROS

- **Table 1.** *Danaus plexippus* larval survival rates in treatments with insecticide (IT%) and without insecticide (NT%).

3. RESUMEN

La mariposa monarca (*Danaus plexippus*) una especie reconocida a nivel mundial por la migración anual que realiza desde Estados Unidos y Canadá a México, para sobrevivir al invierno en bosques de oyamel (sitios de hibernación). Durante su trayectoria se encuentra expuesta a diversas amenazas, principalmente a la pérdida de hábitat y el uso de insecticidas atribuido a la intensificación agrícola. En este estudio se analizó el impacto del insecticida carbamato más usado en México (FURADAN ®) en la sobrevivencia larval de la mariposa monarca. A través de experimentos controlados, se administraron diferentes dosis de FURADAN ® a los estadios larvales para evaluar el efecto en la sobrevivencia y desarrollo.

Los resultados demostraron que las dosis 5 g/L, 7.5 g/L y 10 g/L tuvieron menor efecto en la sobrevivencia disminuyendo del 11.11% a 22.23%, mientras las dosis 20 g/L y 30 g/L tuvieron mayor efecto, disminuyendo la sobrevivencia del 44% a 100%. Los estadios larvales más vulnerables son LIII y LV, disminuyendo la sobrevivencia entre un 50-100% en la dosis de 30 g/L, presentando entre un 65-85% malformaciones en segmentos, antenas y crisálida, además de actividad motora irregular. Hubo efecto en el tamaño de la cápsula de la cabeza e ingesta foliar, aunque no tan marcado ni diferenciado en estadios larvales por la muerte de organismos, se pudo observar una disminución de tamaño y disminución en la ingesta foliar en el tratamiento con insecticida. A partir de este estudio es posible implementar nuevas estrategias y políticas ambientales, encaminadas al uso y manejo de insecticidas carbamatos para incrementar la sobrevivencia en poblaciones de mariposa monarca (*Danaus plexippus*).

Palabras clave: Insecticidas, mariposa monarca, disminución de la sobrevivencia, carbamatos, toxicidad.

4. ABSTRACT

The monarch butterfly (*Danaus plexippus*), a species recognized worldwide for its annual migration from the United States and Canada to Mexico, survives the winter in oyamel forests (hibernation sites). During its journey, it is exposed to various threats, primarily habitat loss and the use of insecticides attributed to agricultural intensification. This study analyzed the impact of the most commonly used insecticide group in Mexico on the larval survival of the monarch butterfly. Through controlled experiments, different doses of carbamate insecticide (FURADAN®) were administered to larval stages to evaluate the effect on survival and development. The experimental findings revealed distinct efficacy levels across various dosage concentrations. Doses of 5 g/L, 7.5 g/L, and 10 g/L exhibited a comparatively diminished impact on survival rates, ranging from 11.11% to 22.23%. Conversely, concentrations of 20 g/L and 30 g/L demonstrated heightened efficacy, resulting in a notable decline in survival rates from 44% to 100%. Particularly vulnerable larval stages, notably LIII and LV, experienced a substantial decline in survival rates ranging between 50-100% at the 30 g/L dosage, coupled with a prevalence of malformations ranging from 65-85% in segments, antennae, and chrysalides, alongside irregular motor activity.

The study also documented discernible effects on head capsule size and foliar intake. Despite the absence of pronounced differentiation in larval stages due to organism mortality, a discernable reduction in both size and foliar intake was evident in the insecticide-treated groups.

These findings underscore the potential for the formulation of novel strategies and environmental policies aimed at optimizing the utilization and administration of carbamate insecticides to bolster the survival rates within monarch butterfly (*Danaus plexippus*) population.

Keywords: Insecticides, monarch butterfly, decline survival, carbamates, toxicity.

5. INTRODUCCIÓN

La mariposa monarca, *Danaus plexippus* (Linnaeus, 1758), es una especie clave reconocida por la migración anual que realiza (CONANP 2010). La migración comienza con la salida de sus sitios de nacimiento en América del Norte. Existen dos poblaciones migratorias, la oriental (incluye el 90% de la población) y occidental (10% de población) (CONANP 2010, Cuevas *et al.* 2013). La población oriental se encuentra al este de las Montañas Rocosas desde el sur de Canadá y gran parte de Estados Unidos e hiberna en el centro de México (CONANP 2010, Cuevas *et al.* 2013).

Durante la primavera, la mariposa monarca se reproduce en Estados Unidos y Canadá, en los meses de marzo- mayo. En el verano, en los meses de junio-agosto se desarrollan entre tres y cuatro generaciones, de las cuáles la última (generación Matusalén) migra en los meses de septiembre a octubre a los sitios de hibernación en México en los meses de noviembre- marzo. Estos sitios de hibernación se decretaron como Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca (RBMM) en el año 2000, y se ubican en los límites del Estado de México y Michoacán (CONABIO 2008, CONANP 2010).

Durante su recorrido migratorio y estancia, se enfrenta a distintas amenazas: las bióticas que incluyen depredación y parasitismo (Altizer & Oberhauser 1999, Oberhauser *et al.* 2009, Hermann *et al.* 2019) y las abióticas que incluyen condiciones meteorológicas extremas, la pérdida de hábitat y el uso de insecticidas (York & Oberhauser 2002, Brower *et al.* 2015, Couture *et al.* 2015, Olaya- Arenas & Kaplan 2019, Olaya- Arenas *et al.* 2020b). Aunque todas las amenazas tienen influencia en la disminución de la sobrevivencia de la mariposa monarca, algunas tienen mayor grado, como ocurre con el uso de insecticidas en los sitios de reproducción, alimentación e hibernación (Olaya- Arenas & Kaplan 2019, Olaya- Arenas *et al.* 2020b).

Debido a estos factores, la mariposa monarca de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, es clasificada en la categoría de sujeta a protección especial “Pr” (SEMARNAT 2010). Por otra parte, la Unión

Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), la clasifica en la categoría de en peligro de extinción “EN” (UICN 2022).

En México los estudios sobre mariposa monarca están dirigidos a programas de manejo para la Reserva de la Biosfera de la Mariposa Monarca (Merino & Hernández 2004, Brenner 2006), migración (Urquhart & Urquhart 1976, 1978, 1979, Calvert & Brower 1986), reproducción (Calvert & Brower 1986, Masters *et al.* 1988, Cuevas *et al.* 2013) y conservación (Merino & Hernández 2004, López 2007, Brenner 2006, Fajardo *et al.* 2011, García & Guzmán 2014, Islas *et al.* 2015, Rendon *et al.* 2023) pero no existe información que muestre el efecto que tienen los insecticidas en la disminución de la sobrevivencia de la mariposa monarca.

La intensificación agrícola relacionada con la siembra de cultivos alrededor de los sitios de hibernación, alimentación y reproducción de la mariposa monarca, implica el uso y aumento de insecticidas. Los grupos de insecticidas más utilizados en Estados Unidos y Canadá son los neonicotinoides, piretroides, y organofosforados (Crone *et al.* 2019, Olaya- Arenas & Kaplan 2019, Olaya- Arenas *et al.* 2020b, Ethier & Mitchell 2023, Kesler & Bunch 2023, Prouty *et al.* 2023), mientras en México son los organofosforados y carbamatos (Gutiérrez *et al.* 2019, Bernal 2020).

Los carbamatos son uno de los grupos más utilizados alrededor de los sitios de hibernación, alimentación y reproducción en México (Gutiérrez *et al.* 2019, Bernal 2020). Se usan principalmente para eliminar insectos defoliadores de follaje, en cultivos de hileras como flores de asclepias, *Asclepias physocarpa* (E. Meyer) y *Asclepias curassavica* (L.), girasol *Tithonia rotundifolia* (P. Mill.) y *Helianthus annuus* (L.), ave del paraíso *Strelitzia reginae* (L.), casa blanca *Lilium candidum* (L.), flor de calabaza *Curcubita pepo* (L.), frutas y verduras como aguacate *Persea americana* (L.), lechuga *Lactuca sativa* (Linn.), cilantro *Coriandrum sativum* (L.), rabano *Rhaphanus sativus* (L.) y semillas como maíz *Zea mays* (L.), frijol *Phaseolus vulgaris* (L.) y haba *Vicia faba* (L.) (Bernal 2020).

Los carbamatos son compuestos derivados del ácido carbámico, de amplio espectro, es decir, no específicos de plagas, por lo que al ser dispersados de manera directa por rociamiento en follaje y raíces, o indirecta por escurrimiento

durante el riego y dispersión por viento, llegan a insectos como larvas defoliadoras y chinches verdes, además de organismos polinizadores como podría ocurrir con la mariposa monarca (Sans *et al.* 2013, Crone *et al.* 2019, Krishnan *et al.* 2021, Olaya-Arenas *et al.* 2020b, Mdeni 2022).

La toxicidad de los carbamatos varía de acuerdo con el grupo al que pertenecen, vía ingreso, dosis, mecanismo de acción, bioacumulación y persistencia ambiental (OECD 2003, Iturbe *et al.* 2020). Sin embargo, el carbamato marca FURADAN®, es clasificado como altamente tóxico (1a) por la (Organización Mundial de la Salud (OMS 2019) y la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS 2014), el organismo responsable del registro de plaguicidas autorizados para su importación, comercialización y uso en México. Aún con su prohibición se sigue utilizando sin autorización alrededor de los sitios de reproducción, alimentación e hibernación de la mariposa monarca (Bernal 2020).

Tomando en cuenta lo anterior el uso de FURADAN® cerca de los sitios de hibernación, alimentación y reproducción en México, podría representar una de las principales amenazas en la disminución de la sobrevivencia en poblaciones de mariposa monarca.

6. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

Ecología poblacional.

Las poblaciones de organismos se encuentran sujetas a constantes cambios, en función de su interacción y adaptación con el entorno. Para comprender estos cambios se requiere del conocimiento de parámetros estructurales como distribución espacial, abundancia, densidad, distribución de sexos- edades y parámetros dinámicos como la dispersión, tasa de natalidad y mortalidad, curvas e índice de crecimiento. Bajo esta perspectiva, el objeto de estudio de la ecología poblacional es estudiar las diferentes interacciones que determinan la estructura y dinámica de las poblaciones (Stiling 1993, Garcilazo 2011, De Antoni 2020).

Existen diferentes formas para determinar cómo cambiará una población, una de ellas consiste en analizar a un grupo de individuos través de tablas de vida, desde el nacimiento hasta la muerte para finalmente construir una curva de sobrevivencia y analizar las fluctuaciones de la población (Garcilazo 2011, Zhout & Kot 2011).

Las curvas de sobrevivencia siguen patrones para identificar a los organismos en alguna tendencia, dependiendo si la mortalidad afecta a individuos más jóvenes, viejos o de igual manera a todas las edades. La curva tipo III es la más común en grupos de insectos en dónde la sobrevivencia juvenil es baja y muchos mueren debido a factores bióticos o abióticos, sin embargo, los organismos que sobreviven tienen un tiempo de vida más largo, llegando a la vejez (Zhout & Kot 2011).

Dispersión migratoria de poblaciones.

El movimiento de organismos, con potencial para conducir el flujo genético, desde el sitio de nacimiento a su sitio de reproducción o viceversa, es considerado como dispersión migratoria poblacional (Zhout & Kot 2011). Este proceso conlleva la salida, traslado, y regreso de los organismos, que tiene diversos beneficios y costos. Los beneficios pueden ser amplios, como recursos o nichos que explotar, alejarse de condiciones desfavorables, evitar la competencia intra o interespecífica e incremento de la variabilidad genética. Por otra parte, los costos pueden ser

energéticos (para la dispersión a los sitios), de riesgo (lesiones durante el traslado) y tiempo (no invertir tiempo en el crecimiento y reproducción (Bowler & Benton 2005, Ruelas *et al.* 2009).

Dispersión y concentración migratoria en poblaciones de mariposa monarca.

La dispersión de la mariposa monarca (*Danaus plexippus*) comienza con la salida de sus sitios de nacimiento en América del Norte, viajando aproximadamente 5000 km. El lugar alberga dos poblaciones migratorias, de mariposa monarca migratoria, la occidental (incluye el 10% de población de mariposa migratoria) y la oriental (incluye el 90% de la población) (CONANP 2010, Cuevas *et al.* 2013).

La población occidental se encuentra al oeste de las Montañas Rocosas desde el sur de Canadá y una pequeña porción de Estados Unidos e hiberna en las costas de California, mientras la población oriental se encuentra al este de las Montañas Rocosas desde el sur de Canadá y gran parte de Estados Unidos e hiberna en el centro de México (CONANP 2010) (Zipkin *et al.* 2012). La mariposa monarca se reproduce durante la primavera en Estados Unidos y Canadá, en el verano se desarrollan entre tres y cuatro generaciones, de las cuáles la última (generación matusalén) migra a los sitios en México (CONABIO 2008).

Estos sitios de hibernación se decretaron en el año 2000 como Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca (RBMM), que protege a 56,259 hectáreas, ubicadas en los límites del Estado de México y Michoacán (Fig. 1). En el Estado de México, la RBMM considera los municipios de Temascalcingo, San Felipe del Progreso, Donato Guerra y Villa de Allende mientras en el Estado de Michoacán considera a Contepec, Senguio, Angangueo, Ocampo, Zitácuaro y Aporo (CONABIO 2008, CONANP 2010, Cuevas *et al.* 2013, Lemoine 2015, Rendón *et al.* 2017).

Existen sitios fuera de la RBMM en los cuales se han establecido poblaciones de mariposa monarca que se mantienen en alguna categoría de protección como los resguardados por El Área de Protección de Recursos Naturales (APRN) Cuencas de los ríos Valle de Bravo, Malacatepec, Tilostoc y Temascaltepec (CONANP 2018).

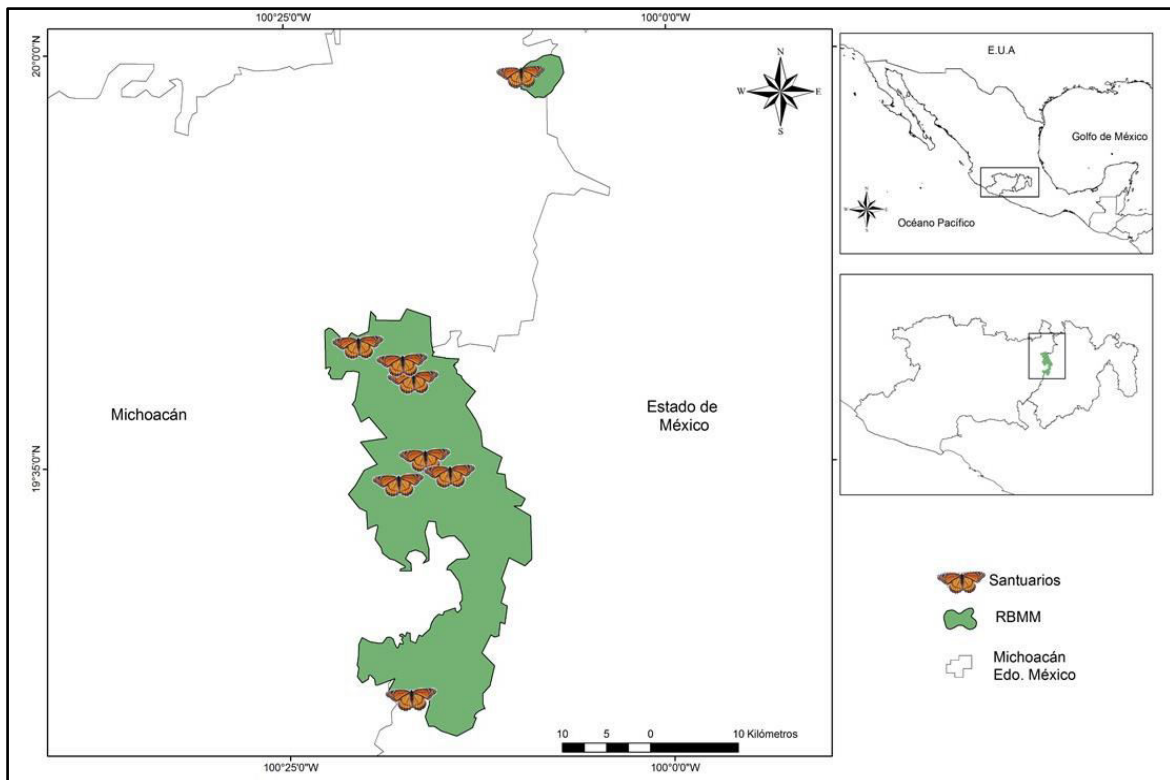


Figura 1. Reserva de la Biosfera de la mariposa monarca (*Danaus plexippus*) ubicada entre los límites del estado de México y Michoacán. Créditos: Propios.

Flujo migratorio de mariposa monarca a México.

La RBMM y la APRN Cuencas de los ríos Valle de Bravo, Malacatepec, Tilostoc y Temascaltepec, son sitios importantes de hibernación, ya que se estima ocupan entre 0.67 ± 18 hectáreas de bosque, contabilizando aproximadamente entre $250,000 \pm 500,000$ mariposas (Fig. 1) (Velázquez 2006, CONANP 2018).

Este flujo migratorio, se debe principalmente a dos beneficios altos; el primero consiste en poder alejarse de condiciones meteorológicas desfavorables y la segunda la explotación de un nicho (bosque templado húmedo, principalmente de oyamel y jardines para polinizadores) (Zhout & Kot 2011). Durante el invierno en Estados Unidos y Canadá, la temperatura media anual en los sitios de reproducción y alimentación oscila entre los -34°C a -37°C , mientras en México la temperatura media anual en los sitios de hibernación y sus alrededores, oscila entre los 8°C a 22°C . Considerando que la temperatura de congelación para las poblaciones de mariposas migratorias se encuentra en los -3°C , los sitios de hibernación,

representan lugares óptimos para hibernar en árboles de oyamel, mientras los jardines para polinizadores sitios óptimos para alimentarse, en lo que la primavera llega a Estados Unidos y Canadá (Herman 1981, York & Oberhauser 2002).

Mariposa monarca residente

Además de las poblaciones migratorias, existen poblaciones residentes de mariposa monarca que se reproducen durante todo el año en diferentes partes de la República Mexicana, cerca o lejos de las poblaciones migratorias. La información sobre estas poblaciones es limitada, los aspectos ecológicos o biológicos que se tienen derivan de poblaciones migratorias, sin embargo, existe una probabilidad alta de que las poblaciones residentes emanen de las migratorias (Cuevas *et al.* 2013).

Para poder hibernar en México, la mariposa monarca entra en una foto/termo periodo, conocido como diapausa (Salgado *et al.* 2013). Este periodo de latencia inducido por factores como la disminución de horas de luz y descenso de la temperatura en sus sitios de origen, disminuye la actividad metabólica para no desarrollar órganos sexuales, evitando la maduración sexual (Oberhauser 2006, Salgado *et al.* 2013). La diapausa también puede ser inducida por la disponibilidad de alimento, algunas mariposas migratorias que detectan alimento para el estadio larval (*Asclepias* sp.) rompen la diapausa, maduran sexualmente y ovipositan en las plantas hospederas, evitando la migración y dejando descendencia, estableciendo así poblaciones residentes (Cuellar *et al.* 2005; Ramos *et al.* 2020).

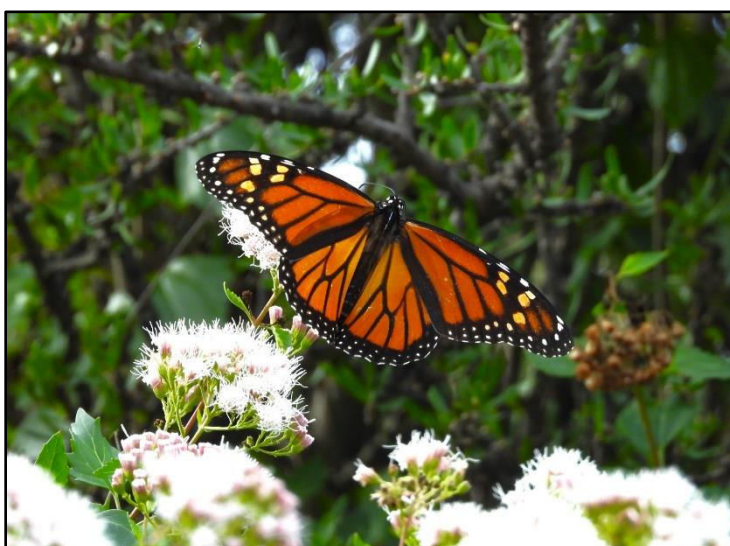


Figura 2. Observación mariposa monarca residente, hembra adulto de (*Danaus plexippus*) en el municipio de Malinalco. Créditos: Propios.

Ciclo de vida de la mariposa monarca migratoria y residente

Presentan una metamorfosis total denominada holometábola que va de estadios inmaduros (huevo, larva y crisálida) a estadio maduro (mariposa) (Fig.2). Para poblaciones migratorias y residentes el ciclo de vida es similar hasta llegar al último estadio que cuando la hembra en estadio de mariposa deposita aproximadamente 400 huevos que dependen de plantas de asclepias (*Asclepias* sp.) (Oberhauser 2006, CONANP 2018). Las asclepias son un género de plantas hospederas donde las hembras ovipositan exclusivamente en ellas, ya que son el alimento en el estadio larval, además por el consumo de glucósidos cardíacos, que usan como protección contra depredadores y parásitos (Roeske *et al.* 1976, CONANP 2010).

El estadio larval emerge de 4 a 8 días después de la puesta, se alimenta y desarrolla de nueve a 15 días (Fig. 3). Pasa por cinco estadios larvales que difieren por el tamaño de la cabeza y la longitud de filamentos en el tórax y abdomen. El estadio de crisálida tiene una duración de ocho a 14 días en el cual se transforma en estadio de mariposa (Oberhauser 2006, CONANP 2018). El estadio de mariposa en poblaciones residentes tiene una duración de dos a cuatro semanas, mientras en poblaciones migratorias de siete a ocho meses (Fig 4). La población migratoria es más longeva debido a que migra en los meses de agosto y septiembre, llegando a México en octubre- noviembre, hibernando hasta febrero- marzo, iniciando la migración a sus sitios de origen durante la primavera (Salgado *et al.* 2013; Wilcox *et al.* 2019).



Figura 3. Observación de una larva en estadio V de mariposa monarca migratoria (*Danaus plexippus*) en El Área de Protección de Recursos Naturales (APRN) Cuencas de los ríos Valle de Bravo, Malacatepec, Tilostoc y Temascaltepec. Créditos: Propios.

Amenazas de riesgo durante la estancia o migración en México.

Existen amenazas que afectan la sobrevivencia de la mariposa monarca, conduciendo a una disminución. Estas pueden ser de diferentes condiciones según sus componentes: bióticas y abióticas.

Bióticas.

Se distinguen por ser los componentes vivos del ecosistema y van dirigidas a interacciones de cadenas tróficas como lo son la depredación y el parasitismo. Existen estudios que evidencian la depredación por aves, *Aphelocoma coerulescens* (L.), *Icterus abeillei* (Lesson), *Icterus parisorum* (Lesson), *Pipilo erythrophthalmus* (L.), *Pheucticus melanocephalus* (Linn), *Parus rufescens*, *Sturnus vulgaris* (Townsend), roedores, *Microtus mexicanus* (Saussure), *Peromyscus maniculatus* (Wagner), *Peromyscus melanotis* (Allen), *Peromyscus spicilegus* (Allen) y artrópodos, Coleoptera (Linnaeus), Diptera (Linnaeus), Hemiptera (Linnaeus), Hymenoptera (Linnaeus), Orthoptera (Latreille) (Zalucki & Kitching 1982, Hermann *et al.* 2019); parasitismo por protozoarios, *Ophryocystis*

elektroscirrha (Myers), larvas de mosca *Lespesia* sp. (Webber) (Altizer & Oberhauser 1999, Oberhauser *et al.* 2009), inclusive interacciones con su propia planta hospedera (muerte de larvas por consumo de látex) (Mattila & Otis 2003, Yeargan & Allard 2005, Casagrande & Dacey 2007).

Abióticas.

Se distinguen por ser los componentes físicos, químicos y no vivos del ecosistema, a diferencia de los bióticos, la mayoría están manipulados por panoramas antropogénicos, es decir, las interacciones con la mariposa monarca no resultan de un proceso natural. Existen estudios que evidencian una disminución de poblaciones migratorias por condiciones meteorológicas (temperaturas elevadas entre los 29°C y 31°C, temperaturas bajas entre -8°C y -4°C) debido al cambio climático (York & Oberhauser 2002, Brower *et al.* 2015, Couture *et al.* 2015), la pérdida de hábitat y el uso de insecticidas (principalmente neonicotinoides, organofosforados) en las áreas de reproducción e hibernación, debido a la intensificación agrícola (Olaya- Arenas & Kaplan 2019, Olaya- Arenas *et al.* 2020b).

Clasificación de la mariposa monarca ante las diferentes amenazas.

En México de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, la mariposa monarca se clasifica en la categoría de sujeta a protección especial (Pr), debido principalmente a la pérdida de hábitat (tala ilegal, deforestación; SEMARNAT 2010, CONANP 2010, Hermann *et al.* 2019). Por otra parte, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), la clasifica en la categoría de peligro de extinción (EN) debido a la pérdida de hábitat (tala legal e ilegal, deforestación) uso de plaguicidas (insecticidas y herbicidas), y condiciones meteorológicas (rangos de temperaturas por arriba y por debajo de su tolerancia; UICN 2022).



Figura 4. Observación de un macho y dos hembras adulto de mariposa monarca migratoria (*Danaus plexippus*) en El Área de Protección de Recursos Naturales (APRN) Cuencas de los ríos Valle de Bravo, Malacatepec, Tilostoc y Temascaltepec. Créditos: Elaboración propia.

Contexto nacional del efecto de insecticidas como la principal amenaza para la mariposa monarca.

La mayoría de la información y estudios que hay sobre mariposa monarca se encuentran limitados en Estados Unidos y Canadá en los que se evidencian que una de las principales causales de uso de insecticidas neonicotinoides, piretroides, y organofosforados (Crone *et al.* 2019, Olaya- Arenas & Kaplan 2019, Olaya- Arenas *et al.* 2020b, Ethier & Mitchell 2023, Kesler & Bunch 2023, Prouty *et al.* 2023).

El manejo desmedido y sin control de estos insecticidas, en conjunto con la bioacumulación y persistencia ambiental, provoca una toxicidad alta, afectando las poblaciones de mariposa monarca de manera significativa (Ramírez 2018, OEDC 2014).

Con respecto a los insecticidas neonicotinoides, Olaya- Arenas *et al.* (2020b), mostraron que en dosis bajas de 15 ng/g la sobrevivencia disminuyó el 20%,

mientras en dosis más altas de 56 ng/g la sobrevivencia disminuyó el 30%. Otro estudio realizado por Krishnan *et al.* (2021) encontraron que en la dosis más alta de 500 ng/g disminuyó la sobrevivencia entre el 60% a 82%, siendo el estadio LV el más vulnerable. Pecenka & Lundgren (2015) en dosis de 15 ng/g, Bargar *et al.* (2020) en dosis de 47 a 205 ng/g y Krishnan *et al.* (2021) en dosis de 130 a 7400 ng/g. Además del efecto en la sobrevivencia, encontraron que aquellos organismos que no murieron presentaron malformaciones en su desarrollo dependiendo el estadio en el que se encontraron. En el caso de los estadios larvales, presentaron longitud, ancho, masa y volumen menor, segmentos mal desarrollados y antenas incompletas, además de una disminución en el tiempo de desarrollo. Por otra parte, el estadio adulto de mariposa presenta deficiencias en el rendimiento reproductivo y en el tiempo de desarrollo, además de una reducción del tamaño de alas posteriores (Pecenka & Lundgren 2015, Bargar *et al.* 2020, Olaya- Arenas *et al.* 2020b, Krishnan *et al.* 2021).

Existen vías de exposición entre la mariposa monarca y los insecticidas: la directa, se refiere al rociamiento durante el vuelo (casi siempre durante la dispersión migratoria), residuos de insecticidas en alimento (hojas, néctar y polen) y contacto con superficies contaminadas (Crone *et al.* 2019, Olaya- Arenas & Kaplan 2019, Olaya- Arenas *et al.* 2020b, Ethier & Mitchell 2023, Kesler & Bunch 2023, Prouty *et al.* 2023). La indirecta se refiere al escurrimiento de insecticidas debido al riego o lluvia y la dispersión por el viento. Cuál sea la forma de exposición el daño es grave e irreversible, estudios reportan efectos en la sobrevivencia y desarrollo de los diferentes estadios de la mariposa monarca (Van- Hook & Zalucky 1991; Olaya- Arenas & Kaplan 2019).

Contexto a nivel estatal del efecto de insecticidas como la principal amenaza para la mariposa monarca.

En México los estudios sobre mariposa monarca están dirigidos principalmente a programas de manejo para la Reserva de la Biosfera de la Mariposa Monarca (Merino & Hernández 2004, Brenner 2006), migración (Urquhart & Urquhart 1976, 1978, 1979, Calvert & Brower 1986), reproducción (Calvert &

Brower 1986, Masters *et al.* 1988, Cuevas *et al.* 2013) y conservación (Merino & Hernández 2004, López 2007, Brenner 2009, Fajardo *et al.* 2011, García & Guzmán 2014, Islas *et al.* 2015) pero no existe información que muestre el efecto que tienen los insecticidas en mariposa monarca.

Mecanismo de acción y toxicidad de los insecticidas.

El mecanismo de acción y toxicidad de insecticidas en los diversos grupos biológicos depende del taxón, hábitat, grupo de insecticida, bioacumulación y persistencia ambiental (Ramírez 2018, OEDC 2014).

El mecanismo de acción de los neonicotinoides está dado por unión con los receptores nicotínicos de acetilcolina en las neuronas postsinápticas del sistema nervioso central, en los insectos como *D. plexippus*, interfieren con la transmisión de impulsos en el sistema nervioso central. Cuando estos compuestos se unen a los receptores, se crea una acción no controlada con la consecuente neurotoxicidad, provocando parálisis y alta mortalidad (Estrada *et al.* 2016).

El mecanismo de acción de los organofosforados y carbamatos es similar, consiste en la fosforilación de la enzima acetilcolinesterasa en las terminaciones nerviosas. Durante la sinapsis el impulso es transmitido por la acetilcolina, la cual es destruida por la colinesterasa, de esta manera la sinapsis puede ser anulada para otra transmisión en insectos como *D. plexippus*, afectan el sistema nervioso central (Jeng & Kang 1990, Yi *et al.* 2006).

De acuerdo con Sans y colaboradores (2013), ambos grupos presentan propiedades para entrar en contacto con la mariposa; los organofosforados tienen una estructura molecular que les dan la cualidad de resistencia a la degradación química y bacteriana, al ser poco solubles al agua se evaporan, pasando al aire uniéndose a partículas, siendo transportados a grandes distancias para llegar a las áreas ecológicas de la mariposa monarca. Por otra parte, los neonicotinoides son altamente solubles en agua de manera que, a través de la lluvia, riegos o escurrimiento llegan a la mariposa monarca.

Respuesta de la mariposa monarca ante los insecticidas.

La mariposa monarca como diversos taxones de insectos, ha creado y evolucionado mecanismos para eludir el daño o la presencia insecticidas. Las hembras adultas durante la temporada de oviposición a través de receptores quimiosensoriales tarsales, presentes en los apéndices, detectan la composición química de las superficies de las hojas en cualquier sitio que decidan ovipositar. Las especies monófagas como ocurre con las hembras *D. plexippus* que se alimentan de una familia de plantas, responden a estimulantes alimenticios como azúcares o elementos disuasivos como podrían ser insecticidas de manera muy precisa, ajustando su comportamiento de oviposición, alejándose de sitios contaminados (Honda 1995, Nishida *et al.* 1990, Olaya- Arenas *et al.* 2020a).

Otra respuesta es mediante feromonas epidérmicas encontradas en los apéndices, que pueden marcar a sus plantas hospederas para indicar a otras hembras de la misma especie sitios óptimos de oviposición, ayudándolas a evadir lugares con sustancias tóxicas (Schoonhoven 1990, Gabel & Thiery 1996, Aluja & Díaz- Fleischer 2006, Ramos *et al.* 2020).

Además, mediante la defensa ante depredadores y parásitos a través de los metabolitos secundarios de la planta (glucósidos cardíacos), podría tener una resistencia metabólica cruzada, dada por modificaciones de la bomba Na^+/K^+ que le permiten secuestrar y metabolizar metabolitos secundarios, tolerando diversas sustancias tóxicas (Karageorgi *et al.* 2019, Krueger *et al.* 2022).

7.0. JUSTIFICACIÓN

Bajo el contexto analizado queda por entendido que una de las principales causas de disminución de la mariposa monarca, es el uso de insecticidas cerca de los sitios de reproducción, alimentación e hibernación. Actualmente se sabe el efecto de diferentes grupos como los neonicotinoides, piretroides y organofosforados en Estados Unidos y Canadá, sin embargo, en México existe un vacío de información sobre el efecto del FURADAN ® en la sobrevivencia larval de mariposa monarca, uno de los más usados alrededor de los sitios de hibernación, alimentación y reproducción.

Analizar de manera particular cada factor que contribuye a la disminución de la mariposa monarca en los diversos sitios de alimentación, reproducción e hibernación, promoverá estrategias funcionales para el aumento de su sobrevivencia. Es importante analizar cada estadio del ciclo de vida de la mariposa monarca, primordialmente en los estadios larvales, ya que de su alimentación y formación dependen los consecuentes estadios de crisálida y mariposa.

La investigación ayudará al entendimiento de los patrones poblacionales de la mariposa monarca ante la amenaza de los insecticidas cerca o alrededor de los sitios de hibernación, alimentación y reproducción como la Reserva de la Biosfera de la Mariposa Monarca (RBMM) y diferentes áreas naturales protegidas (ANP's) contribuyendo a trabajos posteriores para generar estrategias de conservación.

8.0. HIPÓTESIS

- Los estadios larvales de *Danaus plexippus* presentarán una respuesta diferencial en la sobrevivencia, crecimiento e ingesta ante diferentes dosis de FURADAN ®.

9.0. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar los efectos ante diferentes dosis de FURADAN ® en los estadios larvales de *Danaus plexippus*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar los efectos de diferentes dosis de FURADAN ®, en la sobrevivencia larval de *Danaus plexippus*.
- Examinar los efectos de diferentes dosis de FURADAN ®, en el crecimiento larval de *Danaus plexippus*.
- Determinar los efectos de diferentes dosis FURADAN ®, en la ingesta foliar larval de *Danaus plexippus*.

10.0. MÉTODOS

Germinación, crecimiento y propagación de planta hospedera

Se cultivaron en un invernadero plantas de *Asclepias curassavica* (n= 450), en una densidad de 3 plantas por maceta. Las semillas fueron obtenidas del mariposario ubicado dentro del parque ecológico Toltláli en el municipio de Zumpahuacán (Guerrero s/n, Zumpahuacán, San Pablo Tejalpa, Estado de México) y del museo de Ciencias Naturales ubicado dentro del parque Matlazincas en el municipio de Toluca (Matlatzincas s/n, Toluca de Lerdo, Estado de México).

Las semillas se esterilizaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 3% y agua destilada para evitar esporas del parásito *Ophryocystis elektroscirrha* (Myers). Se les realizó un escaramiento con una navaja estéril. Las plántulas fueron colocadas en bandejas de propagación con 20 g de tierra de monte a ½" de profundidad, selladas con parafilm de una a dos semanas a 18°C ± 22°C. Las plántulas emergidas fueron colocadas de manera individual en macetas de plástico de 50cm de diámetro, en un invernadero con 500 g de tierra de monte y fertilizante 40g; 17:5:17 N:P: K, a 1" de profundidad y 22°C ± 27°C (Olaya & Kaplan 2019, Cuevas *et al.* 2013).

La propagación de la planta se hizo a través de esquejes. Las plantas maduras con tallo leñoso fueron seleccionadas para realizar cortes transversales con puntas en diagonal de tallo. Cada segmento de tallo (15 cm) fue colocado en frasco con agua por una semana para estimular el crecimiento radicular posteriormente, fueron plantados en macetas de plástico rígido 28x 23x 31 cm, con tierra de monte (500 gr) y fertilizante (40 gr; 17:5:17 N:P:K) a 2" de profundidad, colocadas en invernadero a 22°C ± 27°C (Cuevas *et al.* 2013, SEMARNAT & CONANP 2018, Yar- Barreros 2019).

Crianza y manejo de mariposa monarca en sus diferentes estadios

Su reproducción y crianza fueron guiados por el "Plan de Acción para la Conservación de la Mariposa Monarca en México, 2018–2024), la "Propuesta de protocolo de zoocría de la mariposa monarca (*Danaus plexxipus*), para la

implementación de un mariposario en Quito, Ecuador” y “Reproducción de *Danaus plexxipus* L. residente (Lepidoptera: Nymphalidae: Danainae) bajo condiciones de laboratorio en México” (Cuevas *et al.* 2013, SEMARNAT & CONANP 2018).

Se obtuvieron huevos (n= 540) de hembras en cautiverio de diferentes mariposarios ubicados en 1) Parque ecológico Toltláli en el municipio de Zumpahuacán (Guerrero s/n, Zumpahuacán, San Pablo Tejalpa, Estado de México), 2) Zoológico de Chapultepec en la Ciudad de México (Acuario s/n, Miguel Hidalgo, Ciudad de México), 3) Museo Vivo “Los bichos de Malinalco” (Pensamientos s/n, San Guillermo, Malinalco Estado de México).

Los huevos fueron trasladados al laboratorio de Ecofisiología Animal, ubicado la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex; Carretera Toluca - Ixtlahuaca Km 15.5, Piedras Blancas, Toluca de Lerdo, México). En el laboratorio cada huevo fue lavado con agua destilada y colocado en una hoja de *A. curassavica* esterilizada con hipoclorito de sodio (NaClO) al 3% y agua destilada evaporación (Yeargan & Allard 2005, Mikery *et al.* 2013).

Cada huevo con su hoja se colocó en cajas Petri (60 x 15 mm), esterilizadas y etiquetadas con un número de identificación, tratamiento, día de eclosión larval. Se llevaron a cámaras de incubación a $26^{\circ}\text{C} \pm 27^{\circ}\text{C}$, con RH de 50% y fotoperiodo 11 h:13 h (luz:oscuridad). Las larvas eclosionadas se mantuvieron en las mismas condiciones que los huevos. Los estadios larvales se identificaron con base al tamaño de la cabeza y la longitud de filamentos en el tórax y abdomen (Oberhauser & Howard 2009, Cuevas *et al.* 2013, Mikery *et al.* 2013).

Tratamientos con insecticidas y exposición dietética

Se recolectaron y cortaron las hojas de *A. curassavica* obtenidas del invernadero en diferentes tamaños, para alimentar a las larvas de acuerdo con su estadio; larva I 6 - 7cm², larva II 9 - 10 cm², larva III 14 - 16 cm², larva IV 24- 26 cm² y larva V 25 ± 26 cm². Cada hoja utilizada, se esterilizó con hipoclorito de sodio

(NaClO) al 3% y agua destilada para evitar esporas del parásito *Ophryocystis elektroscirrha* (Myers) (Yeargan & Allard 2005, Cuevas *et al.* 2013).

En la superficie abaxial de cada hoja, se aplicaron las diferentes dosis de FURADAN® (FMC 10242; 2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil metilcarbamato), mediante aspersión media. Se utilizaron un total de 2 tratamientos: con insecticida (I) y sin insecticida (NI). Los tratamientos con insecticida tuvieron diferentes dosis: 5, 10, 7.5, 10, 15 y 30 g en una dilución de 20 L de agua destilada, mientras los tratamientos sin insecticida fueron considerados como grupos controles. Cada dosis tuvo los diferentes estadios larvales (LI, LII, LIII, LIV y LV) y cada estadio larval 9 larvas, considerando a cada una como réplica biológica (Oberhauser & Howard 2009, Mikery *et al.* 2013).

Análisis estadístico

Se evaluó la sobrevivencia larval a través de tablas de vida de cohorte. Se consideraron para cada estadio los siguientes parámetros (Rabinovich 1980, Krebs 1989, Díaz 2018):

- $n_{x+1} = n_x - d_x$
- $l_x = n_x / n_0$
- $L_x = (n_x + n_{x+1}) / 2$
- $s_x = 1 - q_x$
- $d_x = (l_x - l_{x+1})$
- $q_x = d_x / n_x$
- $T_x = \sum L_x$

Donde:

x : " Estadio

n_x : Número total de organismos observados al inicio de cada estadio

l_x : Número de organismos que sobrevive por estadio

L_x : Probabilidad de sobrevivencia entre dos estadios sucesivos

sx: Tasa de sobrevivencia durante el estadio x a $x+1$

dx: Proporción de la cohorte que muere en cada estadio x a $x+1$

qx: Tasa de mortalidad durante el estadio x a $x+1$

Tx: Sumatoria de la probabilidad de vida en cada estadio

Mediante las tasas de sobrevivencia obtenidas para cada estadio, se obtuvieron las curvas de sobrevivencia Kaplan-Meier y la prueba de rango logarítmico para comparar entre tratamientos (Romero & Cortina 2007, Quispe *et al.* 2014).

Se realizaron pruebas de ANOVA de dos vías para probar el efecto de los 2 tratamientos (6 con insecticidas y 6 sin insecticida). Se realizaron pruebas de ANOVA de dos vías con prueba Tukey en las variables de respuesta: área foliar consumida (herbivoría) y comparación morfológica (tamaño de la cabeza, tórax y abdomen). Para todos los datos se realizaron pruebas de normalidad (Kolmogorov-Smirnov).

11.0. RESULTADOS

“EVALUATION OF LARVAL SURVIVAL, IN POPULATIONS OF MONARCH BUTTERFLY (*Danaus plexippus*), EXPOSED TO MEDIUM AND MAXIMUM DOSES OF CARBAMATE INSECTICIDES IN MEXICO”.

CARBAMATE TOXICITY DURING LARVAL DEVELOPMENT IN THE MONARCH BUTTERFLY (*Danaus plexippus*) IN MEXICO.

Simona Fernanda Bernal- Pichardo¹, Josele Ricardo Flores-Santin^{1*}, José Fernando Méndez, Sánchez¹, José Francisco Ramírez Dávila³, Edward M. Dzialowsky⁵.

¹Laboratory of Animal Ecophysiology, Faculty of Sciences, UAEM, Toluca de Lerdo, State of Mexico C.P. 50200.

²Laboratorio de Investigaciones Entomológicas y Tecnologías en Agricultura de Precisión; Facultad de Ciencias Agrícolas, UAEM Toluca de Lerdo, State of Mexico C.P. 50200., ³ Department of Biological Sciences, University of North Texas, Denton, TX, 76203, USA

*Email: jfloress538@profesor.uamex.mx

Abstract:

This study investigated the impact of carbamate insecticides on the survival and development of monarch butterfly larvae (*Danaus plexippus*) across different life stages. Through controlled experiments, varying doses of carbamate insecticide (FURADAN ®) were administered to larvae, and their survival rates and morphological abnormalities. The results revealed that higher doses of carbamate insecticide led to a significant reduction in larval survival, particularly in stages LIII and LV, where survival rates dropped by 50-100% at a dose of 30 g/L. Additionally, larvae exposed to higher doses exhibited a higher prevalence of morphological malformations during development, attributed to the inhibitory action of carbamate insecticides on acetylcholinesterase (AChE). Despite the adverse effects observed, certain larval stages demonstrated resilience, possibly due to metabolic resistance mechanisms acquired from feeding on host plants containing cardiac glycosides. The study evidence the importance of understanding the differential impacts of insecticide exposure on monarch butterfly populations and highlights the need for

targeted conservation strategies and environmentally sound policies to mitigate insecticide-related risks to this iconic species.

Keywords: Insecticides, monarch butterfly, decline, carbamate, survival, toxicity.

INTRODUCTION

The monarch butterfly (*Danaus plexippus*) is a keystone species (Catalá 2011), recognized for its annual migration (CONANP 2010). The long migration begins with the departure from its birthing sites in North America during the winter to the temperate forest in central Mexico. There are two migratory populations, the eastern (which includes 90% of the population) and the western (which includes 10% of the population). The eastern population is found east of the Rocky Mountains from southern Canada and much of the United States and hibernates in central Mexico (CONANP 2010, Cuevas *et al.* 2013, Kesler & Bunch 2023).

During their migratory journey, the eastern population faces various threats: biotic ones such as predation (by birds, rodents, and arthropods) and parasitism (protozoa, fly larvae, and wasps; Altizer & Oberhauser 1999, Oberhauser *et al.* 2009, Hermann *et al.* 2019), and abiotic ones such as weather conditions (extreme temperatures below or above their tolerance range), habitat loss (breeding, feeding, and hibernation sites), and the use of pesticides (herbicides and insecticides; York & Oberhauser 2002, Brower *et al.* 2015, Couture *et al.* 2015, Olaya-Arenas & Kaplan 2019, Olaya-Arenas *et al.* 2020b, Ethier & Mitchell 2023, Kesler & Bunch 2023). Due to these factors, according to the Mexican Official Standard NOM-059-SEMARNAT-2010, the monarch butterfly is classified in the category of subject to special protection “Pr” (SEMARNAT 2010). On the other hand, the International Union for Conservation of Nature (IUCN) classifies it in the endangered category “EN” (IUCN 2022).

Most of the information regarding the various factors decreasing the survival of the monarch butterfly is limited to studies in the United States and Canada. Currently, these studies show that the main causes of its decline are habitat loss and insecticide use, directly linked to agricultural intensification (Crone *et al.* 2019,

Kaplan 2019, Olaya-Arenas *et al.* 2020b, Krishnan *et al.* 2021, Ethier & Mitchell 2023, Kesler & Bunch 2023, Prouty *et al.* 2023).

In Mexico, studies on the monarch butterfly are primarily focused on management programs for the Monarch Butterfly Biosphere Reserve (Merino & Hernández 2004, Brenner 2006), migration (Urquhart & Urquhart 1976, 1978, 1979, Calvert & Brower 1986) reproduction (Calvert & Brower 1986, Masters *et al.* 1988, Cuevas *et al.* 2013), and conservation (Merino & Hernández 2004, López 2007, Brenner 2006, Fajardo *et al.* 2011, García & Guzmán 2014, Islas *et al.* 2015, Rendon *et al.* 2023). However, there is no information showing the effect of Mexican field insecticides on the monarch butterfly.

The agricultural intensification associated with planting crops around the breeding, feeding, and hibernation sites of the monarch butterfly entails an increase in insecticide use. The most commonly used groups of insecticides in the United States and Canada are neonicotinoids, pyrethroids, and organophosphates (Crone *et al.* 2019, Olaya-Arenas & Kaplan 2019, Olaya-Arenas *et al.* 2020b, Ethier & Mitchell 2023, Kesler & Bunch 2023, Prouty *et al.* 2023). Meanwhile, in Mexico, the main ones are organophosphates and carbamates (CB; Gutiérrez *et al.* 2019).

Carbamate insecticides are the most commonly used around the breeding, feeding, and hibernation sites of the monarch butterfly in Mexico. They are primarily used to eliminate foliage-defoliating insects in crops such as *Asclepias* flowers (*Asclepias physocarpa* & *Asclepias curassavica*), sunflowers (*Tithonia rotundifolia* & *Helianthus annuus*), bird of paradise (*Strelitzia reginae*), Easter lily (*Lilium candidum*), squash blossom (*Curcubita pepo*), and fruits and vegetables like avocado (*Persea americana*), lettuce (*Lactuca sativa*), cilantro (*Coriandrum sativum*), radish (*Rhaphanus sativus*), and seeds such as corn (*Zea mays*), beans (*Phaseolus vulgaris*), and fava beans (*Vicia faba*; Bernal 2020).

Carbamate insecticides are compounds derived from carbamic acid with a broad spectrum of activity, meaning they are not specific to particular pests. They are dispersed directly on foliage and roots by spraying or indirectly through runoff

during irrigation and dispersal by wind (Sans *et al.* 2013, Crone *et al.* 2019, Olaya-Arenas *et al.* 2020b, Krishnan *et al.* 2021, Mdeni 2022).

Taking into account the above, the use of carbamate insecticides near feeding, breeding, and hibernation sites in Mexico could represent one of the main threats contributing to the decline in monarch butterfly populations. Therefore, the objectives of this project are to determine the effects of different relevant field doses of carbamate insecticide on the larval survival of *Danaus plexippus*, as well as to identify the larval stage most vulnerable to the insecticide.

METHODS

Germination, growth, and propagation of host plants.

The *Asclepias curassavica* plants (n=450) were cultivated in a greenhouse at a density of 3 plants per pot. Seeds were obtained from the butterfly house located within the Totláli ecological park in the municipality of Zumpahuacán (Guerrero s/n, Zumpahuacán, San Pablo Tejalpa, State of Mexico) and from the Museum of Natural Sciences of Estado de Mexico located within the Matlazincas park in the municipality of Toluca (Matlatzincas s/n, Toluca de Lerdo, State of Mexico; Naturalista 2022).

The seeds were sterilized with 3% sodium hypochlorite (NaClO) and distilled water. Scarification was performed using a sterile blade to facilitate germination. Seedlings were placed in propagation trays with 20 g of forest soil at a depth of 1.3 cm, sealed with parafilm for one to two weeks at a temperature of $18^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$. Emerged seedlings were individually planted in 50 cm diameter plastic pots in a greenhouse with 500 g of forest soil and 40 g of fertilizer; 17:5:17 N:P:K at a depth of 2.5 cm and $22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$ (Olaya & Kaplan 2019, Cuevas *et al.* 2013).

Plant propagation was done through cuttings. Mature plants with woody stems were selected for making transverse cuts with diagonal tips. Each stem segment (15 cm) was planted in pots at a depth of 5 cm, placed in a greenhouse at $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Cuevas *et al.* 2013, Yar-Barreros 2019).

Rearing and management of monarch butterflies at different stages.

Eggs (n=540) were obtained from females in captivity from various butterfly houses located in 1) Toltláli Ecological Park in the municipality of Zumpahuacán (Guerrero s/n, Zumpahuacán, San Pablo Tejalpa, State of Mexico), 2) Chapultepec Zoo in Mexico City (Acuario s/n, Miguel Hidalgo, Mexico City), 3) "Los Bichos de Malinalco" Living Museum (Pensamientos s/n, San Guillermo, Malinalco, State of Mexico).

The eggs were transported to the Animal Ecophysiology Laboratory located at the Faculty of Sciences of the Autonomous University of the State of Mexico (UAEMex; Carretera Toluca - Ixtlahuaca Km 15.5, Piedras Blancas, Toluca de Lerdo, Mexico). Each egg was washed with distilled water and placed on a sterilized leaf of *A. curassavica* treated with 3% sodium hypochlorite (NaClO) and distilled water (Yeargan & Allard 2005, Mikery *et al.* 2013).

Each egg with its leaf was placed in sterilized Petri dishes (60 x 15 mm), labeled with an identification number, treatment, and day of larval hatching. They were then incubated at $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, with a relative humidity of 50% and a photoperiod of 11:13 h (light:dark). The hatched larvae were kept under the same temperature and humidity conditions as the eggs. Larval stages were identified based on head size and the length of thorax and abdomen filaments (Oberhauser & Howard 2009, Cuevas *et al.* 2013, Mikery *et al.* 2013).

Insecticide treatments and dietary exposure

Leaves of *A. curassavica* obtained from the greenhouse were collected and cut into different sizes to feed the larvae according to their stage; larva I $6 \pm 1 \text{ cm}^2$, larva II $9 \pm 1 \text{ cm}^2$, larva III $14 \pm 1 \text{ cm}^2$, larva IV $24 \pm 2 \text{ cm}^2$, and larva V $25 \pm 2 \text{ cm}^2$. Each leaf used was sterilized with 3% sodium hypochlorite (NaClO) and distilled water (Yeargan & Allard 2005, Cuevas *et al.* 2013).

Different doses of carbamate insecticide (FURADAN®; FMC 10242; 2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranyl methylcarbamate) were applied to the abaxial surface of each leaf by medium spraying. A total of 12 treatments were used, 6 with insecticides (FURADAN®) and 6 without insecticides (control groups). Each

treatment (with and without insecticide) per stage (larva I, II, III, IV, and V) had a total of 9 larvae, considering each organism as a biological replicate. Insecticide treatments had different doses: 5, 7.5, 10, 15, and 30 g in a dilution of 20 L of distilled water (Oberhauser & Howard 2009, Mikery *et al.* 2013).

Statistical Analysis

Larval survival was assessed using cohort life tables. The following parameters were considered for each stage (Rabinovich 1980, Krebs 1989, Díaz 2018):

- $n_{x+1} = n_x - d_x$
- $l_x = n_x/n_0$
- $L_x = (n_x + n_{x+1}) / 2$
- $s_x = 1 - q_x$
- $d_x = (l_x - l_{x+1})$
- $q_x = d_x / n_x$
- $T_x = \sum_x L_x$

Where

"x": Stage

" n_x ": Total number of observed organisms at the beginning of each stage

" l_x ": Number of organisms that survive per stage

" L_x ": Probability of survival between two successive stages

" s_x ": Survival rate during stage x to x+1

" d_x ": Proportion of the cohort that dies in each stage x to x+1

" q_x ": Mortality rate during stage x to x+1

" T_x ": Sum of the probability of life in each stage

Using the survival rates obtained for each stage, Kaplan-Meier survival curves were generated, and the log-rank test was conducted to compare between treatments (Romero & Cortina 2007, Quispe *et al.* 2014). Two-way ANOVA tests were conducted to examine the effect of the 12 treatments (6 with insecticides and 6 without insecticide). Two-way ANOVA tests with Tukey's post hoc test were performed on the response variables: consumed leaf area (herbivory) and body size (head width, thorax length, and abdomen length).

RESULTS

Survival in different larval stages.

Survival data were obtained from $n=540$ monarch butterfly larvae (= 2 treatments x 6 doses x 5 stages x 9 biological replicates) at different stages (larva I, larva II, larva III, larva IV, larva V; Fig. 5).

Survival in both insecticide-treated (IT) and untreated (NT) groups significantly decreased across different doses (5, 7.5, 10, 15, 20, and 30 g/L; $F = 217.92$, $df = 1,29$; **$P = 0.0000$**) and larval stages ($F = 2.10$, $df = 4,29$; **$P = 0.1192$** ; Table 1).

The doses of 20 and 30 g/L (IT) resulted in the lowest survival rates across different larval stages. For larval stage I: 20 g/L - 55.56%, 30 g/L - 88.89%. For larval stage II: 20 g/L - 77.78%, 30 g/L - 88.89%. For larval stage III: 20 g/L - 77.78%, 30 g/L - 100%. For larval stage IV: 20 g/L - 33.34%, 30 g/L - 77.78%. For larval stage V: 20 g/L - 44.45%, 30 g/L - 77.78%. The most vulnerable stages were III and V at doses of 30 g/L, with 100% decrease in survival (Fig.5).

There were significant differences in the median lethal dose (LD_{50} ; $F = 217.92$, $df = 4,29$; **$P = 0.0000$**) between the doses of 15 and 20 g (Fig. 6), across different larval stages ($F = 2.10$, $df = 4,29$; **$P = 0.1192$**).

In larval stage I, the LD_{50} was found at 19 g/L. In larval stage II, the LD_{25} was found at 20 g/L. In larval stage III, the LD_{50} was found at 16 g/L. In larval stage IV,

the LD₅₀ was found at 23.5 g/L. In larval stage V, the LD₅₀ was found at 21 g/L (Fig. 6).

Larval deformities in different stages.

Larvae in the IT group at the highest doses of 20 and 30 g/L that managed to survive exhibited resistance to the insecticide but showed morphological deformities (Fig. 7), with significant differences observed between doses ($F = 17.05$, $df = 4,29$; $P = 0.0001$) and larval stages ($F = 0.41$, $df = 4,29$; $P = 0.7972$).

The larvae with the highest percentage of deformities were at stages III (20 g/L - 55.55%, 30 g/L - 77.77%), IV (20 g/L - 44.44%, 30 g/L - 66.66%), and V (20 g/L - 11.11%, 30 g/L - 55.55%; Fig. 7).

The morphological deformities observed varied between larval stages during the ecdysis process. Larvae transitioning from stage II to III, and from III to IV, displayed three types of malformations: 1) they did not develop the thoracic (T1, T2, and T3) and abdominal (A1-A10) segments (Fig. 8 A); 2) they did not develop either the left or right antenna, which remained attached to the cephalic capsule along with the labrum (Fig. 8 B); 3) they did not shed the exoskeleton during the larval ecdysis process, leaving remnants on the last abdominal segments (A7, A8, A9, A10; Fig. 8 B). Larvae in stage V also exhibited deformities during the pupal ecdysis process, with remnants of the chrysalis exoskeleton observed in the cephalic capsule, thoracic segments (T1, T2, T3), and abdominal segments (A9 and A10; Fig. 8 C).

Size of cephalic capsule, thorax, and abdomen of the different larval stages.

The larvae showed significant differences in the size of the cephalic capsule between the IT and NT groups; ($F = 163.45$, $df = 1, 539$; $P = 0.0000$), as well as between the different doses ($F = 33.21$, $df = 5, 539$; $P = 0.0000$) and larval stages ($F = 974.96$, $df = 4, 539$; $P = 0.0000$). A decrease in the size of the cephalic capsule was observed in all larval stages (LI, LII, LIII, LIV, LV) in the insecticide-treated groups (Fig. 9 and 10).

The larvae showed significant differences in body size (thorax and abdomen) between the IT and NT groups ($F = 110.97$, $df = 1, 539$; $P = 0.0000$), as well as

between the different doses ($F = 12.46$, $df = 5$, 539; $P = 0.0000$) and larval stages ($F = 1894.57$, $df = 4$, 539; $P = 0.0000$). All larval stages (LI, LII, LIII, LIV, LV) exhibited a decrease in body size in the insecticide-treated groups (Fig. 11 and 12).

The larvae displayed no significant differences in the amount of food consumed (foliar ingestion) between the IT and untreated NT groups ($F = 7.73$, $df = 10$, 323; $P = 0.0167$). However, variations were observed in relation to different doses ($F = 21.64$, $df = 5$, 323; $P = 0.0000$) and larval stages ($F = 1902.06$, $df = 2$, 323; $P = 0.0000$; Fig. 13 and 14).

DISCUSSION

The analysis of results from 540 larvae reveals a significant decrease in survival rates in both the IT and untreated NT groups. In the NT treatments, survival decreased by 0% to 11.11%, while in the IT treatments, it ranged from 11.11% to 100%, depending on the dose and larval stage (Table and Fig. 5). In the IT treatments, doses of 5 g/L, 7.5 g/L, and 10 g/L had a lesser impact on survival, reducing it from 11.11% to 22.23%, while doses of 20 g/L and 30 g/L had a greater effect, decreasing survival from 44% to 100% (Table and Fig. 5).

The dosage where 50% of the population dies (LD_{50}) for groups LI, LIII, LIV y LV was found at a range of 19 g/L to 23.5 g/L. LD_{25} for group LII was 20 g/L (Fig. 5). Larvae in stages LIII and LV were the most vulnerable, with survival decreasing to 100% at the 30 g/L dose (Fig. 5). Under this dose, larvae died during the larval ecdysis process, unable to progress to the next stage. LIII larvae exhibited intermittent motor activity with discontinuous, slow, or accelerated spasms, likely hindering the development of thoracic and abdominal segments (Fig. 8A), antennae, and the shedding of the exoskeleton (Fig. 8B), indicating arrested larval ecdysis, resulting in death before progressing to stage LIV. LV larvae died during the pupal ecdysis process without forming a chrysalis. Remnants of chrysalis exoskeleton were observed in LV larvae in the cephalic capsule, thoracic segments (T1, T2, and T3), and abdomen (A9 and A10; Fig. 8C).

Iturbide *et al.* (2020) assessed the impact of various carbamates on bees (*Apis mellifera*), revealing a 27% decrease in survival with ethyl-4-bromophenyl and ethyl-4-chlorophenyl at doses of 20 mg/mL, while propoxur resulted in a 100% decrease in survival at 1 mg/mL. Weiden (1971) outlined symptoms of carbamate insecticide poisoning in houseflies (*Musca domestica*), noting motor hyperactivity and eventual paralysis at LD₅₀ doses ranging from 0.004 to 0.08 g/L. Conversely, Krishnan *et al.* (2021) and Prouty *et al.* (2021) observed arrested pupal ecdysis in monarch butterfly LV larvae exposed to neonicotinoids at LD₅₀ concentrations of 1.3–74 µg/g of leaf, respectively.

The observed decline in survival, morphological abnormalities, and signs of intoxication in our study align with the cholinergic mechanism of carbamates, which inhibit acetylcholinesterase (AChE), causing acetylcholine (ACh) accumulation in neural tissues (Yi *et al.* 2006). This disruption overstimulates the cholinergic system, leading to symptoms ranging from muscle spasms to paralysis, tachycardia, and ultimately death (Weiden 1971, Jiang *et al.* 2013).

Interestingly, larvae in our study exhibited varying survival rates (33.34% to 88.89%) at doses of 20 and 30 g/L, possibly due to coevolution with their host plant *Asclepias* sp. The plant's secondary metabolites, such as cardiac glycosides, likely conferred metabolic resistance, facilitated by modifications to the Na⁺/K⁺ pump, allowing larvae to sequester and metabolize toxic compounds (Karageorgi *et al.* 2019, Krueger *et al.* 2022).

Our findings diverge from those in the United States and Canada, primarily due to the higher doses of insecticides used in our analysis. While different insecticide groups were employed with distinct mechanisms of action, comparisons can be drawn based on their sublethal and lethal effects.

Despite the extensive research on various insecticide groups in North America, our study provides crucial evidence of the impact of carbamate insecticides on monarch butterfly larval development in Mexico, particularly around hibernation sites (Crone *et al.* 2019, Olaya-Arenas & Kaplan 2019, Olaya-Arenas *et al.* 2020b,

Krishnan *et al.* 2021, Ethier & Mitchell 2023, Kesler & Bunch 2023, Prouty *et al.* 2023).

CONCLUSION

The doses of carbamate insecticide (FURADAN ®) at 5, 7.5 and 10 g/L had a lesser impact on larval survival, with a decrease from 11.11% to 22.23%, while doses of 20 and 30 g/L showed a more pronounced effect, reducing survival from 44% to 100%. The larval stages most vulnerable to carbamates were LIII and LV, where survival decreased between 50% and 100% with a dose of 30 g/L, and malformations of 65% to 85% were observed in segments, antennae, and chrysalis.

The response to decreased survival and the presence of malformations is due to inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) caused by carbamate insecticide blockage. However, there is metabolic resistance in different larval stages due to their ability to synthesize toxic substances derived from feeding on cardiac glycosides. A detailed analysis of each factor contributing to the decline of the monarch butterfly population in their feeding, breeding, and hibernation sites will enable the development of effective strategies to increase their survival. It is crucial to examine each stage of the monarch butterfly's life cycle, especially the larval stages, as their feeding and development influence the subsequent stages of chrysalis and butterfly. This study provides valuable information to implement new environmental strategies and policies aimed at regulating the use of carbamate insecticides to improve the survival of monarch butterfly populations (*Danaus plexippus*).

Acknowledgements

The authors wish to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) for the posgraduate scholarship stipend granted to S.F Bernal-Pichardo to perform the research and obtain her masters degree, we also want to thank the Programa de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales (PCARN) as well as Facultad de Ciencias UAEMex.

REFERENCES

1. Altizer, S.M., & Oberhauser, K.S. (1999). Effects of the Protozoan Parasite *Ophryocystis elektroscirrha* on the Fitness of Monarch Butterflies (*Danaus plexippus*). Journal of Invertebrate Pathology, 74(1): 76–88. <https://doi.org/10.1006/jipa.1999.4853>.
2. Bernal- Pichardo, S.F. (2020). Conservación de la mariposa monarca (*Danaus plexippus*): Evaluación y análisis de la sobrevivencia en cultivos de *Asclepias sp.* en Valle de Bravo. Repositorio Institucional (RI). Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex). (Consultado: 13 de Diciembre 2022, <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/109434?show=full>).
3. Brenner, L. (2006). Áreas naturales protegidas y ecoturismo: el caso de la Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca México Relaciones. Estudios de historia y sociedad, 27(105): 237-265.
4. Brower, L.P., Fink, L.S., Kiphar, R.J., Pocius, V., Zubieta, R.R. & Ramírez, M.I. (2015). Effect of the 2010-2011 drought on the lipid content of monarchs migrating through Texas to overwintering sites in Mexico, in Monarchs in a Changing World: Biology and Conservation of an Iconic Butterfly. Eds KS Oberhauserer, KR Nail y S. Altizer. Ithaca, NY: Cornell University Press. 12 pp.
5. Calvert, W.H. & Brower, L.P. (1986). The location of monarch butterfly (*Danaus plexippus*) overwintering colonies in Mexico in relation to topography and climate. Journal of the lepidopterists Society, 40 (03): 164-167.
6. Catalá, E. I. (2011). Los conceptos de especies indicadoras, paraguas, banderas y claves: su uso y abuso en ecología de la conservación. Interciencia, 36(1), 31-38.
7. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP). (2010). Monitoreo de las colonias de hibernación de la mariposa monarca (*Danaus plexippus*) en la Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca. (Consultado: 28 abril 2022, <http://www.conanp.gob.mx/acciones/fichas/mariposa/info/info.pdf>).

8. Couture, J.J., Serbin, S.P. & Townsend, P.A. (2015). Elevated temperature and periodic water stress alter growth and quality of common milkweed (*Asclepias syriaca*) and monarch (*Danaus plexippus*) larval performance. *Arthropod. Plant Interaction*, 9 (2): 149–161. <https://doi.org/10.1007/s11829-015-9367-y>.
9. Crone, E.E., Pelton, E.M., Brown, L.M., Thomas, C.C. & Schultz, C.B. (2019). Why are monarch butterfly populations declining in western North America? *Ecological Applications*, 29 (7): 1-18. <https://doi.org/10.1002/eap.1975>.
10. Cuevas, M., Rodríguez, X., Romero, C.A. & Romero, J.M. (2013). Reproducción de *Danaus plexippus* L. residente (Lepidoptera: Nymphalidae: Danainae) bajo condiciones de laboratorio. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 53: 299–309.
11. Díaz, F.J. (2018). Introducción a los estudios de cohorte en epidemiología y al análisis de supervivencia, 8(1): 43-53.
12. Ethier, D.M., & Mitchell, G.W. (2023). Effects of climate on fall migration phenology of monarch butterflies departing the northeastern breeding grounds in Canada. *Global Change Biology*, 29, 2122–2131. <https://doi.org/10.1111/gcb.16579>.
13. Fajardo, I. Rojas, A. & Ortega, S. (2011). El turismo alternativo como estrategia de conservación de la reserva de la biosfera de la mariposa monarca (2008-2010). *Journal Quivera*, 13 (2): 115- 133.
14. García, F. & Guzmán, A. (2014). Conservando la mariposa monarca (*Danaus plexippus*), conservando enemigos naturales de plagas. (Consultado: 12 Mayo 2022, <http://www.scielo.org.mx/pdf/rcscfa/v20n3/v20n3a9.pdf>).
15. Gutiérrez- Moreno, R., Mota- Sanchez D., Blanco, A., Whalon, M., Terán- Santofimio H., & Rodríguez- Maciel, C., DiFonzo, C. (2019). Field-Evolved Resistance of the Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to Synthetic Insecticides in Puerto Rico and Mexico. *Journal of Economic Entomology*, 112 (2): 792–802. <https://doi.org/10.1093/jee/toy372>.

16. Hermann, S.L., Blackledge, C. & Haan, N.L. (2019). Predators of monarch butterfly eggs and neonate larvae are more diverse than previously recognised. *Sci Rep* 9 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50737-5>.
17. Islas A., Ramiro M., González A., Romero M.E. & Velasco E. (2015). Riesgo del hábitat de la mariposa monarca (*Danaus plexippus*) ante escenarios de cambio climático. *Revista Xim hai*, 11 (5): 49-59.
18. Iturbe- Requena, S.L., Prado-Ochoa, M.G., Muñoz-Guzmán, M.A., Carrillo-Miranda, L., Velázquez-Sánchez, A.M., Ángeles, E., & Alba-Hurtado, F. (2020). Acute oral and contact toxicity of new ethyl-carbamates on the mortality and acetylcholinesterase activity of honey bee (*Apis mellifera*). *Chemosphere*, 242: 125293. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125293>.
19. Jiang, Y., Swale, D., Carlier, P.R., Hartsel, J.A., M.M., Ekström, F., & Bloomquist, J.R. (2013). Evaluation of novel carbamate insecticides for neurotoxicity to non-target species. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 106(3): 156-161. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.03.006>.
20. Karageorgi, M., Groen, S.C., Sumbul, F., Pelaez, J.N., Verster, K. I., Aguilar, J.M. & Whiteman, N.K. (2019). Genome editing retraces the evolution of toxin resistance in the monarch butterfly. *Nature*, 574(7778): 409-412. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1610-8>.
21. Kesler, K.K. & Bunch, R. (2023). Mapping the Migration: A Western Monarch Butterfly Site Suitability Study. *International Journal of Applied Geospatial Research (IJAGR)*, 14(1), 1-22. <http://doi.org/10.4018/IJAGR.316769>.
22. Krebs, C.J. (1989). *Ecological methodology*. Harpercollins Publishers, New York. 654 pp.
23. Krishnan, N., Zhang, Y., Aust, M.E., Hellmich, R.L., Coats, J.R. & Bradbury, S.P. (2021). Monarch Butterfly (*Danaus plexippus*) Life-Stage Risks from Foliar and Seed-Treatment Insecticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40(6): 1761-1777. <https://doi.org/10.1002/etc.5016>.

24. Krueger, A.J., Rault, L.C., Robinson, E.A., Weissling, T.J., Vélez, A.M., & Anderson, T.D. (2022). Pyrethroid insecticide and milkweed cardenolide interactions on detoxification enzyme activity and expression in monarch caterpillars. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 187, 105173. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105173>.
25. López, Y., Tejero J.D., Torres A.N. & Luna I. (2011). Flora del bosque mesófilo de montaña y vegetación adyacente en Avándaro, Valle de Bravo, Estado de México, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (88) 35-53.
26. Masters, A.R., Malcolm, S.B. & Brower, L.P. (1988). Monarch Butterfly (*Danaus Plexippus*) Thermoregulatory Behavior and Adaptations for Overwintering in Mexico. *Journal Ecology*, 69 (2): 458- 467. <https://doi.org/10.2307/1940444>.
27. Merino, L. & Hernández, M. (2004). Destrucción de instituciones comunitarias y deterioro de los bosques en la Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca, Michoacán, México. *Revista Mexicana de Sociología*, 66(2): 261-309.
28. Mdeni, N.L., Adeniji, A.O., Okoh A.I. & Okoh, O.O. (2022). Analytical Evaluation of Carbamate and Organophosphate Pesticides in Human and Environmental Matrices: A Review. *Molecules*, 27(3): 618. <https://doi.org/10.3390/molecules27030618>.
29. Mikery, O., Solórzano, E., Sánchez, D. (2013). Método de marcaje masivo de abejas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) para estudios ecoetológicos. *Acta Zoológica Mexicana*, 29(1): 248-251.
30. Naturalista. (2018). CONABIO. iNaturalist. (Consultado: 10 julio 2022, <https://mexico.inaturalist.org/taxa/75602-Asclepias-curassavica>).
31. Oberhauser, K.S., Manweiler, S., Lelich, R., Blank, M. (2009). Impacts of ULV resmethrin applications on non-target insects. *J. Am. Mosquito Contr.* 25, 83–9. <https://doi.org/10.2987/08-5788.1>.

32. Olaya-Arenas, P., Hauri, K. & Scharf, M.E. (2020). Larval pesticide exposure impacts monarch butterfly performance. *Sci Rep* 10: 14490. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71211-7>.
33. Prouty, C., Barriga, P., Davis, A.K., Krischik, V., & Altizer, S. (2021). Host plant species mediates impact of neonicotinoid exposure to monarch butterflies. *Insects*, 12(11): 999. <https://doi.org/10.3390/insects12110999>.
34. Prouty, C., Bartlett, L.J., Krischik, V. & Altizer, S. (2023) Adult monarch butterflies show high tolerance to neonicotinoid insecticides. *Ecological Entomology*, 48(5), 531–543. Available from: <https://doi.org/10.1111/een.13245>.
35. Quispe, E.P., Carbajal, A.V., Gozze, F. & Moreno, B.R. 2014. Ciclo biológico y tabla de vida de *Aedes aegypti*, en laboratorio: Trujillo (Perú). *Revista científica de estudiantes*, 1(3): 91- 101.
36. Rabinovich, J.E. (1980). Introducción a la ecología de poblaciones animales. Continental, México. 313 pp.
37. Ramírez- Campos, M.A. (2018). The pesticides use in agricultura and their enviromental disorder. *Rev. Enferm. Vanguard*, 6(2): 40-47. <https://doi.org/10.35563/revan.v6i2.210>.
38. Rendon- Salinas, E.A., Garcia- Serrano, A.E., Valera- Bermejo, A., Quesada, M. (2023). The monarch butterfly in Mexico: a conservation model. *Curr Opin Insect Sci*, 60: 101112. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2023.101112>.
39. Romero, V.J. & Cortina, H.A. (2007). Life tables of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) on three coffee accessions. *Revista Colombiana de Entomología*, 33(1): 10-16.
40. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010. Protección ambiental, especies nativas de México de flora y fauna silvestres, categorías de riesgo y especificación por su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. (Consultado: 26 mayo 2022, https://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5173091).

41. The International Union for Conservation of Nature's (IUCN) Red List. 2022. Migratory monarch butterfly now Endangered - IUCN Red List. (Consultado: 12 octubre 2022, <https://www.iucnredlist.org/search?query=monarch%20butterfly&searchType=species>).
42. Urquhart, F.A. & Urquhart, N.R. (1976). The overwintering Site of the eastern population of the Monarch Butterfly (*Danaus plexippus*; Danaidae) in southern Mexico. Journal Of The Lepidopterists Society, 30(7): 1-6.
43. Urquhart, F.A. & Urquhart, N.R. (1978). Autumnal migration routes of the eastern population of the monarch butterfly (*D. plexippus* L.; Danaidae; Lepidoptera) in North America to the overwintering site in the Neovolcanic Plateau of Mexico. Can. J. Zool, 56: 1759-1764.
44. Urquhart, F.A. & Urquhart, N.R. (1979). Vernal Migration of the monarch butterfly (*Danaus plexippus*. Lepidoptera: Danaidae) in north America from the overwintering site in the neo-volcanic plateau of Mexico. Journal The Canadian Entomologist, 111(01): 15-18.
45. Weiden, M.H. (1971). Toxicity of carbamates to insects. Bull World Health Organ. 44(1-3): 203-13. PMID: 4938022; PMCID: PMC2428010.
46. Yar- Barreros. (2019). Propuesta de protocolo de zoocría de la mariposa monarca (*Danaus plexippus*), para la implementación de un mariposario en Quito. Repositorio Institucional (RI). Universidad Central del Ecuador. (Consultado: 18 de diciembre 2022, chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/75126/24587121.2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y).
47. Yi, M.Q., Liu, H. X., Shi, X. Y., Liang, P., & Gao, X.W. (2006). Inhibitory effects of four carbamate insecticides on acetylcholinesterase of male and female *Carassius auratus* in vitro. Comparative biochemistry and physiology Part C: Toxicology & pharmacology, 143(1): 113-116. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.12.008>.

48. Yeargan, K.V. & Allard, C.M. (2005). Comparison of common milkweed and honeyvine milkweed (Asclepiadaceae) as host plants for monarch larvae (Lepidoptera: Nymphalidae). *Journal Kansas Entomol. Soc.*, 78 (3): 247–251.
49. York, H. & Oberhauser, K. (2002). Effects of Duration and Timing of Heat Stress on Monarch Butterfly (*Danaus plexippus*) (Lepidoptera: Nymphalidae) Development. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 75(4): 290-298.
<http://www.jstor.org/stable/25481789>.

TABLES AND FIGURES

Table 1. *Danaus plexippus* larval survival rates in treatments with insecticide (IT%) and without insecticide (NT%) at various doses (5, 7.5, 10, 15, 20, and 30 g/L), indicating the percentage of survival (0-100%) across different larval stages LI, LII, LIII, LIV, and LV.

Dosis Treatment (g/L)	Larval stages									
	LI 		LII 		LIII 		LIV 		LV 	
	IT%	NT%	IT%	NT%	IT%	NT%	IT%	NT%	IT%	NT%
5	11.11	11.11	11.11	0	11.11	0	0	0	0	0
7.5	22.23	0	22.23	0	22.23	0	0	0	0	11.11
10	11.11	0	22.23	11.11	22.23	11.11	0	0	0	0
15	22.23	0	44.44	0	44.44	0	11.11	0	0	0
20	55.56	0	77.78	0	77.78	0	33.33	0	44.44	0
30	88.89	11.23	88.89	0	100	11.11	77.78	0	100	0

Figure 5. *Danaus plexippus* larval survival curves of treatments with insecticide (IT; dashed lines) and without insecticide (NT; solid lines) at different doses (5, 7.5, 10, 15, 20, and 30 g/L), illustrating the percentage of survival (0-100%) across different larval stages (LI, LII, LIII, LIV, and LV).

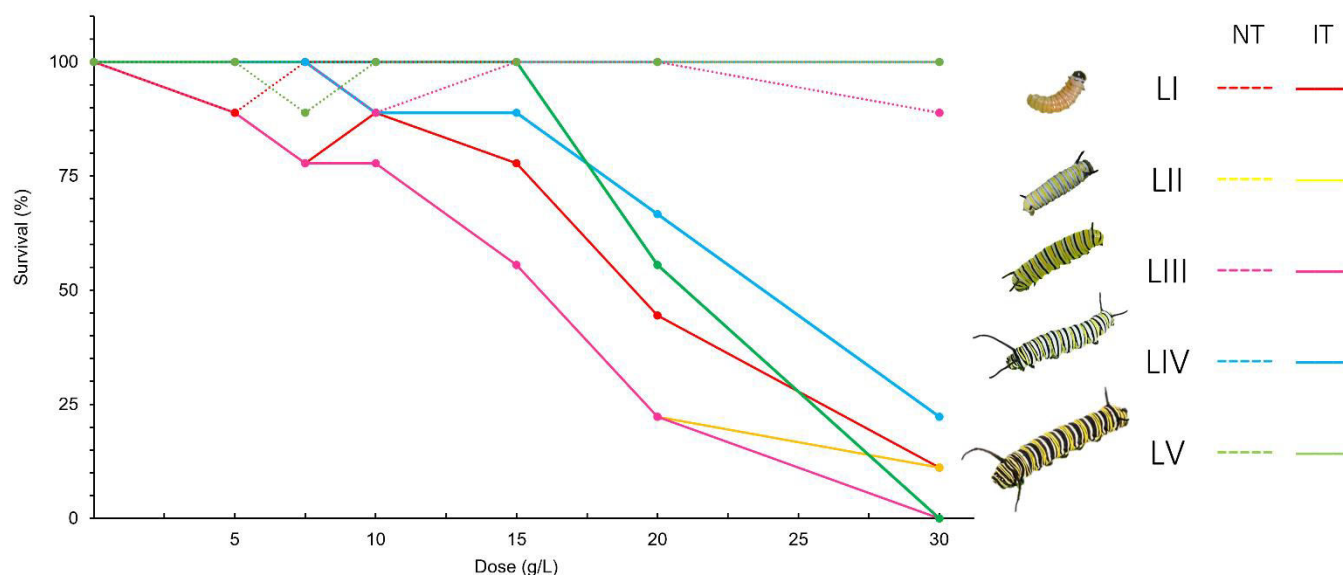


Figure 6. Survival curve illustrating the median lethal dose (LD_{50} , depicted by the red line) in insecticide treatments (IT) at various doses (15, 20, and 30 g/L), showing the 50% survival rate across different larval stages (LI, LII, LIII, LIV, and LV).

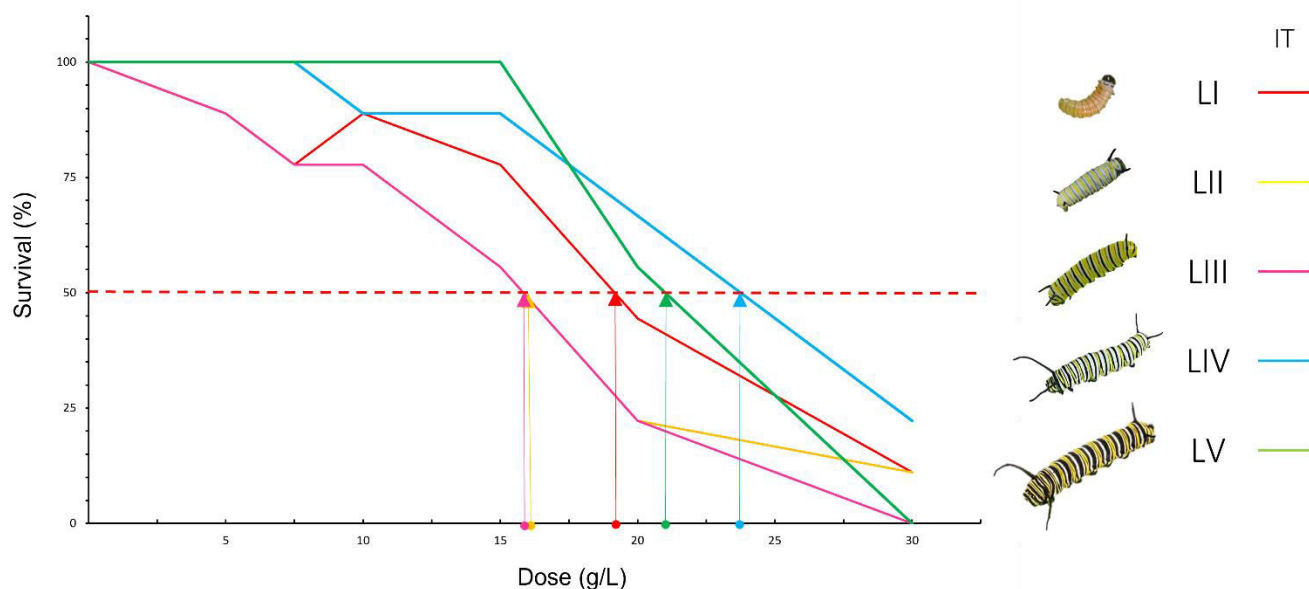


Figure 7. Malformation curve of the insecticide treatments (IT), showing the percentage of malformations at doses of 20 and 30 g/L in larvae LII, LIII, LIV, and LV.

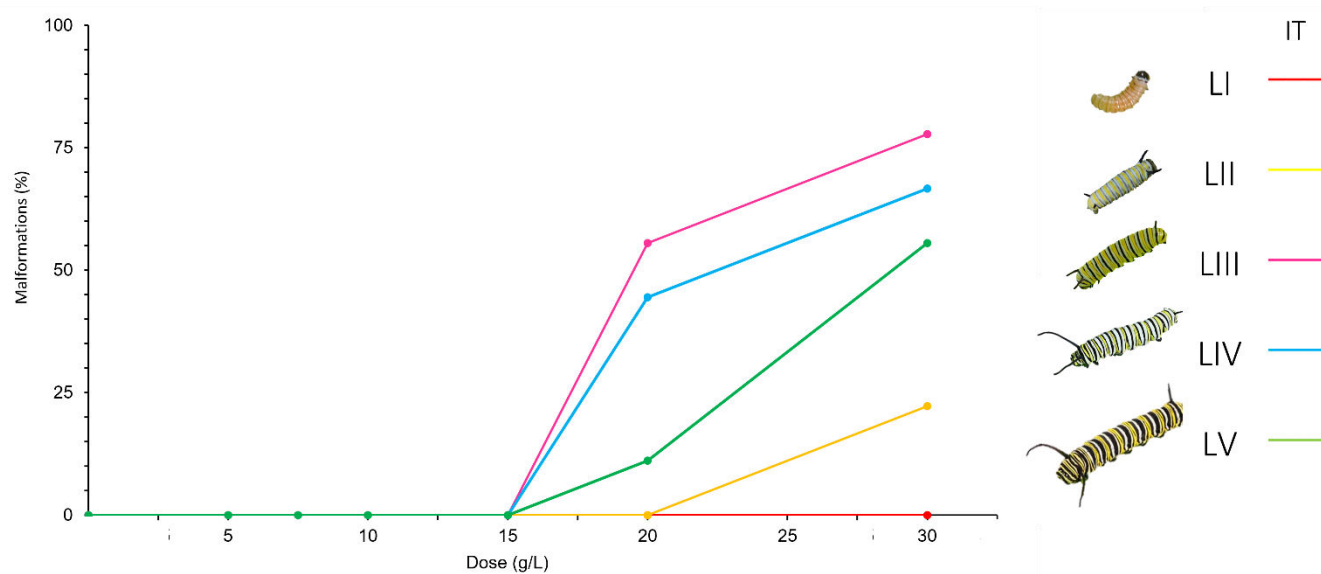


Figure 8. Malformations from insecticide treatments. Shown are doses 20 and 30 g/L in different larval stages (LIII, LV). A y B) LIII failed to develop proper thoracic and abdominal segments, did not develop the right antenna, C) LV did not form the chrysalis.

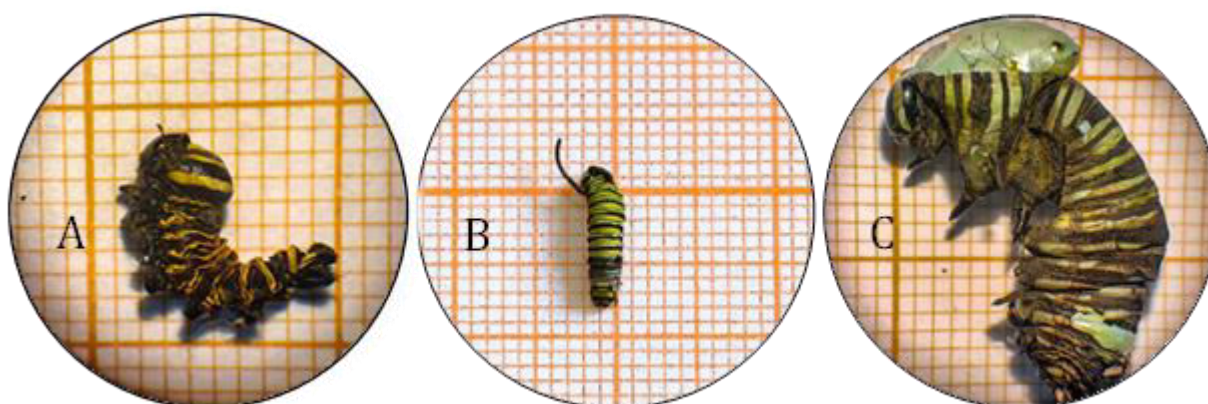


Figure 9. Head capsule size in larvae treated with insecticide (IT; red line) and untreated larvae (NT; black line) across different developmental stages (LI, LII, LIII, LIV, and LV), indicating a reduction in size in the insecticide-treated group (IT).

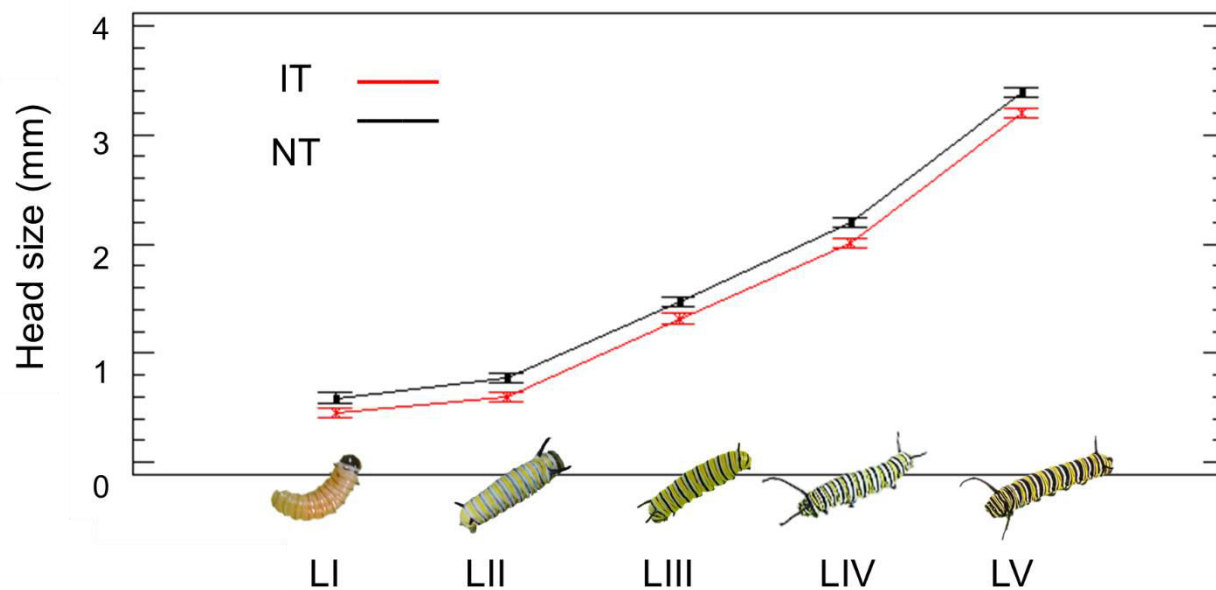


Figure 10. Head capsule size in larvae treated with insecticide (IT) at varying doses (5, 7.5, 10, 15, 20, and 30 g/L), illustrating the growth of each larval stage (LI, LII, LIII, LIV, and LV).

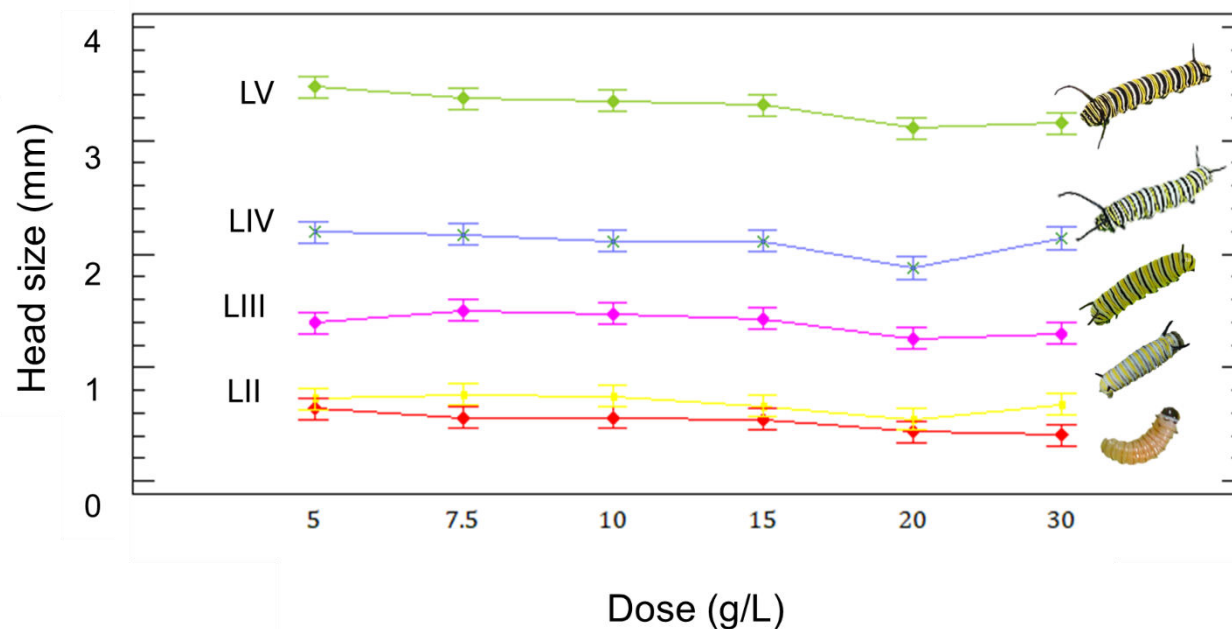


Figure 11. Body size in larvae treated with insecticide (IT; red line) and without insecticide (NT; black line) across various larval stages (LI, LII, LIII, LIV, and LV), indicating a reduction in size in the insecticide-treated groups (IT).

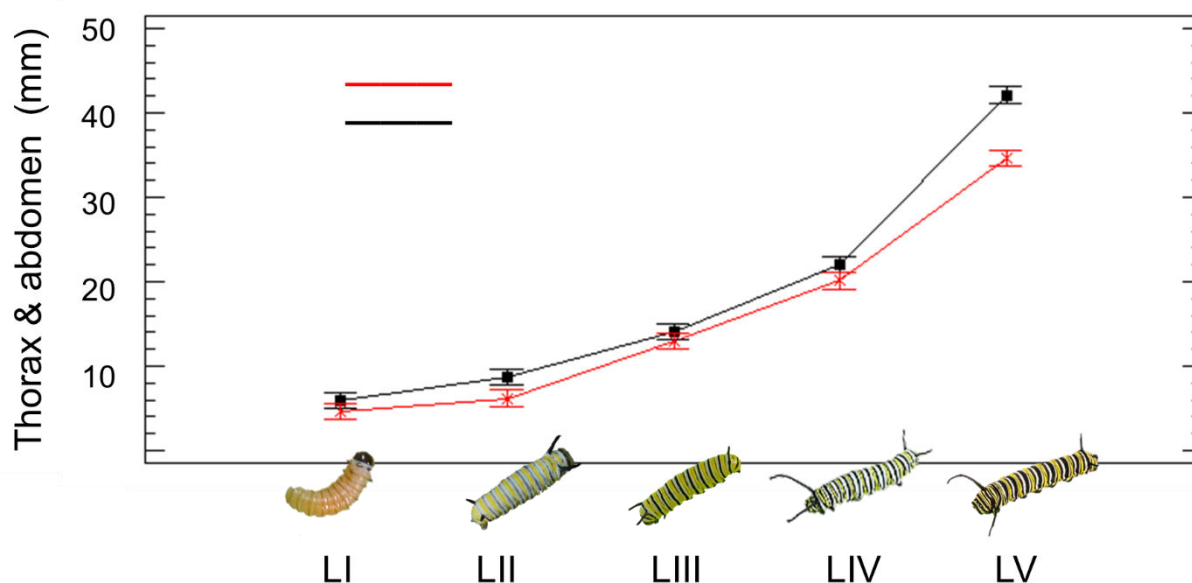


Figure 12. Body size (thorax and abdomen) in larvae treated with insecticide (IT) at different doses (5, 7.5, 10, 15, 20, and 30 g/L), illustrating the growth of each larval stage (LI, LII, LIII, LIV, and LV).

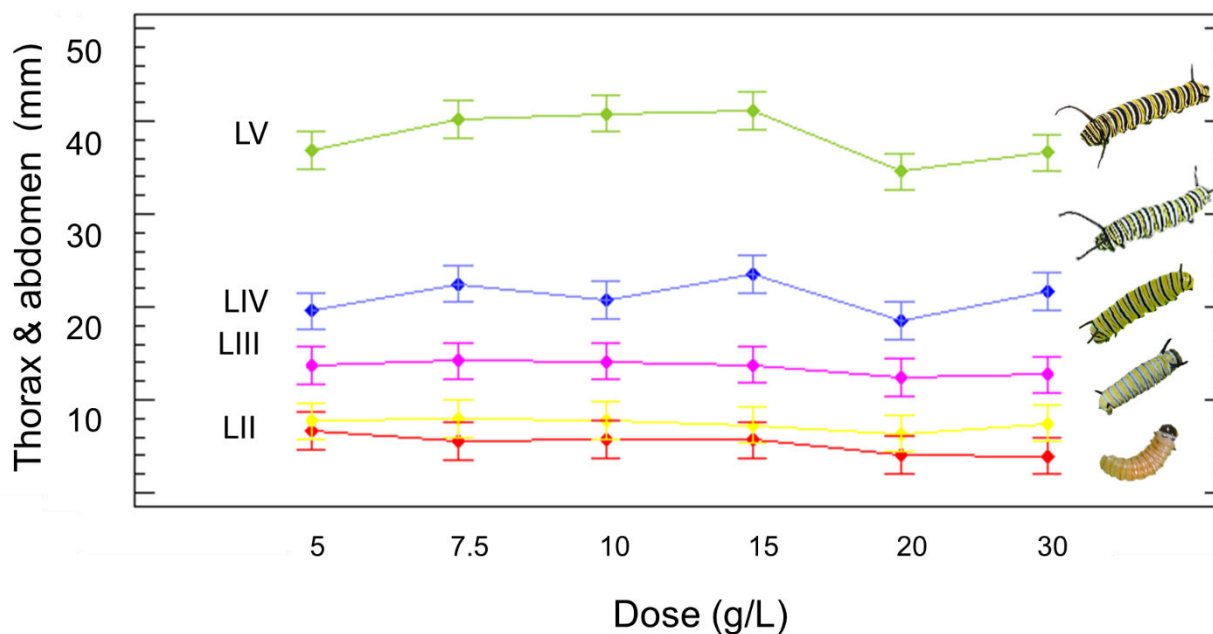


Figure 13. Foliar consumption in treatments with insecticide (IT; red line) and without insecticide (NT; black line), across different larval stages (LI, LII, LIII, LIV, and LV), indicating comparable foliar intake in all treatments.

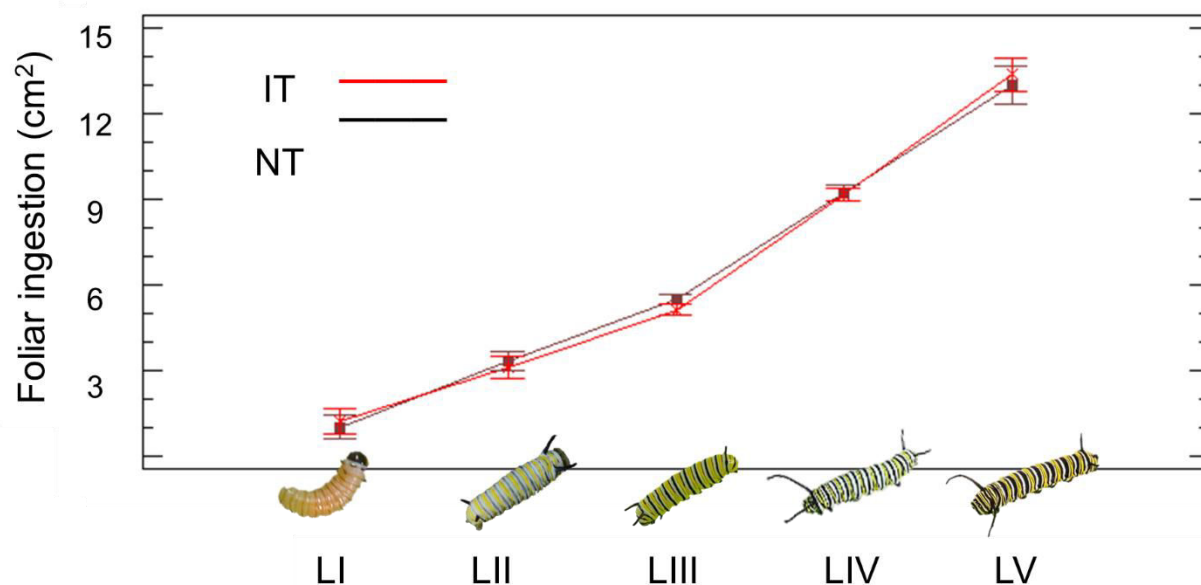
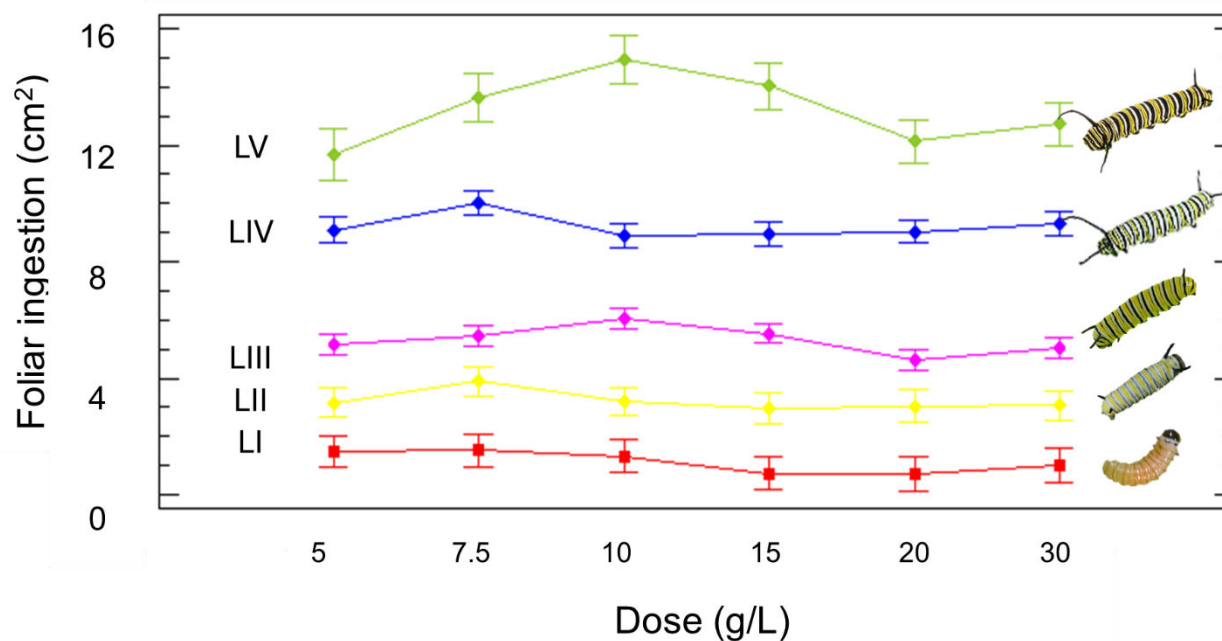


Figure 14. Foliar consumption observation in the insecticide-treated (IT) groups at various doses (5, 7.5, 10, 15, 20, and 30 g/L), depicting the foliar intake across each larval stage (LI, LII, LIII, LIV, and LV).



12.0. DISCUSIÓN GENERAL

Aunque se sabe en la actualidad el efecto de diferentes grupos de insecticidas como los neonicotinoides, piretroides y organofosforados en Estados Unidos y Canadá, el presente análisis, es la única evidencia del efecto en el desarrollo larval de la mariposa monarca, de diferentes dosis de FURADAN® ocupadas en campo, alrededor de los sitios de hibernación en México (Crone *et al.* 2019, Olaya- Arenas & Kaplan 2019, *Olaya- Arenas et al.* 2020, Krishnan *et al.* 2021, Ethier & Mitchell 2023, Kesler & Bunch 2023, Prouty *et al.* 2023).

Los resultados analizados de 540 larvas muestran una disminución de la sobrevivencia en los tratamientos con insecticida (IT) y sin insecticida (NI). En los tratamientos NI la disminución de la sobrevivencia fue de 0% a 11.11%, mientras en los tratamientos IT fue de 11.11% a 100% dependiendo la dosis y el estadio larval (Tabla y Fig. 5).

En los tratamientos IT las dosis 5 g/L, 7.5 g/L y 10 g/L tuvieron menor efecto en la sobrevivencia, disminuyendo del 11.11% a 22.23%, mientras las dosis 20 g/L y 30 g/L tuvieron mayor efecto, disminuyendo la sobrevivencia del 44% a 100% (Tabla y Fig. 5).

Las larvas LIII y LV fueron las más vulnerables, disminuyendo su sobrevivencia al 100% en la dosis 30 g/L (Fig. 5). Las larvas morían durante el proceso de ecdisis larval, sin poder pasar al siguiente estadio. Por ejemplo, las larvas LIII mostraban una actividad motora intermitente con espasmos discontinuos, lentos o acelerados, lo cual evitó el desarrollo de los segmentos de tórax y abdomen (Fig. 8A), de las antenas y la pérdida del exoesqueleto (Fig. 8B), mostrando una ecdisis larval detenida, muriendo antes de pasar al estadio LIV. Las larvas LV morían durante el proceso de ecdisis pupal sin poder formar la crisálida (Fig. 8C). Se observaron restos de exoesqueleto de crisálida en las larvas LV en la cápsula cefálica, segmentos de tórax (T1, T2 y T3) y abdomen (A9 y A10).

Esto se relaciona con algunos estudios que analizan el efecto de carbamatos en otros grupos de insectos como el estudio de Iturbide *et al.* (2020) en el cuál evaluaron el efecto de diferentes tipos de carbamato en abejas (*Apis mellifera*),

encontrando que con etil-4-bromofenilo y etil-4-clorofenilo hay una disminución del 27% de la sobrevivencia en dosis de 20 mg/mL mientras con 2-(1-Metiletoxi)-metil (propoxur) se disminuye el 100% de la sobrevivencia en dosis de 1mg/mL. Además, Weiden (1971), menciona algunos síntomas de intoxicación por insecticida carbamato en la mosca doméstica (*Musca domestica*), en DL₅₀ de 0.004 – 0.08 g/L, fueron hiperactividad motora, con aleteos acelerados hasta quedar paralizadas. Por otra parte, Krishnan *et al.* (2021) y Prouty *et al.* (2021), reportaron ecdisis pupal detenida en larvas LV de mariposa monarca, con insecticidas de neonicotinoides en DL₅₀ de 1.3 – 74 µg/g de hoja.

La disminución de la sobrevivencia, malformaciones morfológicas y síntomas de intoxicación en el presente estudio, en este estudio y los ya mencionados se relacionan con el mecanismo de acción colinérgico de los carbamatos, que inhibe la acetilcolinesterasa (AChE) evitando la degradación de acetilcolina (ACh), en el tejido neural (Yi *et al.* 2006). La inhibición AChE, provoca una acumulación en el espacio sináptico, alterando el sistema nervioso central (SNC), sobre estimulando el sistema colinérgico, que tiene efectos nicotínicos y muscarínicos, que van desde espasmos musculares, parálisis, taquicardia y muerte (Weiden 1971, Jiang *et al.* 2013).

Las larvas LI, LII y LIV en las dosis 20 g/L y 30 g/L, mantuvieron una sobrevivencia del 33.34% a 88.89% (Tabla 1.), esto podría atribuirse a la coevolución con su planta hospedera *Asclepias* sp. La defensa ante depredadores y parásitos a través de los metabolitos secundarios de la planta (glucósidos cardíacos), le brinda una resistencia metabólica cruzada, dada por modificaciones de la bomba Na⁺/K⁺ - que le permiten secuestrar y metabolizar metabolitos secundarios (Karageorgi *et al.* 2019, Krueger *et al.* 2022).

Los resultados de este experimento con los reportados en Estados Unidos y Canadá no son contrastantes o comparativos, debido a que las dosis de insecticidas ocupadas en los diferentes estudios se encuentran por debajo de las utilizadas en este análisis, además los grupos de insecticidas tienen diferente mecanismo de acción.

13.0. CONCLUSIÓN GENERAL

Los estadios larvales de la mariposa monarca (*Danaus plexippus*) presentaron diferencias en la sobrevivencia, crecimiento e ingesta ante las diferentes dosis FURADAN®.

Las dosis 5 g/L, 7.5 g/L y 10 g/L tuvieron menor efecto en la sobrevivencia disminuyendo del 11.11% a 22.23%, mientras las dosis 20 g/L y 30 g/L tuvieron mayor efecto, disminuyendo la sobrevivencia del 44% a 100%.

Los estadios larvarios más vulnerables son LIII y LV, disminuyendo la sobrevivencia entre un 50-100% en la dosis de 30 g/L, presentando entre un 65-85% malformaciones en segmentos, antenas y crisálida, además de actividad motora irregular.

Hubo efecto en el tamaño de la cápsula de la cabeza e ingesta foliar, aunque no tan marcado ni diferenciado en estadios larvales por la muerte de organismos, se pudo observar una disminución de tamaño y disminución en la ingesta foliar en el tratamiento con insecticida.

A partir de este estudio es posible implementar nuevas estrategias y políticas ambientales, encaminadas al uso y manejo de insecticidas carbamatos para incrementar la sobrevivencia en poblaciones de mariposa monarca (*Danaus plexippus*).

14.0. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Altizer, S.M. & Oberhauser, K.S. (1999). Effects of the Protozoan Parasite *Ophryocystis elektroscirrha* on the Fitness of Monarch Butterflies (*Danaus plexippus*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 74(1): 76–88. <https://doi.org/10.1006/jipa.1999.4853>.
2. Aluja, M. & Díaz- Fleischer, F. (2006). Foraging Behavior of *Anastrepha Ludens*, *A. obliqua* and *A. serpentina* in Response to Feces Extracts Containing Host Marking Pheromone. *Journal of Chemical Ecology*, 32(2): 367–389. <https://doi.org/10.1007/s10886-005-9007-6>.
3. Bargar, T.A., Hladik, M. L. & Daniels, J.C. (2020). Uptake and toxicity of clothianidin to monarch butterflies from milkweed consumption. *PeerJ*, 8, e8669- e8669.
4. Bernal- Pichardo, S.F. (2020). Conservación de la mariposa monarca (*Danaus plexippus*): Evaluación y análisis de la sobrevivencia en cultivos de *Asclepias sp.* en Valle de Bravo. Repositorio Institucional (RI). Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex). (Consultado: 13 de diciembre 2022, <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/109434?show=full>).
5. Bowler, D.E. & Benton, T.G. (2005). Causas y consecuencias de las estrategias de dispersión animal: relacionar el comportamiento individual con la dinámica espacial. *Reseñas biológicas de la Sociedad Filosófica de Cambridge*, 80 (2): 205–250.
6. Brenner, L. (2006). Áreas naturales protegidas y ecoturismo: el caso de la Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca México Relaciones. *Estudios de historia y sociedad*, 27(105): 237-265.
7. Brower, L.P., Fink, L.S., Kiphart, R.J., Pocius, V., Zubieta, R.R. & Ramírez, M.I. (2015). Effect of the 2010-2011 drought on the lipid content of monarchs migrating through Texas to overwintering sites in Mexico, in *Monarchs in a Changing World: Biology and Conservation of an Iconic Butterfly*. Eds KS Oberhauserer, KR Nail y S. Altizer. Ithaca, NY: Cornell University Press. 12 pp.

8. Calvert, W.H. & Brower, L.P. (1986). The location of monarch butterfly (*Danaus plexippus*) overwintering colonies in Mexico in relation to topography and climate. *Journal of the lepidopterists Society*, 40 (03): 164-167.
9. Casagrande R.A. & Dacey J.E. (2007). Monarch butterfly oviposition on swallow-worts (*Vincetoxicum* spp.). *Journal Environmental Entomology*, 36(3): 631–636.
10. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). (2014). Acuerdo que modifica al diverso que establece las mercancías cuya importación y exportación está sujeta a regulación por parte de las dependencias que integran la comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas. (Consultado: 12 de febrero 2024, https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5608827&fecha=26/12/2020#gsc.tab=0).
11. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. (CONABIO). (2008). Los santuarios: sitios de hibernación. (Consultado: 28 abril 2022, <http://www.soymonarca.mx/santuarios.html>).
12. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. (CONANP). (2010). Monitoreo de las colonias de hibernación de la mariposa monarca (*Danaus plexippus*) en la Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. (Consultado: 2 abril 2022, <http://www.conanp.gob.mx/acciones/fichas/mariposa/info/info.pdf>).
13. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. (CONANP). (2018). Programa de manejo: El Área de Protección de Recursos Naturales (APRN) Cuencas de los ríos Valle de Bravo, Malacatepec, Tilostoc y Temascaltepec. (Consultado: 05 abril 2022, Chrome extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://www.conanp.gob.mx/programademanejo/PMValleBravo.pdf).
14. Crone, E.E., Pelton, E.M., Brown, L.M., Thomas, C.C. & Schultz, C.B. (2019). Why are monarch butterfly populations declining in western North America? *Ecological Applications*, 29 (7): 1-18. <https://doi.org/10.1002/eap.1975>.

15. Cuellar J.L, Aguilera G.M., Legarreta M.R.R., Graziano J.V., Pinto V.M., Collado J.L. & Navarro L.A.A. (2005). Caracterización cuantitativa de la diapausa de palomilla de la manzana *Cydia pomonella* L. en Cuauhtémoc, Chihuahua, México. *Agrociencia*, 39(2): 221-229.
16. Cuevas, M., Rodríguez, X., Romero, C.A. & Romero, J.M. (2013). Reproducción de *Danaus plexippus* L. residente (Lepidoptera: Nymphalidae: Danainae) bajo condiciones de laboratorio. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 53: 299–309.
17. De Antoni, C. (2020). UNA REVISIÓN DE LOS ACUERDOS Y DISCREPANCIAS DE LA TEORÍA DE LAS CONTINGENCIAS Y LA TEORÍA DE LA ECOLOGÍA POBLACIONAL. *Ciencias administrativas*, 15: 75-86.
18. Díaz, F.J. (2018). Introducción a los estudios de cohorte en epidemiología y al análisis de supervivencia, 8(1): 43-53.
19. Ethier, D. M., & Mitchell, G. W. (2023). Effects of climate on fall migration phenology of monarch butterflies departing the northeastern breeding grounds in Canada. *Global Change Biology*, 29, 2122–2131. <https://doi.org/10.1111/gcb.16579>.
20. Estrada, A.F., Berrouet, M.C. & Giraldo, J.A. (2016). Toxicidad por neonicotinoides: revisión de tema y reporte de dos casos. *Med U.P.B*, 35(1): 41-46.
21. Fajardo, I., Rojas, A. & Ortega, S. (2011). El turismo alternativo como estrategia de conservación de la reserva de la biosfera de la mariposa monarca (2008-2010). *Journal Quivera*, 13 (2): 115- 133.
22. García, F. & Guzmán, A. (2014). Conservando la mariposa monarca (*Danaus plexippus*), conservando enemigos naturales de plagas. (Consultado: 12 mayo 2022, <http://www.scielo.org.mx/pdf/rcscfa/v20n3/v20n3a9.pdf>).
23. Garcilazo, J. (2011). La Teoría de la Ecología de Poblaciones considerada por las Teorías de la Adaptación. *Visión de futuro*, 15 (1): 1-20.

24. Gabel, B. & Thiery, D. (1996). Oviposition response of *Lobesia botrana* females to long chain free fatty acids and esters from its eggs. *Journal of Chemical Ecology*, 22: 161–171.
25. Gutiérrez- Moreno, R., Mota- Sanchez D., Blanco, A., Whalon, M., Terán- Santofimio H., Rodríguez- Maciel, C., DiFonzo, C. (2019). Field-Evolved Resistance of the Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to Synthetic Insecticides in Puerto Rico and Mexico. *Journal of Economic Entomology*, 112 (2): 792–802. <https://doi.org/10.1093/jee/toy372>.
26. Herman, W.S. 1981. Studies on the adult reproductive diapause of the monarch butterfly, *Danaus plexippus*. Department of Genetics and Cell Biology, University of Minnesota, 160 (1): 89-106.
27. Hermann, S.L., Blackledge, C., Haan, N.L. (2019). Predators of monarch butterfly eggs and neonate larvae are more diverse than previously recognised. *Sci Rep* 9 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50737-5>.
28. Honda, K. (1995). Chemical basis of differential oviposition by lepidopterous insects. *Archives of Insect Biochemistry & Physiology*, 30: 1–23.
29. Islas, A., Ramiro, M., González, A., Romero, M.E., Velasco, E. (2015). Riesgo del hábitat de la mariposa monarca (*Danaus plexippus*) ante escenarios de cambio climático. *Revista Xim hai*, 11 (5): 49-59.
30. Iturbe- Requena, S.L., Prado-Ochoa, M.G., Muñoz-Guzmán, M.A., Carrillo- Miranda, L., Velázquez-Sánchez, A.M., Ángeles, E., & Alba-Hurtado, F. (2020). Acute oral and contact toxicity of new ethyl-carbamates on the mortality and acetylcholinesterase activity of honey bee (*Apis mellifera*). *Chemosphere*, 242: 125293.
31. Jeng-Shong, C. & Kang-Chen, L. (1990). Toxicity of organophosphorus insecticides to diazinon-reverselyselected, pesticide-pressure-relaxed and field-resistant strains of bulb mite *Rhizoglyphus robini* (Acari: Acaridae). *Experimental and Applied Acarology*, 8(4): 243-252.
32. Jiang, Y., Swale, D., Carlier, P.R., Hartsel, J.A., M.M., Ekström, F., & Bloomquist, J.R. (2013). Evaluation of novel carbamate insecticides for

- neurotoxicity to non-target species. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 106(3): 156-161. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.03.006>.
33. Karageorgi, M., Groen, S.C., Sumbul, F., Pelaez, J.N., Verster, K. I., Aguilar, J.M. & Whiteman, N.K. (2019). Genome editing retraces the evolution of toxin resistance in the monarch butterfly. *Nature*, 574(7778): 409-412. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1610-8>.
 34. Kesler, K.K. & Bunch, R. (2023). Mapping the Migration: A Western Monarch Butterfly Site Suitability Study. *International Journal of Applied Geospatial Research (IJAGR)*, 14(1), 1-22. <http://doi.org/10.4018/IJAGR.316769>.
 35. Krebs, C.J. 1989. *Ecological methodology*. Harpercollins Publishers, New York. 654 pp.
 36. Krishnan, N. Zhang, Y., Aust, M.E., Hellmich, R.L., Coats, J.R. & Bradbury, S.P. (2021). Monarch Butterfly (*Danaus plexippus*) Life-Stage Risks from Foliar and Seed-Treatment Insecticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40(6): 1761-1777.
 37. Krueger, A.J., Rault, L.C., Robinson, E.A., Weissling, T.J., Vélez, A.M., & Anderson, T.D. (2022). Pyrethroid insecticide and milkweed cardenolide interactions on detoxification enzyme activity and expression in monarch caterpillars. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 187, 105173. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105173>.
 38. Lemoine, N. (2015). Climate Change May Alter Breeding Ground Distributions of Eastern Migratory Monarchs (*Danaus plexippus*) via Range Expansion of Asclepias Host Plants. *Journal PLoS ONE*, 10 (2): 2-22.
 39. López, Y., Tejero, J.D., Torres, A.N. & Luna, I. (2011). Flora del bosque mesófilo de montaña y vegetación adyacente en Avándaro, Valle de Bravo, estado de México, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (88) 35-53.
 40. Masters, A.R., Malcolm, S.B. & Brower L.P. (1988). Monarch Butterfly (*Danaus Plexippus*) Thermoregulatory Behavior and Adaptations for Overwintering in Mexico. *Journal Ecology*, 69 (2): 458- 467.

41. Mattila, H.R. & Otis, G.W. (2003). A comparison of the host preference of monarch butterflies (*Danaus plexippus*) for milkweed (*Asclepias syriaca*) over dog-strangler vine (*Vincetoxicum rossicum*). *Journal Entomology*, 107(3): 193–199.
42. Mdeni, N.L., Adeniji, A.O., Okoh A.I., Okoh, O.O. (2022). Analytical Evaluation of Carbamate and Organophosphate Pesticides in Human and Environmental Matrices: A Review. *Molecules*, 27(3): 618. <https://doi.org/10.3390/molecules27030618>.
43. Merino, L. & Hernández, M. (2004). Destrucción de instituciones comunitarias y deterioro de los bosques en la Reserva de la Biosfera Mariposa Monarca, Michoacán, México. *Revista Mexicana de Sociología*, 66(2): 261-309.
44. Mikery, O., Solórzano, E., Sánchez, D. (2013). Método de marcaje masivo de abejas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) para estudios ecoetológicos. *Acta Zoológica Mexicana*, 29(1): 248-251.
45. Nishida, R., Ohsugi, S. & Fukami, H. (1990). Oviposition deterrent of a Rutaceae-feeding swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*, from a non- host rutaceous plant, *Orixa japonica*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54: 1256–1270.
46. Oberhauser, K.S. (2006). El programa norteamericano de monitoreo de la mariposa monarca. *Ecología*, primera edición, México: 33-57.
47. Oberhauser, R. & Howard, E. (2009). Monarch Butterfly Monitoring in North America: Overview of Initiatives and Protocols, 339: 4-49.
48. Oberhauser, K.S., Manweiler, S, Lelich, R., Blank, M. (2009). Impacts of ULV resmethrin applications on non-target insects. *J. Am. Mosquito Contr.* 25, 83–93.
49. Olaya- Arenas, P., & Kaplan, I. (2019). Quantifying Pesticide Exposure Risk for Monarch Caterpillars on Milkweeds Bordering Agricultural Land. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7 (223): 1-25.
50. Olaya- Arenas, P., Scharf, M.E. & Kaplan, I. (2020a). Do pollinators prefer pesticide free plants? An experimental test with monarchs and milkweeds.

- Journal of Applied Ecology, 00: 1–12. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13711>.
51. Olaya-Arenas, P., Hauri, K. & Scharf, M.E. (2020b). Larval pesticide exposure impacts monarch butterfly performance. Sci Rep 10: 14490. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71211-7>.
52. Organisation for Economic Co-operation and Development. (OECD). (2014). The Assessment of Persistency and Bioaccumulation in the Pesticide Registration Frameworks within the OECD Region. (Consultado: 28 de marzo, 2024, <https://www.oecd.org/env/ehs/pesticides-biocides/43045062.pdf>).
53. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2019). Clasificación recomendada por la OMS de los plaguicidas por el peligro que presentan y directrices para la clasificación de 2019. (Consultado 09 de febrero 2024, <https://www.who.int/es/publications/i/item/9789240005662>).
54. Quispe, E.P., Carbajal, A.V., Gozzer, F., Moreno, B.R. (2014). Ciclo biológico y tabla de vida de *Aedes aegypti*, en laboratorio: Trujillo (Perú). Revista científica de estudiantes, 1(3): 91- 101.
55. Pecenka, J.R. & Lundgren, J.G. (2015). Non-target effects of clothianidin on monarch butterflies. The Science of Nature, 102 (19): 1-4.
56. Prouty, C., Barriga, P., Davis, A.K., Krischik, V., & Altizer, S. (2021). Host plant species mediates impact of neonicotinoid exposure to monarch butterflies. Insects, 12(11): 999. <https://doi.org/10.3390/insects12110999>.
57. Prouty, C., Bartlett, L.J., Krischik, V. & Altizer, S. (2023) Adult monarch butterflies show high tolerance to neonicotinoid insecticides. Ecological Entomology, 48(5), 531–543. Available from: <https://doi.org/10.1111/een.13245>.
58. Rabinovich, J.E. (1980). Introducción a la ecología de poblaciones animales. Continental, México. 313 pp.
59. Ramírez- Campos, M.A. (2018). The pesticides use in agricultura and their enviromental disorder. Rev. Enferm. Vanguard, 6(2): 40-47.

60. Ramos, B., Trigo, J.R. & Rodrigues, D. (2020). *Danaus* butterflies of the Americas do not perform leaf-scratching. *Arthropod-Plant Interactions*, 10: 1-9.
61. Rebas, P. (2005). Conceptos básicos del análisis de supervivencia. *Cirugía Española*, 78(4): 1-9.
62. Rendón, E., Martínez, F., Martínez, A. & Cruz, M. (2017). Superficie forestal ocupada por las colonias de hibernación de la mariposa monarca durante diciembre del 2023. Wildlife Fund-México. Zitácuaro, Michoacán. 4 pp.
63. Rendon- Salinas, E.A., Garcia- Serrano A.E., Valera- Bermejo, A., Quesada, M. (2023). The monarch butterfly in Mexico: a conservation model. *Curr Opin Insect Sci*, 60: 101112. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2023.101112>.
64. Roeske, C.N., Seiber, J.N., Brower, L.P., Moffitt, C.M. (1976). Milkweed cardenolides and their comparative processing by monarch butterflies (*Danaus plexippus* L.). *Recent Advances in Phytochemistry* 10: 93-167.
65. Romero, V.J. & Cortina H.A. (2007). Life tables of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) on three coffee accessions. *Revista Colombiana de Entomología*, 33(1): 10-16.
66. Ruelas, E., Santana, E., & Urbán, J. (2009). Conservación de especies migratorias y poblaciones transfronterizas. *Capital natural de México*, 2: 461-515.
67. Salgado, M.I.C., Urueña, T.R., Nápoles, A.R. & Nápoles, J.M.R. (2013). Reproducción de *Danaus plexippus* L. residente (Lepidoptera: Nymphalidae: Danainae) bajo condiciones de laboratorio. *Boletín de la SEA*, 53: 299-309.
68. Sans, F.X., Armengot, L., Bassa, M., Blanco-Moreno, J.M., Caballero-López, B., Chamorro, L., José María, L. (2013). La intensificación agrícola y la diversidad vegetal en los sistemas cerealistas de secano mediterráneos: implicaciones para la conservación. *Ecosistemas*, 22(1): 30-35.
69. Schoonhoven, L.M. (1990). Host-marking pheromones in lepidoptera, with special reference to two *Pieris* spp. *Journal of Chemical Ecology*, 16: 3043–3052.

70. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010. Protección ambiental, especies nativas de México de flora y fauna silvestres, categorías de riesgo y especificación por su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. (Consultado: 26 mayo 2022, https://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5173091).
71. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) & Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP). (2018). Plan de Acción para la Conservación de la Mariposa Monarca en México, 2018–2024, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales y Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, México (Consultado: 22 Mayo 2022, <https://www.conanp.gob.mx/documentos/PlandeAccionMonarca20182024.pdf>).
72. Stiling, P.D. (1992). Ecology: Theories and Applications. Prentice Hall. 539 pp.
73. The International Union for Conservation of Nature's (IUCN) Red List. (2022). Migratory monarch butterfly now Endangered - IUCN Red List. (Consultado: 12 octubre 2022, <https://www.iucnredlist.org/search?query=monarch%20butterfly&searchType=species>).
74. Urquhart, F.A. & Urquhart, N.R. (1976). The overwintering Site of the eastern population of the Monarch Butterfly (*Danaus plexippus*; Danaidae) in southern Mexico. Journal Of The Lepidopterists Society, 30(7): 1-6.
75. Urquhart, F.A. & Urquhart, N.R. (1978). Autumnal migration routes of the eastern population of the monarch butterfly (*D. plexippus* L.; Danaidae; Lepidoptera) in North America to the overwintering site in the Neovolcanic Plateau of Mexico. Can. J. Zool, 56: 1759-1764.
76. Urquhart, F.A. & Urquhart, N.R. (1979). Vernal Migration of the monarch butterfly (*Danaus plexippus*. Lepidoptera: Danaidae) in north America from

- the overwintering site in the neo-volcanic plateau of Mexico. *Journal The Canadian Entomologist*, 111(01): 15-18.
77. Van- Hook, T. & Zalucki, M.P. (1991). Oviposition by *Danaus plexippus* (Nymphalidae: Danainae) on *Asclepias viridis* in northern Florida. *Journal of the Lepidopterists Society*, 45 (3): 215-221.
 78. Velázquez, P. (2006). Diagnóstico y propuesta de zonificación ecoturística en el Paraje Piedra Herrada, Estado de México. *El Periplo Sustentable*, (11): 69-96.
 79. Wilcox, A.A.E., Flockhart, D.D.T, Newman, A.E.M., Norris, D.R. (2019). An evaluation of studies on the potencial threats contributing to the decline of eastern migratory North American monarch butterflies (*Danaus plexippus*). *Journal Front. Ecol. Evol.* 7(99): 1-12.
 80. Weiden, MH. (1971). Toxicity of carbamates to insects. *Bull World Health Organ.* 44(1-3): 203-13. PMID: 4938022; PMCID: PMC2428010.
 81. Yar- Barreros. (2019). Propuesta de protocolo de zoocría de la mariposa monarca (*Danaus plexippus*), para la implementación de un mariposario en Quito. Repositorio Institucional (RI). Universidad Central del Ecuador. (Consultado: 18 de Diciembre 2022, chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/75126/24587121.2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y 9).
 82. Yeargan, K.V. & Allard, C.M. (2005). Comparison of common milkweed and honeyvine milkweed (Asclepiadaceae) as host plants for monarch larvae (Lepidoptera: Nymphalidae). *Journal Kansas Entomol. Soc.*, 78 (3): 247–251.
 83. Yi, M.Q., Liu, H. X., Shi, X. Y., Liang, P., & Gao, X.W. (2006). Inhibitory effects of four carbamate insecticides on acetylcholinesterase of male and female *Carassius auratus* in vitro. *Comparative biochemistry and physiology Part C: Toxicology & pharmacology*, 143(1): 113-116. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.12.008>.

84. York, H. & Oberhauser, K. (2002). Effects of Duration and Timing of Heat Stress on Monarch Butterfly (*Danaus plexippus*) (Lepidoptera: Nymphalidae) Development. Journal of the Kansas Entomological Society, 75(4): 290-298. <http://www.jstor.org/stable/25481789>.
85. Zalucki, M.P. & Kitching, R.L. (1982). Temporal and spatial variation of mortality in field populations of *Danaus plexippus* L. and *D. chrysippus* L. Larvae (Lepidoptera: Nymphalidae). Oecology, 53 (2): 201- 207.
86. Zhou, Y. & Kot, M. (2011). Modelos de dispersión de crecimiento en tiempo discreto con rangos de especies cambiantes. Ecología teórica, 4 (1): 13-25.
87. Zipkin, E.F., Ries, L., Reeves, R., Regetz, J., Oberhauser, K.S. (2012). Tracking climate impacts on the migratory monarch butterfly. Global Change Biol, 18(10): 3039–3049.