

Inmunotaxonomía de las especies canarias del Género *Pimelia* (Col. Tenebrionidae)

por

P. OROMI y A. CHORDI

RESUMEN

Se realizaron comparaciones inmunológicas entre extractos de nueve formas del género *Pimelia* (Col. Tenebrionidae) de las Islas Canarias, referidas al antisuero obtenido con una de ellas, *P. laevigata* ssp. *validipes* Woll. Se utilizó para ello la técnica de inmunoelectroforesis. Los resultados obtenidos concordaron bastante con los criterios aportados en estudios sistemáticos anteriores, con excepción de *P. radula* ssp. *ascendens* Woll. y *P. radula* ssp. *granulata* Woll. de Tenerife, que mostraron poseer más diferencias recíprocas de las esperadas.

ABSTRACT

Immunotaxonomy of the Species of the Genus *Pimelia* from the Canary Islands (Col. Tenebrionidae).

Immunological comparisons were made, employing the immunoelectrophoresis technique, between extracts of nine forms of the genus *Pimelia* (Col., Tenebrionidae) from the Canary Islands, using the antiserum obtained from *P. laevigata* ssp. *validipes* Woll. as the reference. The experimental results agreed to a large extent with the exception that the reciprocal differences between *P. radula* ssp. *ascendens* Woll. and *P. radula* ssp. *granulata* Woll., both from Tenerife, exceeded those expected based solely on their supposed taxonomic affinity.

INTRODUCCION

La clasificación de los insectos ha venido realizándose, hasta hace unos años, utilizando pura y simplemente datos morfológicos y en ocasiones ecológicos. No obstante, últimamente se han desarrollado una se-

rie de técnicas taxonómicas basadas en métodos bioquímicos, genéticos, fisiológicos, etc. ..., que tienen tanta validez como puedan tener los obtenidos de la morfología del animal (MAYR, 1969).

Evidentemente se plantearía un gran problema si se pretendiera utilizar estos métodos, surgidos con el mismo desarrollo de la biología moderna, para determinar el encuadre taxonómico de un ejemplar determinado, y es entonces cuando prevalece la sistemática clásica para resolver la cuestión. Pero cuando se trata de hacer un estudio comparativo entre distintas poblaciones, especies, géneros, o la categoría taxonómica que sea, y establecer relaciones filogenéticas entre ellos, se hace posible y conveniente el empleo de las nuevas técnicas, porque en definitiva son unos datos más, ni mejores ni peores, sino simplemente asequibles con las técnicas modernas de investigación biológica.

En nuestro trabajo queremos aportar una contribución al conocimiento de las especies del género *Pimelia* (Col., *Tenebrionidae*) del Archipiélago Canario. Se escogieron dichos coleópteros por varias razones:

—La distribución peculiar de cada población en las Islas, resultado de un aislamiento geográfico o ecológico.

—El aliciente de poder dilucidar algo sobre las distintas opiniones, aportadas por diversos especialistas, acerca de la categoría sistemática de cada una de ellas.

—La facilidad con que se pueden obtener la mayoría de estos insectos, así como el considerable tamaño de los ejemplares.

El presente trabajo fue realizado basándose en el carácter antigénico de las proteínas propias de los individuos de cada población, dado que las diferencias que existan entre ellas serán el resultado, a su vez, de diferencias genéticas. La aplicación de métodos inmunológicos a la taxonomía fue empleada ya por NUTALL en 1904, y tenemos referencia de varios trabajos posteriores dedicados especialmente a coleópteros (LEONE 1947, BUTLER 1967, BASFORD, 1968, PETITPIERRE 1973).

MATERIAL Y METODOS

El estudio se realizó con las formas siguientes:

Pimelia (*Aphanaspis*) *granulicollis* Woll.

Pimelia (s. str.) *sparsa* Brull.

Pimelia (s. str.) *sparsa* ssp. *serrimargo* Woll.

Pimelia (s. str.) *canariensis* Brull.

Pimelia (s. str.) *laevigata* Brull.

Pimelia (s. str.) *laevigata* ssp. *costipennis* Woll.

Pimelia (s. str.) *laevigata* ssp. *validipes* Woll.

Pimelia (s. str.) *radula* ssp. *ascendens* Woll.

Pimelia (s. str.) *radula* ssp. *granulata* Woll.

Los ejemplares usados en este trabajo fueron colectados en el campo en su totalidad, no procediendo ninguno de ellos de cultivos en el laboratorio. Se mantuvieron un mínimo de 48 horas sin comer, para eliminar toda posible intromisión de proteínas del alimento, ya presente en el tubo digestivo al recolectarlos. A continuación se metieron en el congelador a -20°C , y allí mismo se almacenaron hasta su utilización.

El extracto de cada especie se obtuvo triturando los ejemplares en buffer fosfato 0,135 M ($\text{pH}=6,9$), en una proporción de tres volúmenes de solución tampón por cada volumen de coleópteros. El número de ejemplares empleado varía según las especies, dado que el volumen de los ejemplares de las mismas oscila desde 0,4 ml los de la más pequeña, hasta 1,2 ml. para los ejemplares de las mayores.

Una vez bien triturado, se centrifugó el extracto a 4.000 r. p. m. para eliminar las partículas del caparazón quitinoso y demás partes no homogeneizadas, se recogió el sobrenadante y se guardó en el congelador a -20°C .

Se inmunizaron dos conejos contra *P. laevigata* ssp. *validipes* Woll., inoculándoles el homogeneizado de dicha forma y coadyuvante de Freund mezclados a partes iguales. La pauta de inoculación seguida fue de inyecciones de 0,8 ml. tres veces por semana, hasta un total de doce, un descanso de diez días, y de nuevo tres inoculaciones semanales de 1,6 ml., hasta conseguir que el título de anticuerpos fuera suficientemente grande. Se hizo de esta manera para obtener respuesta secundaria del conejo después del descanso, consiguiéndose así mayor concentración de anticuerpos (TORMO, 1967). Se standarizó dicho título de tal modo que el antisuero, diluido a 1/32 en suero fisiológico, diera precipitación visible enfrentándolo al antígeno homólogo. Para ello se utilizó la técnica de inmunodifusión en gel de Ouchterlony, colocando en el pocillo central el antígeno, y en los seis pocillos circundantes el antisuero en concentraciones de 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 y 1/32, respectivamente.

El antígeno empleado para inmunizar fue el obtenido según lo descrito anteriormente, pero el utilizado en las pruebas de inmunodifusión e inmunolectroforesis fue previamente filtrado, para evitar la difusión de impurezas por el gel de agar, que impediría ver claramente las bandas de precipitación.

Una vez obtenido el antisuero, se hicieron inmunolectroforesis en gel de agar. En ellas se realizaron enfrentamientos directos del antisuero con el antígeno homólogo, y con los complejos antigénicos de las demás especies, así como enfrentamientos indirectos mediante absorciones. Dichas absorciones se efectuaron haciendo reaccionar, en tubos de ensayo, a cada antígeno con el antisuero obtenido, centrifugando a continuación y colocando el sobrenadante en el canal de la IEF. (*) Las proporciones de antígeno empleadas en las absorciones fueron de tres partes del mismo por cada cinco partes de antisuero. Dicho antígeno estaba concentrado al doble en todas las IEF realizadas.

En algunas experiencias se empleó ácido tánico para aumentar el contraste de las bandas de precipitación, sumergiendo las placas de gel de agar en una solución al 1% de dicho ácido durante 20 minutos.

RESULTADOS

Las recolecciones fueron realizadas a lo largo de varias excursiones. Las citas de lugar y fecha para cada forma son las siguientes:

P. laevigata ssp. *laevigata* Brull.—La Palma: Bajamar, 14-V-73 (leg. Fernández) 7exx.; Garafía, 10-VII-73 (leg. Barquín) 13exx.; Bajamar, 1-74 (leg. Fernández) 22 exx.

P. laevigata ssp. *costipennis* Woll.—Hiero: El Sabinal, 2-I-73, 52 exx.; Guarazoca, 3-I-73, 12 exx.

P. laevigata ssp. *validipes* Woll.—Gomera: Laguna Grande, 20-IV-73, 60 exx.; Laguna Grande, 26-V-73, 42 exx.; San Sebastián, 28-V-73, 12 exx.

P. laevigata ssp. *ascendens* Woll.—Tenerife: Izaña, 3-II-73, 32 exx.; Izaña, 5-VII-73, 24 exx.

P. radula *granulata* Woll.—Tenerife: Santa Cruz, 25-X-73, 45 exx.; Los Rodeos, 1-II-74, 8exx.

P. canariensis Brull.—Tenerife: El Médano, 10-IV-73, 5 exx.; Candelaria, 5-V-73 (leg. Fernández) 2 exx.; El Médano, 3-II-74, 13 exx.

P. sparsa ssp. *serrimargo* Woll.—Gran Canaria: El Confital, 14-XI-72, 11 exx.; El Confital, 6-X-73, 13 exx.; El Confital, 9-II-74, 18 exx.

P. sparsa Brull. ssp. *sparsa* (s. str.)—Gran Canaria: Cruz de Tejeda, 13-XI-72, 10 exx.; Cumbres de G. C., 10-V-73, (leg. Barquín) 13 exx.; Cruz de Tejeda, 9-XI-73, 18 exx.

P. granulicollis Woll.—Gran Canaria: Las Palmas, 7-X-73, 28 exx.; Maspalomas, 2-XI-73, 34 exx.

(*) Inmunolectroforesis.

No se encontraron ejemplares de *P. sparsa* ssp. *albohumeralis* Lindb. de Gran Canaria, ni *P. radula* Sol. ssp. *radula* (s. str.) de Tenerife, seguramente por la dificultad que entraña conseguirlas últimamente, sobre todo por el cambio radical que han sufrido sus hábitats respectivos. *P. lularia* Brull., de Lanzarote y Fuerteventura, no se encontraron en dos viajes realizados a dichas islas, debido a que se hicieron en época seca, circunstancia muy importante para la fauna entomológica de las Canarias Orientales.

De los dos conejos inmunizados con *P. laevigata* ssp. *validipes* Woll., uno alcanzó el título de anticuerpos suficiente al cabo de 25 inoculaciones (69 días), mientras que del otro no fue utilizado el suero por decaer el título de anticuerpos en los últimos días de la pauta de inoculación.

Enfrentando el antisuero obtenido con su antígeno homólogo, se obtuvieron un total de 17 bandas de precipitación, con movibilidades relativas a la albúmina humana de —16 hasta 184, observándose una distribución bastante uniforme de dichas proteínas dentro del espectro (Fig. 2). Para ello hubo que hacer distintas IEF con los pocillos en diferentes posiciones, ya que dicho espectro era más amplio que la propia longitud de las placas que portaban el gel de agar.

Debido al elevado número de bandas de precipitación, las IEF realizadas con antígenos heterólogos resultaron algo confusas, optándose por recurrir a la técnica de absorciones, siempre más precisa de interpretación que la de reacciones directas.

En las IEF con suero absorbido con *P. laevigata* ssp. *laevigata* Brull., se observó que aparecían dos bandas de precipitación, lo cual se interpreta como que este coleóptero posee todas las proteínas antigénicas de *P. laevigata* ssp. *validipes* Woll, excepto dos, las de movibilidades 36 y 116 (Fig. 3). Verificando esta misma experiencia de absorción con las demás especies, (Fig. 4), los resultados nos indican que a *P. laevigata* ssp. *costipennis* Woll. le faltan 3 antígenos de la subespecie de la Gomera, a *P. radula* ssp. *ascendens* Woll. 4, a *P. radula* ssp. *granulata* Woll. 5, a *P. granulicollis* Woll. 7, y a *P. canariensis* Brull. 5.

En la Tabla I se tabulan los resultados anteriores, especificando la presencia o ausencia, mediante un signo + o un signo —, de cada una de las bandas en el total de las formas estudiadas.

Se determinaron los porcentajes de identidad antigénica de cada una de las formas respecto a las demás. Se consideró identidad de dos de ellas respecto a una proteína la presencia de la misma en ambas formas;

e identidad total entre dos especies el número de coincidencias positivas entre ellas. El valor en cada caso viene dado por la fórmula:

$$C = \frac{I}{V} \times 100$$

en la que C es la correspondencia inmunológica entre dos formas dadas; I la identidad total absoluta entre las mismas; y V el número de bandas totales presentes en ambas o en una sola. En la Tabla II quedan especificados estos porcentajes de identidad inmunológica.

DISCUSION

El presente trabajo se inició por dos vías distintas, una utilizando hemolinfa como complejo antigénico, y otra con el extracto total de los coleópteros. Se inmunizaron sendos conejos, y se realizaron tests correspondientes, observándose que los resultados eran más satisfactorios con el extracto total. El estudio iniciado con hemolinfa presentaba mayor confusión de bandas, y las absorciones eliminaban casi por completo la actividad inmunológica del antisuero.

Las formas de las Islas Occidentales, consideradas por LINDBERG (1947) como especies distintas, pero tan sólo como subespecies por ESPAÑOL (1952), demuestran tener una afinidad marcada, pues sólo apareció una diferencia de una banda entre *P. laevigata* ssp. *costipensis* Woll y *P. laevigata* ssp. *laevigata* Brull. No obstante no concuerdan los resultados exactamente con las opiniones de dichos autores, que siempre consideraron que la primera era más próxima a *P. laevigata* ssp. *validipes* Woll. que a la segunda. En términos generales se comprobó, de todos modos, la mayor afinidad entre estas tres formas que cada una de ellas con las demás del Archipiélago. Sobre todo teniendo en cuenta que cualquiera de las dos presenta mayor porcentaje de identidad con *P. canariensis* Brull., *P. sparsa* Brull. o *P. laevigata* Brull. con la otra.

También se reafirma la marcada afinidad entre *P. sparsa* Brull y *P. sparsa* ssp. *serrimargo* Woll., consideradas por los mencionados autores como especies muy próximas, o como subespecies de una misma especie. No se consiguieron ejemplares de *P. sparsa* ssp. *albohumeralis* Lindb., por lo que no se puede dilucidar nada sobre su mayor o menor parentesco con las formas anteriores.

P. canariensis Brull. de Tenerife, marcadamente distinta a *P. laevigata* ssp. *validipes* Woll., dio un resultado satisfactorio en relación a los datos morfológicos ya estudiados, y *P. granulicollis* Woll., la más diferen-

ciada inmunológicamente de las demás, demostró coincidir también con los estudios ya realizados (UYTTENBOOGAART 1937; LINDBERG 1947; ESPAÑOL 1961) en los cuales se encuadra a dicho coleóptero en un subgénero distinto (*Aphanaspis*) al que pertenecen todas las demás especies canarias (*Pimelia*).

Unicamente aparece controversia respecto a las formas tinerfeñas del grupo de *P. radula* Sol. La forma típica no se consiguió, por lo que no cabe discusión, pero sí se capturaron ejemplares abundantes de las otras dos subespecies de Tenerife, las cuales, aunque cuantitativamente distanciadas por un igual, serológicamente hablando, de *P. laevigata* ssp. *validipes* Woll., difieren sin embargo entre sí (76,4% de correlación) más de lo que correspondería según la sistemática clásica.

No se puede, por el momento, adoptar una postura firme respecto a las categorías taxonómicas de cada forma, ya que hasta ahora los datos obtenidos son referidos a un solo antisuero. Debe tenerse en cuenta, por lo tanto, que los resultados de este trabajo no son forzosamente significativos por sí solos, sino solamente un primer paso de un estudio más completo a realizar con antisueros de más especies.

La nomenclatura empleada para los ejemplares de este estudio se ha basado en la publicación monográfica sobre las *Pimelia* de las Islas Canarias del Sr. ESPAÑOL (1961).

AGRADECIMIENTOS

Debemos agradecer a don José M. Fernández y a don Eduardo Barquín su colaboración en la recolección y determinación de parte de los ejemplares empleados en este trabajo, así como a todos aquellos que, directa o indirectamente, han contribuido a la consecución del mismo.

(Recibido el 21 de marzo de 1974).

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Fig. 2.—I) Interpretación esquemática del patrón inmunológico obtenido de IEF entre el antisuero anti-*P. laevigata validipes* (anti V) y su antígeno homólogo (V).

II) Reproducción fotográfica de una IEF entre anti V y V en la disposición habitual de los pocillos. Obsérvese la pérdida de proteínas rápidas por el polo + (lado derecho).

III) Reproducción fotográfica de una IEF entre antiV y V, con los pocillos desplazados para detectar las bandas pertenecientes a las proteínas más rápidas.

Fig. 3.—IEF con antisuero antiV sin absorber (esquema I) en comparación con una IEF realizada con antisuero absorbido con *P. laevigata* (antiV + P) (esquema III). El esquema II muestra el control de absorción de antiV + P frente al antígeno utilizado para absorber (P), que dió negativo.

Fig. 4.—IEF realizadas con antisueros absorbidos con las distintas formas de *Pimelia* estudiadas. H: *P. laevigata costipennis* Woll.; P: *P. laevigata laevigata* Brull.; R: *P. radula granulata* Woll.; A: *P. radula ascendens* Woll.; S: *P. sparsa sparsa* Brull.; SE: *P. sparsa serrimargo* Woll.; C: *canariensis* Brull.; G: *P. granulicollis* Woll.; V: *P. laevigata validipes* Woll.

Tabla I.—Bandas de precipitación halladas en los enfrentamientos del antisuero con cada una de las formas estudiadas. Dichas bandas se expresan por su movilidad electroforética relativa a la albúmina. Los antígenos de las distintas *Pimelia* están expresados por las mismas iniciales que en la fig. 4.

Tabla II.—Matriz de porcentajes de identidad inmunológica (referidos al antisuero anti-ssp. *validipes*), entre las diversas formas canarias de *Pimelia* estudiadas.

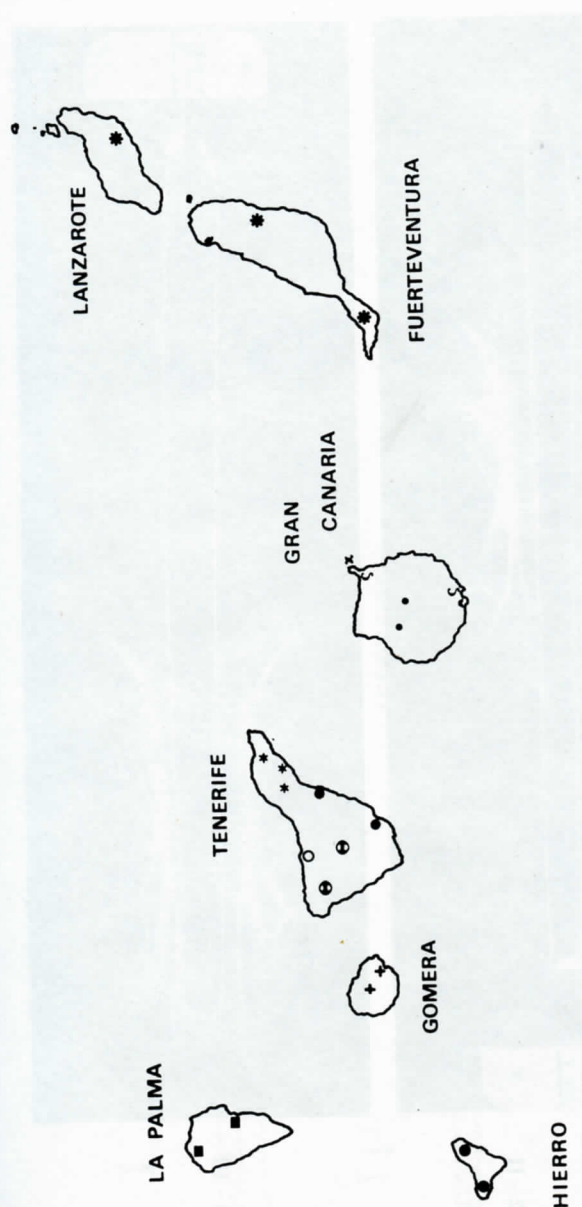


Fig. 1.- Distribución del género *Pimelia* en las Islas Canarias.

- | | | |
|---|------------------------------------|---|
| ■ <i>P. laevigata laevigata</i> BRULL. | ○ <i>P. radula radula</i> SOL. | • <i>P. sparsa sparsa</i> BRULL. |
| + <i>P. laevigata validipes</i> WOLL. | ⊕ <i>P. radula ascendens</i> WOLL. | ^ <i>P. sparsa albohumeralis</i> LINDB. |
| ● <i>P. laevigata costipennis</i> WOLL. | * <i>P. radula granulata</i> WOLL. | z <i>P. sparsa serrimargo</i> WOLL. |
| ● <i>P. canariensis</i> BRULL. | ς <i>P. granulicollis</i> WOLL. | * <i>P. lutaria</i> BRULL. |

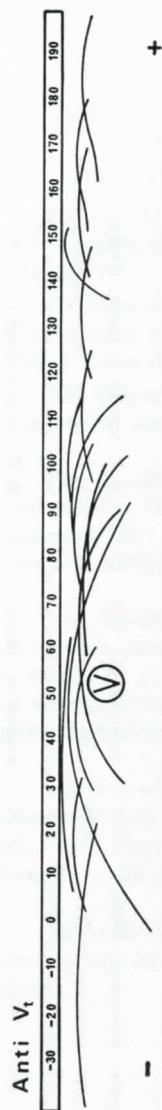


Fig. 2. - I

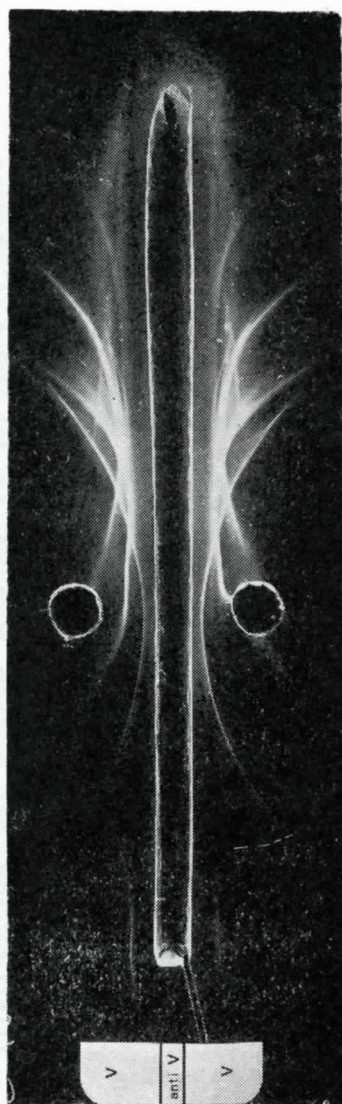


Fig. 2. - II

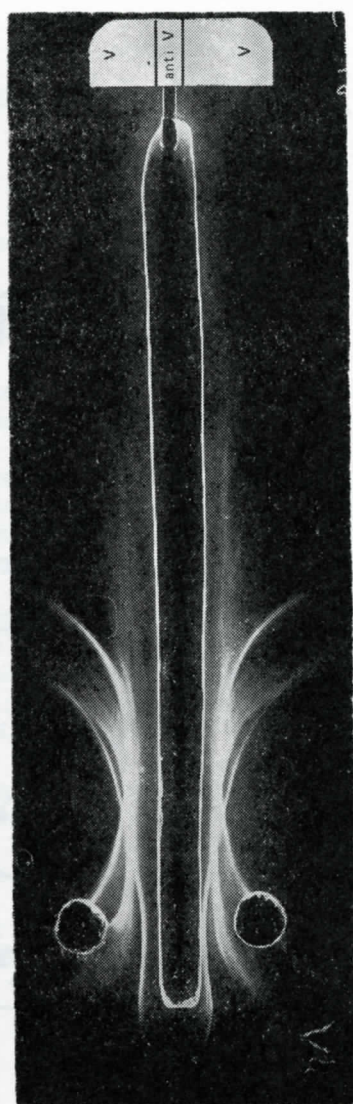


Fig. 2. - III

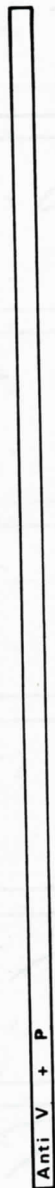
I

REACCION DIRECTA



II

ABSORCION



+

III

CONTROL

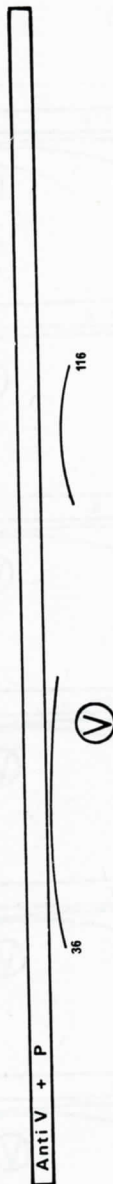


Fig. 3

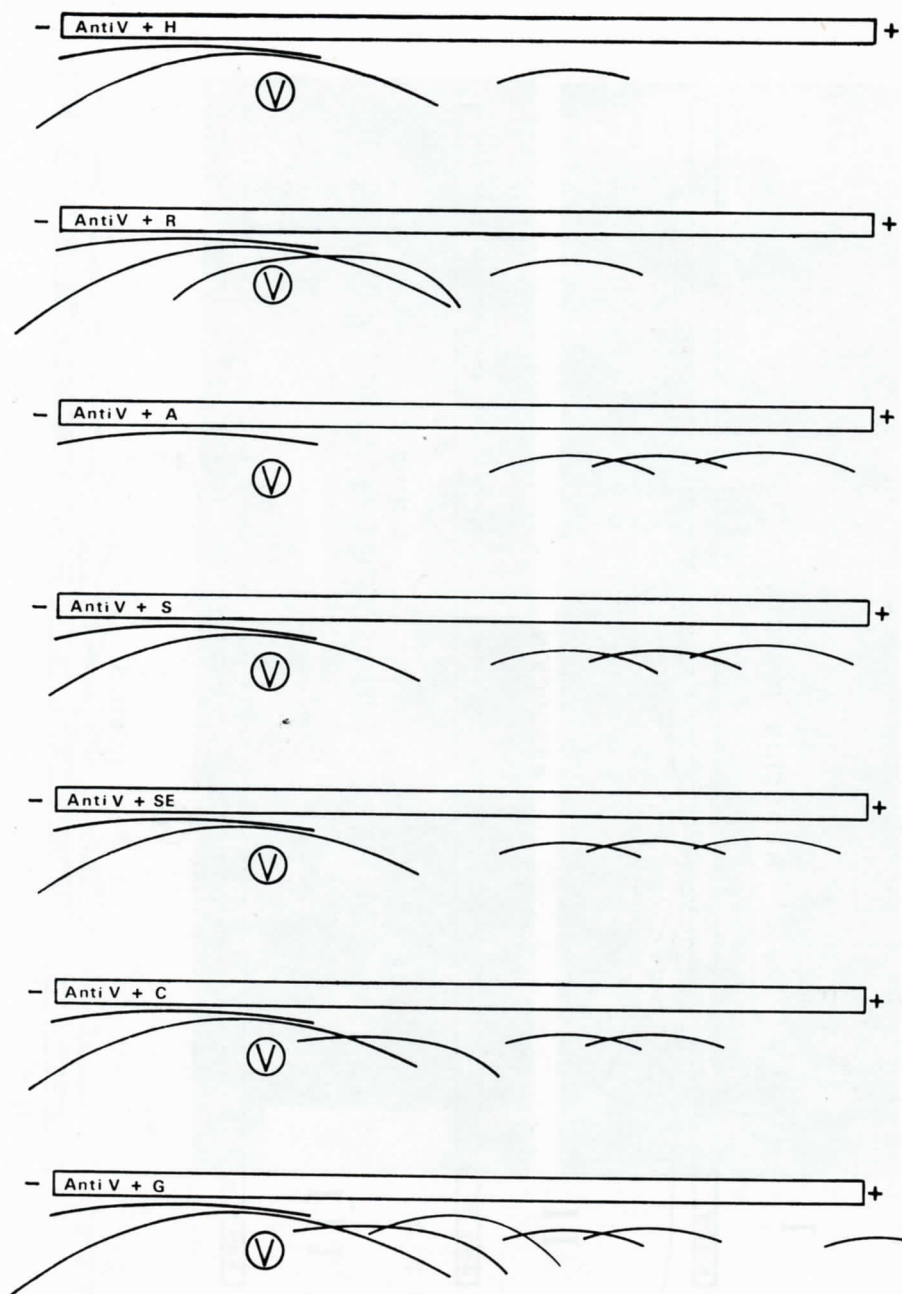


Fig. 4

mov.
electr.

	V	P	H	A	R	S	SE	G	C
-16	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+	+	+	+
36	+	-	-	-	-	-	-	-	-
44	+	+	+	+	+	+	+	+	+
48	+	+	-	+	-	-	-	-	-
65	+	+	+	+	-	+	+	+	+
79	+	+	+	+	+	+	+	-	-
83	+	+	+	+	+	+	+	+	+
86	+	+	+	+	+	+	+	+	+
91	+	+	+	+	+	+	+	-	+
100	+	+	+	+	+	+	+	+	+
116	+	-	-	-	-	-	-	-	-
133	+	+	+	-	+	-	-	-	-
148	+	+	+	+	+	+	+	+	+
156	+	+	+	-	+	-	-	+	+
169	+	+	+	+	+	+	+	+	+
184	+	+	+	+	+	+	+	-	+

Tabla I

V	100								
P	88.2	100							
H	82.3	93.3	100						
A	76.4	86.6	80.0	100					
R	76.4	86.6	92.8	73.3	100				
S	70.5	80.0	85.7	92.3	78.5	100			
SE	70.5	80.0	85.7	92.3	78.5	100	100		
C	70.5	80.0	85.7	78.5	78.5	84.6	84.6	100	
G	58.8	66.6	71.4	64.2	64.2	69.2	69.2	83.3	100
	V	P	H	A	R	S	SE	C	G

Tabla II

BIBLIOGRAFIA

- BASFORD N. L., JOHN E. BUTLER, C. A. LEONE and F. J. ROHLF.—1968. Immunologic comparisons of selected Coleoptera with analyses of relationships using numerical taxonomic methods. *Syst. Zool.* 17: 388-406.
- BUTLER J. E. and C. A. LEONE.—Immunotaxonomic investigations of the Coleoptera. *Syst. Zool.* 16: 56-63.
- DOMERGUE C. A., J. RICHAU et E. R. BRYGOO. 1970.—Aplication des techniques sérologiques a l'étude de la systématique des serpents de Madagascar. *C. R. Soc. Biol.* 164: 2690-2694.
- ESPAÑOL F. 1961.—Las *Pimelia* de las Islas Canarias. *Anuario de Estudios Atlánticos* 7: 487-498.
- FERNÁNDEZ J. M. 1955.—Entomología; Evolución de la fauna Canariense. *Inst. Est. Can. La Laguna. Tenerife.*
- GERBER J. D. and C. A. LEONE. 1971.—Immunologic comparisons of certain Phyllostomatid bats. *Syst. Zool.* 20: 160-166.
- LEONE C. A. 1947.—Systematic serology among certain insect species. *Biol. Bull.* 93: 64-71.
- LEONE C. A. 1947.—A serological study of some Orthoptera. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* 40: 417-433.
- LEONE C. A. 1964.—*Taxonomic Biochemistry and Serology*. The Ronald Press Company .New York.
- LINDBERG H. 1962.—Coleoptera Insularum Canariensium. III.—Tenebrionidae. *Soc. Scient .Fenn. Commentationes Biologicae* XXV. 1.
- MAYR, E. 1969.—*Principles of Systematic Zoology*. McGraw Hill Books Company. New York.
- OUCHTERLONY O. 1962.—Diffusion-in-gel method for immunological analysis. *Progr. in Allergy*. 6: 330-54.
- PAULY L. K. 1955.—Serological relationships among orthopteroid insects as determined by their whole «blood». *New York Entomol. Soc.* 63: 83-93.
- PETITPIERRE, E. 1973.—Estudios sistemáticos, citogenéticos y evolutivos sobre el género *Timarcha* (Col., Chrysomelidae) *Tesis Doctoral*. Barcelona.

SÉNAC H. 1892.—Voyage de M. Ch. Allaud aux Iles Canaries. Note sur les *Pimelia* des Iles Canaries. *Ann. Soc. Ent. Fr.* 103-108.

TORMO J. 1967.—*Veterinary Record*. 14, 392.

UYTTENBOOGAART D. L. 1937.—Contributions to the knowledge of the fauna of the Canary Islands, XIX. *Tijdsch. voor Ent.* DI. LXXX pag. ,89.

WOLLASTON T. V. 1864.—*Catalogue of Canarian Coleoptera*. London. 471-480.