



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**APARATO REPRODUCTOR DE HEMBRAS DE
Phyllophaga vetula (Coleoptera: Melolonthidae) Y
PERFIL QUÍMICO DE EXTRACTOS DE LA CÁMARA
GENITAL Y OTRAS ESTRUCTURAS CORPORALES**

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO (A) EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

Alice Nelly Fernández Campos

DIRECTOR: Angel Alonso Romero López

DICIEMBRE 2020



CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Coleópteros Melolonthidae	3
2.1.1 Generalidades	3
2.1.2 Descripción morfológica corporal de hembras y machos.....	3
2.1.3 Descripción del abdomen.....	4
2.1.4 Descripción morfológica del aparato reproductor de hembras.....	5
2.2 Ecología química de integrantes de Melolonthidae	7
2.2.1 Comunicación química sexual.....	7
2.2.2 Relación entre la anatomía del aparato reproductor y otras estructuras corporales de Melolonthidae con la comunicación química sexual	8
2.2.3 Extracción e identificación de feromonas sexuales	10
2.3 Phyllophaga	12
2.3.1 Taxonomía.....	13
2.3.2 Anatomía del aparato reproductor	14
2.3.3 Comunicación química sexual.....	16
2.4 Phyllophaga vetula	19
2.4.1 Generalidades	19
2.4.2 Comportamiento precopulatorio	20
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	23
5.1 General.....	23
5.2 Particulares	23
6. MATERIAL Y MÉTODOS	23
6.1 Obtención del material biológico	23
6.3 Obtención del perfil químico de extractos de la cámara genital, glándulas accesorias y abdomen	24
6.3.1 Extracción directa con disolvente.....	24

7. RESULTADOS	26
7.1 Estudio morfológico del aparato reproductor de hembras	26
7.1.1 Anatomía del aparato reproductor completo.....	26
7.2 Perfil químico de extractos corporales	28
7.2.1 Cámara genital.....	28
7.2.2 Glándulas accesorias tipo I.....	29
7.2.3 Glándulas accesorias tipo II.....	30
7.2.4 Abdomen.....	31
8. DISCUSIÓN	33
8.1 Anatomía del aparato reproductor	33
8.2 Perfil químico	34
8.2.1 Cámara genital.....	34
8.2.2 Glándulas accesorias tipo I.....	35
8.2.3 Glándulas accesorias tipo II.....	36
8.2.4 Abdomen.....	36
9. CONCLUSIONES	39
11. LITERATURA CITADA	39
12. ANEXO	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del abdomen.....	4
Figura 2. Esquemas del aparato reproductor de hembras de Melolonthidae	6
Figura 3. Representación de la exposición de la cámara genital	10
Figura 4. Feromonas sexuales identificadas para la familia Melolonthidae	12
Figura 5. Ilustración del aparato reproductor de hembras de <i>Phyllophaga</i>	15
Figura 6. Esquema de las glándulas accesorias de varias especies de <i>Phyllophaga</i>	16
Figura 7. Feromonas sexuales identificadas en el género <i>Phyllophaga</i>	19
Figura 8. Llamado sexual de una hembra de <i>Phyllophaga vetula</i>	21
Figura 9. Esquema del aparato reproductor de <i>Phyllophaga vetula</i>	27

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Compuestos químicos de la cámara genital	28
Cuadro 2. Compuestos químicos de las glándulas accesorias tipo I.....	29
Cuadro 3. Compuestos químicos de las glándulas accesorias tipo II.....	30
Cuadro 4. Compuestos químicos del abdomen	31
Cuadro 5. Comparación de compuestos identificados	32

RESUMEN

Los coleópteros Melolonthidae son un grupo de insectos cuyos integrantes son considerados de importancia ecológica y agrícola. La descripción anatómica del aparato reproductor de hembras de la familia ha servido como herramienta para la localización de potenciales sitios productores de infoquímicos, específicamente feromonas sexuales, además de que la información generada sobre su estructura y función brinda un respaldo fundamental para una mayor comprensión del comportamiento y comunicación química del insecto bajo estudio. En este contexto, *Phyllophaga vetula* Horn es una especie catalogada dentro de los “complejos gallina ciega” y para la cual sólo se cuenta con datos sobre su ecología química en términos del comportamiento precopulatorio y el “llamado sexual”. Con la finalidad de complementar su esquema de comunicación química sexual, se describió el aparato reproductor de hembras de esta especie y se analizaron, por cromatografía de gases y espectrometría de masas, muestras de cámara genital, glándulas accesorias (I y II) y abdomen. Se observó que el aparato reproductor de las hembras está formado por dos ovarios, dos oviductos laterales, un oviducto común, una espermateca y su glándula, una *bursa copulatrix*, dos pares de glándulas accesorias y una cámara genital. El aparato reproductor de las hembras de esta especie cumple con el modelo general observado en otros géneros de Melolonthidae, aunque mantiene mayor similitud con el de las hembras del género *Phyllophaga*. Se propone que la cámara genital y glándulas accesorias están relacionadas con el proceso de liberación de feromonas sexuales. En el caso del perfil químico obtenido de los extractos de las diferentes estructuras corporales, se detectaron alcanos, derivados de alcanos, ácidos carboxílicos, derivados de colesterol, cetonas y alcoholes. Se sugiere la participación de algunos de estos componentes químicos en la producción de la feromona sexual de las hembras de *P. vetula*.

1. INTRODUCCIÓN

El estudio de los infoquímicos involucrados en las interacciones ecológicas intra e interespecíficas de los organismos resulta de vital importancia para comprender el comportamiento y fisiología de los organismos (Dicke y Sabelis, 1988). En este sentido, en décadas recientes se han llevado a cabo estudios sobre estas sustancias químicas producidas y captadas por coleópteros Melolonthidae (Romero-López, 2016), un grupo de insectos cuyos integrantes son considerados de importancia ecológica y agrícola (Morón *et al.*, 2014). Bajo esta línea de trabajo, se pretende el esclarecimiento de los esquemas de comunicación química de especies distribuidas en México, en particular de aquellas en las cuales están involucrados atrayentes y feromonas sexuales. En este contexto, la descripción anatómica del aparato reproductor de hembras de la familia ha servido como herramienta para la localización de potenciales sitios productores de estas sustancias químicas y para la obtención del perfil químico de las feromonas. Además, la información generada sobre la estructura y función de estos sitios y las sustancias que se producen en ellos brinda un respaldo fundamental para una mayor comprensión del comportamiento y comunicación química del insecto bajo estudio.

En la presente propuesta, se consideró a *Phyllophaga vetula* Horn como modelo de estudio, con la finalidad de obtener información sobre los mecanismos de emisión de sus feromonas sexuales. Se proponen los sitios de producción de estos infoquímicos a través de la revisión anatómica de la cámara genital y las glándulas accesorias de hembras de esta especie, además de que por primera vez se identificaron los posibles componentes de la feromona sexual. Por tratarse de una especie catalogada dentro de los “complejos gallina ciega” (Morón, 1986) y para la cual sólo se cuenta con datos sobre su ecología química en términos del comportamiento precopulatorio y el “llamado sexual” (Romero-López *et al.*, 2007), se espera obtener información que permita complementar su esquema de comunicación química sexual. Asimismo, debido a que el estudio del aparato reproductor brinda información propia de cada especie, se propone que los resultados de este trabajo permitan dilucidar aspectos relacionados con la clasificación y estrategias del manejo y la conservación de *P. vetula*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Coleópteros Melolonthidae

2.1.1 Generalidades

En la clasificación más reciente se agrupa a Melolonthidae dentro de Coleoptera Scarabaeoidea. La superfamilia Scarabaeoidea agrupa a las familias Scarabaeidae, Cetoniidae, Luicanidae, Passalidae, Trogidae y Melolonthidae. A su vez, la familia Melolonthidae está conformada por seis subfamilias: Melolonthinae, Rutelinae, Dynastinae, Hopliinae, Sericinae y Euchirinae (Cherman y Morón, 2014). Las subfamilias presentes en México son Melolonthinae, Rutelinae y Dynastinae, principalmente distribuidas en Chiapas, Durango, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Oaxaca, Puebla y Veracruz. Los géneros más abundantes del país pertenecen a la subfamilia Melolonthinae, siendo *Phyllophaga* y *Diplotaxis* los más representativos (Morón *et al.*, 2014). Estos coleópteros se encuentran presentes en todos los hábitats continentales, excepto en ambientes con hielos perennes. Los adultos se alimentan de hojas, flores, tallos, frutos, polen, néctar, savia, corteza, etc., mientras que las larvas consumen raíces, humus o xilema (Morón *et al.*, 2014). Debido a sus hábitos alimentarios, algunas especies son consideradas plagas, ya que generan efectos negativos en agricultura, horticultura y silvicultura. El ciclo de vida de estos coleópteros es usualmente anual o bianual, tienen un desarrollo holometábolo, presentando las etapas de huevo, larva (con tres estadios larvales), pupa y adulto (Morón *et al.*, 2014).

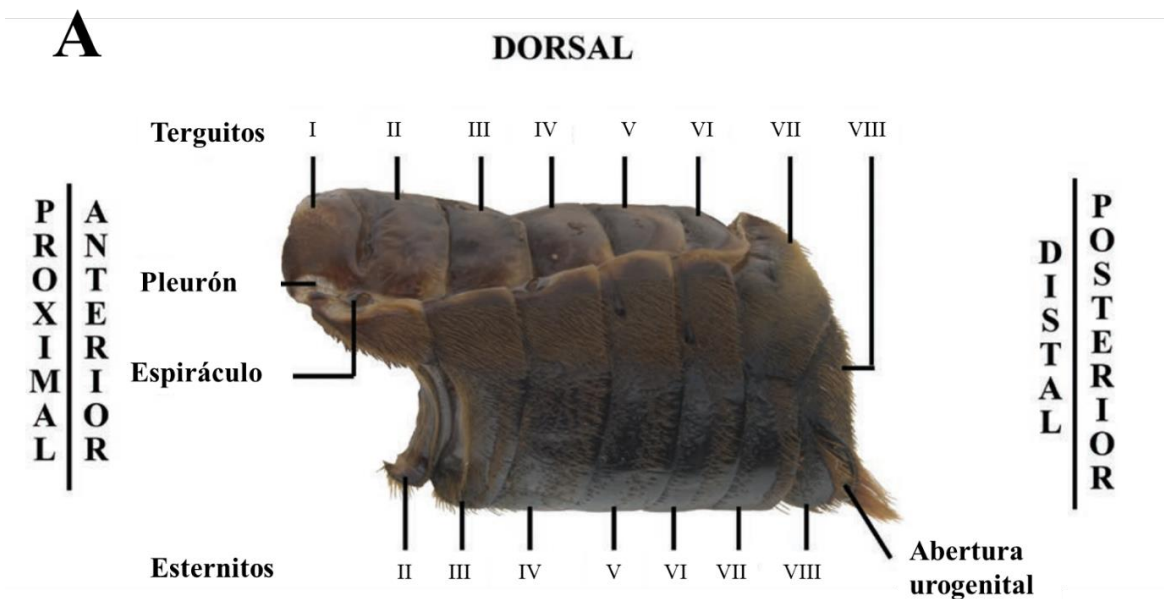
2.1.2 Descripción morfológica corporal de hembras y machos

Los coleópteros adultos de Melolonthidae presentan coloración y formas diversas, con labro y mandíbulas parcialmente expuestas u ocultas bajo el clípeo, con mandíbulas esclerosadas; tres a siete antenas formadas por ocho o diez artejos, los cuales corresponden a la maza antenal y en cuyas lamelas plegadizas predominan las sensilas placoideas. El abdomen presenta seis esternitos visibles y siete pares de orificios respiratorios, tres o cuatro en las regiones pleurales, dos o tres en los extremos esternales y uno en la región tergal. La placa pigdial se encuentra completamente

expuesta o cubierta en parte por los élitros, mientras que los parámetros genitales de los machos se registran como bilobulados o fusionados. Se observa dimorfismo sexual acentuado o poco perceptible. En general, el tamaño corporal de estas especies es variable. En el caso de las larvas, estas son escarabeiformes con antenas formadas por cuatro artejos alargados y las patas posteriores son largas (Morón *et al.*, 2014).

2.1.3 Descripción del abdomen

El abdomen está conformado por diez segmentos. Los segmentos I a VIII son visibles externamente y los segmentos IX a X se encuentran modificados con fines reproductivos. Los terguitos del I al VIII son visibles cuando los élitros se encuentran abiertos y los últimos dos (VII-VIII) reciben el nombre de propigidio y pigidio respectivamente. Los esternitos I y II están fusionados y no son visibles, por lo que el primer esternito visible es el III (Figura 1A). El esternito VII se encuentra fusionado o parcialmente fusionado con el terguito VII u VIII. El esternito VIII y el segmento IX (segmento genital) están invaginados formando estructuras de inserción de los músculos que mueven la genitalia y reciben el nombre de terminalia (Figura 1B)(Cristóvão y Vaz-De-Mello, 2020).



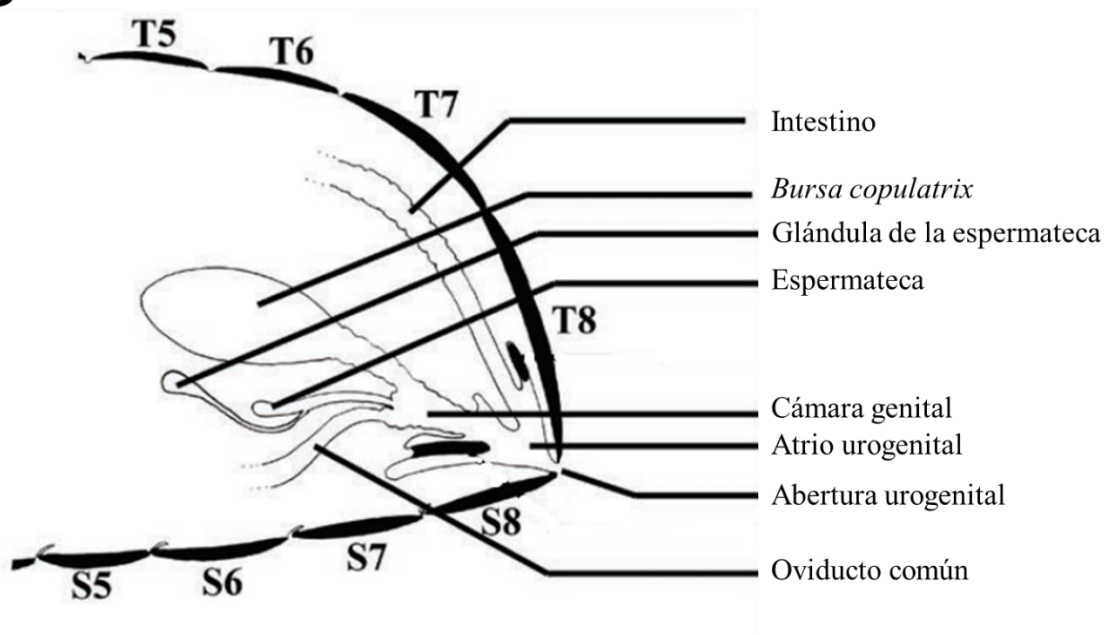
B

Figura 1. Esquema del abdomen. A) abdomen de un macho de *Surutu schulzei* Endrödi (Dynastinae) en vista lateral; B) Esquema del abdomen de una hembra en plano sagital (Tomado y modificado de Cristóvão y Vaz-De-Mello, 2020).

2.1.4 Descripción morfológica del aparato reproductor de hembras

El aparato reproductor de las hembras del orden Coleoptera es variable, aunque generalmente está conformado por dos ovarios, cada uno con diferente número de ovariolas que se unen anteriormente a un filamento terminal y cada ovariola termina con el cáliz o pedicelo. Los pedicelos desembocan en el oviducto lateral correspondiente. Los dos oviductos laterales desembocan en un oviducto común que a su vez desemboca en la cámara genital o vagina. Se presentan las glándulas accesorias y la espermateca que también desembocan en la cámara genital (Rubio-Gómez *et al.*, 2007). En las hembras de Melolonthidae, el aparato reproductor mantiene la organización general de estructura y órganos (Figura 2), pero presenta diferencias en estructuras como la espermateca y su glándula, las glándulas accesorias y las placas genitales. Además, se han observado variaciones en el tamaño y forma de las glándulas accesorias entre las diferentes especies de los géneros *Costelytra*, *Hoplia*, *Phyllophaga*, *Plusiotis*, *Macroductylus* y

Cyclocephala (Stringer, 1988; Carrillo-Ruiz *et al.*, 2006; Romero-López *et al.*, 2010, 2011; Benítez-Herrera *et al.*, 2015; Martínez-Morales y Morón, 2015; Trujillo-Vélez, 2017; Sánchez-Cruz *et al.*, 2019). En la última década, las glándulas accesorias y la cámara genital han sido relacionadas con aspectos de comunicación química sexual del grupo (Romero-López, 2016).

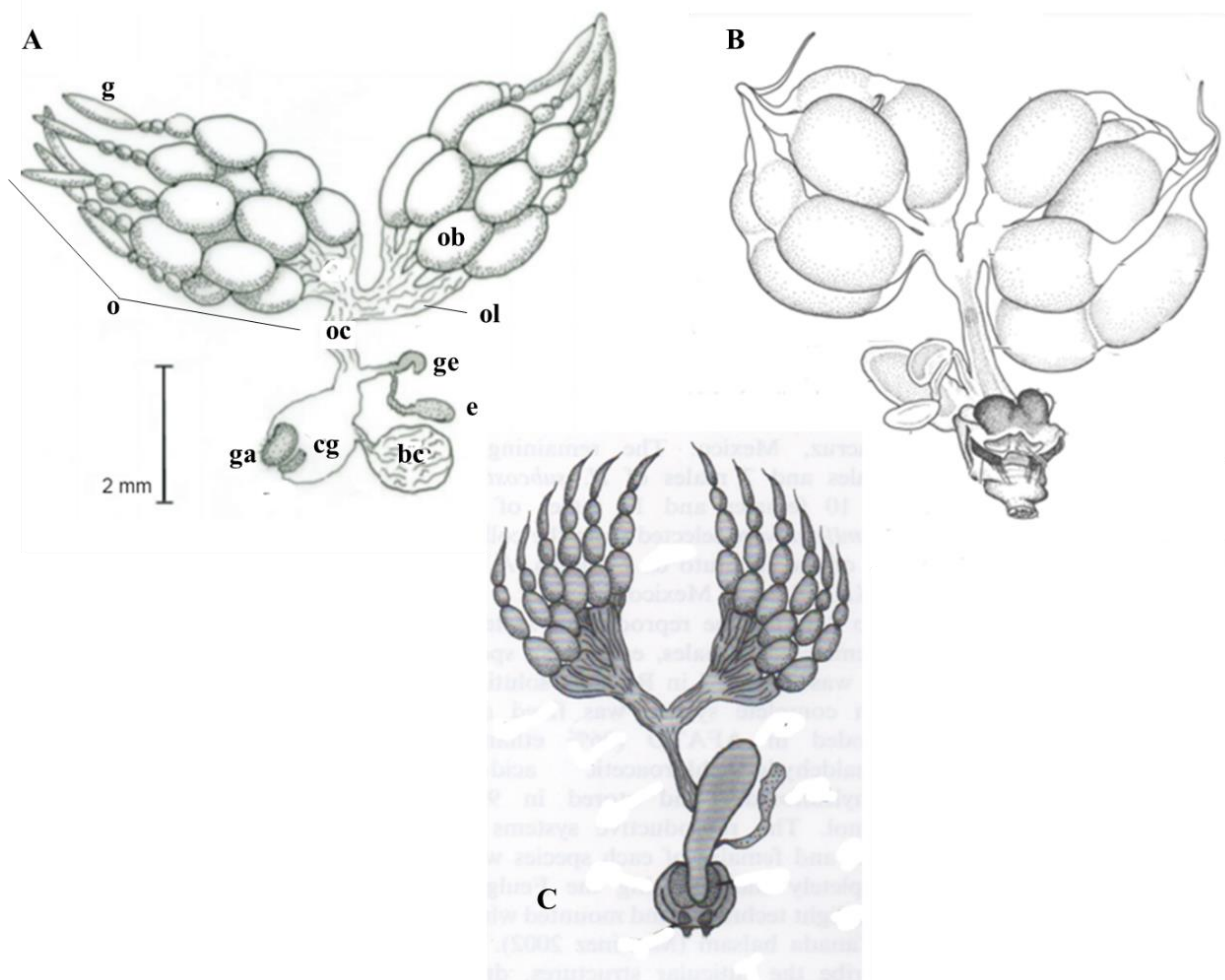


Figura 2. Esquemas del aparato reproductor de hembras de Melolonthidae. A) *Macrodactylus mexicanus*, B) *Costelytra*, C) *Hoplia*. bc, bursa copulatrix; cg, cámara genital; e, espermateca; ga, glándulas accesorias; ge, glándula de la espermateca; o, ovario; ob, ovocito basal; oc, oviducto común; ol, oviducto lateral. (Tomado y modificado de Benítez-Herrera *et al.*, 2015; Stringer, 1998; Carrillo-Ruiz, 2008).

2.2 Ecología química de integrantes de Melolonthidae

La Ecología química es un área de estudio cuyo surgimiento data del siglo XX y se enfoca en estudiar las sustancias químicas involucradas en las interacciones ecológicas intra e interespecíficas de los organismos vivos (Cortez, 2013). Estas sustancias químicas conocidas como infoquímicos, son sustancias que median interacciones entre organismos, produciendo respuestas de tipo conductual o fisiológico con carácter adaptativo para uno o ambos organismos interactuantes (Dicke y Sabelis, 1988).

Los infoquímicos se subdividen en aleloquímicos y feromonas. Los aleloquímicos median interacciones entre individuos de diferentes especies, mientras que las feromonas se encuentran involucradas en interacciones entre individuos de la misma especie, en estas últimas destacan las feromonas sexuales, las cuales median interacciones con fines de apareamiento (Dicke y Sabelis, 1988). Una feromona es una mezcla de sustancias, la cual es secretada y liberada al ambiente por un individuo y provoca una reacción específica en otro individuo de la misma especie. Las feromonas pueden producirse en un epitelio glandular específico o también ser resultado de la relación simbiótica entre un insecto huésped y ciertos microorganismos hospederos (Dicke y Sabelis, 1988). Para el correcto empleo del término “feromona” se han establecido algunos requerimientos: primero, debe identificarse la estructura química de los componentes que provocan respuestas positivas para poder establecer si se trata de una mezcla o de un solo compuesto principal; segundo, debe estar confirmada su actividad biológica, es decir, que exista atracción de individuos del sexo opuesto y por último, se debe tener localizado del sitio de producción y liberación, ya sea un epitelio glandular o el resultado de una relación simbiótica del insecto huésped con ciertos microorganismos (Romero-López *et al.*, 2005).

2.2.1 Comunicación química sexual

El término “comunicación química sexual” se acuñó para establecer la relación entre la comunicación química y el comportamiento sexual y para entenderla es necesario contar con información sobre el comportamiento precopulatorio (Romero-López y Arzuffi,

2010; Romero-López, 2016). La etapa precopulatoria se ubica entre el momento en que aparece el emisor del “mensaje químico” (la hembra) y el “receptor” (el macho). Este comportamiento es utilizado para la localización de pareja e implica una fase de “llamado sexual” que involucra una serie de actos, movimientos y posturas por parte de las hembras que culmina con la exposición de la cámara genital; durante esta secuencia de actos se liberan infoquímicos que provocan la atracción de los machos, para que finalmente se lleve a cabo la cópula (Romero-López, 2016).

2.2.2 Relación entre la anatomía del aparato reproductor y otras estructuras corporales de Melolonthidae con la comunicación química sexual

Se sabe que parte del aparato reproductor de las hembras de Melolonthidae, específicamente glándulas accesorias y cámara genital, están involucradas en la producción y liberación de feromonas sexuales y por lo tanto, también con la comunicación química sexual del grupo. Entre las evidencias bibliográficas se encuentra el estudio de *Holotrichia parallela* Motschulsky, en el cual la liberación de estas sustancias se da tras la exposición de la cámara genital (Figura 3), el cual en la parte posterior cuenta con tejido exocrino y epitelio cuticular, productores de feromonas sexuales (Kim y Leal, 1999).

En México, se han llevado a cabo estudios para las especies *Macroductylus mexicanus* (Benítez-Herrera, 2015), *Macroductylus nigripes* Bates (Trujillo-Vélez, 2017), *Phyllophaga opaca* Moser (Romero-López et al. (2010), *P. obsoleta* (Romero-López et al. 2011) y *Cyclocephala lunulata* Burmeister (Benítez-Herrera, 2018). En las glándulas accesorias de *M. mexicanus* se encontraron células redondeadas con conductos cuticulares y células alargadas, ambas secretoras de sustancias con presencia de polisacáridos, por lo que se sugiere que estas sustancias podrían ser precursores de algún tipo de atrayente sexual. Además, la cámara genital de *M. mexicanus*, cuenta con oenocitos o células clase II, mismos que se encuentran en insectos que utilizan hidrocarburos como precursores de atrayentes sexuales (Benítez-Herrera, 2015). Mientras que en *M. nigripes* se observaron células Clase I en la parte posterior de la

cámara genital, por lo que se sugiere que este epitelio glandular especializado podría producir algún tipo de atrayente sexual (Trujillo-Vélez, 2017). Por otro lado, en el interior de las glándulas accesorias se encontraron células secretoras de sustancias tipo PAS-positivo, similar al caso de *M. mexicanus*. Diferente a lo anterior, tras el estudio de las glándulas accesorias y la cámara genital de *C. lunulata*, no se encontró evidencia de tejido con características para la producción de feromonas. Sin embargo, se encontró que la región del VI terguito abdominal de hembras y machos cuentan con conductos o poros cuticulares, mismos que pueden estar relacionados con la producción de feromonas sexuales. Por último, en el caso de *P. opaca* y *P. obsoleta* se han encontrado células Clase I formando epitelios glandulares especializados en la producción de infoquímicos en la cámara genital y en las glándulas accesorias. Se trata de un epitelio secretor con células alargadas que terminan en conductos cuticulares largos, son de pared gruesa y esclerotizadas (Romero-López *et al.*, 2011).

Por otro lado, se han encontrado asociaciones de bacterias con potencial productor de atrayentes sexuales en el interior de las glándulas accesorias de algunos Melolonthidae, destacando los estudios en *Costelytra zealandica* White, en donde encontraron bacterias de la especie *Morganella morganii* (Hoyt *et al.*, 1971; Marshall *et al.*, 2016). En especies distribuidas en México, también se han encontrado microorganismos en el interior de la cámara genital. Tal es el caso de *Phyllophaga obsoleta* Blanchard (bacterias *Klebsiella oxytoca* y *Klebsiella michiganensis*) (Rosete-Enríquez y Romero-López, 2017) y *Phyllophaga ravidia* Blanchard (bacterias *Proteus vulgaris* y *Achromobacter* sp) (Pérez-Estrada *et al.*, 2020), así como *Cyclocephala barrerae* Martínez (bacterias *K. oxytoca* y *Citrobacter freundii*) y *Cyclocephala lunulata* Burmeister (bacterias *M. morganii* y *Klebsiella* sp) (Sánchez-Cruz *et al.*, 2020).

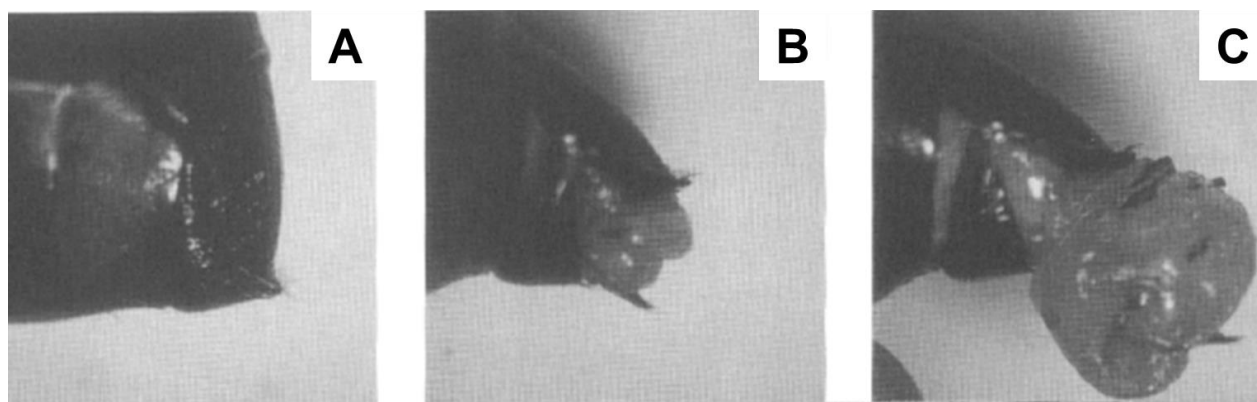


Figura 3. Fotos mostrando la exposición de la cámara genital en hembras de *Hollotrichia parallela* (Kim y Leal, 1999), lo cual ha evidenciado un “llamado sexual” que incluye la producción de la feromona sexual.

Por otro lado, en la especie *Anomala albopilosa* Hope perteneciente a la subfamilia Rutelinae, a partir de extractos de diferentes secciones abdominales de las hembras se logró identificar uno de los mayores componentes constituyentes de su feromona sexual, además de que se localizaron estructuras en forma de poro esparcidas en los esternitos apicales y placas anales de las hembras, mismos que se encuentran conectados con células epiteliales de tipo secretor, siendo este el sitio de producción y liberación de su feromona sexual (Tada y Leal, 1997).

2.2.3 Extracción e identificación de feromonas sexuales

Tradicionalmente, las feromonas de los insectos son aisladas de las glándulas productoras o a partir de diferentes secciones del cuerpo por medio de 1) la técnica de extracción directa con disolventes (Tada y Leal, 1997), la cual consiste en depositar el tejido del insecto en pequeños viales con hexano o diclorometano durante un tiempo determinado para su posterior análisis. Otro método clásico consiste en capturar las feromonas por 2) microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés), la cual se basa en la adsorción de compuestos volátiles sobre una fibra inerte cubierta con diferentes tipos de adsorbentes y su posterior desorción al interior de un cromatógrafo de gases para su análisis (Malosse *et al.*, 1995). Ambas técnicas permiten extraer los

compuestos orgánicos apolares y polares, además de que acopladas a cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM), permiten la identificación de la composición de las feromonas. Posterior a la identificación, se lleva a cabo la confirmación de la actividad biológica de cada compuesto o mezclas de compuestos identificados (Zarbin *et al.*, 2007; Robbins *et al.*, 2003, 2009), lo cual se hace a partir de bioensayos en olfatómetro o por electroantenografía (Romero-López y Arzuffi, 2010).

En general, para los integrantes de Melolonthidae se sabe que las feromonas sexuales están compuestas principalmente por terpenoides, ácidos grasos y derivados de aminoácidos. Para las hembras de especies de Rutelinae los principales constituyentes feromonales son derivados de ácidos grasos (Leal, 1998; Romero-López *et al.*, 2005), mientras que para hembras de Melolonthinae, generalmente son derivados de aminoácidos y de azufre, así como compuestos terpénicos (Leal, 1998). Las hembras de *A. albopilosa* producen buibuilactona (Tada y Leal, 1997), al igual que las hembras de *Anomala cuprea* Hope (Leal, 1991; Leal *et al.*, 1993) (Figura 4A). También está el caso de *Anomala albopilosa sakishimana* Nomura y *Anomala octiescostata* Burmeister, cuya feromona sexual de ambas especies está constituida por (R,Z)-5-(-)-1 octenil oxaciclo 2-pentanona y el (R,Z)-5-(-)-1 decenil oxaciclo 2-pentanona (Leal *et al.*, 1994), mientras que las hembras de *Anomala orientalis* Waterhouse producen (Z) y (E)-7, 2-tetradecenona (Zhang *et al.*, 1994; Facundo *et al.*, 1999).

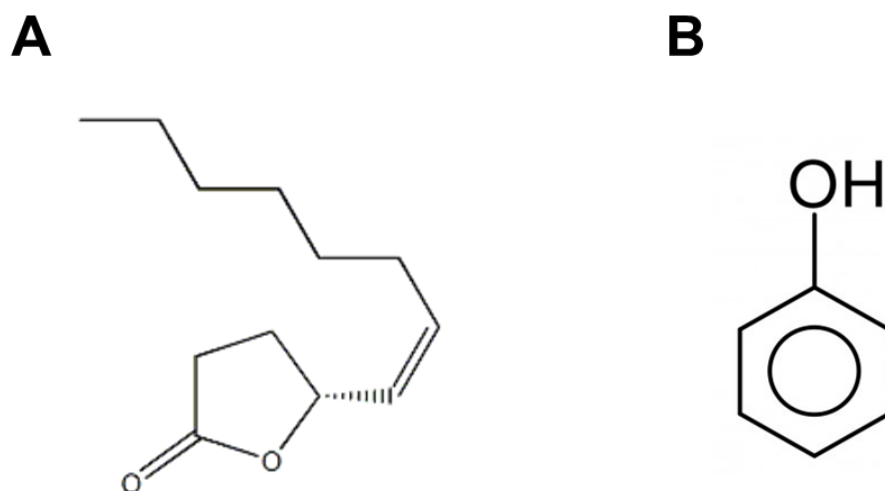


Figura 4. Feromonas sexuales identificadas para la familia Melolonthidae. A) Buibuilactona (*Anomala albopilosa* y *Anomala cuprea*), B) Fenol (*Costelytra zealandica*).

Entre los estudios que se han realizado para Melolonthinae, se sabe que para *C. zealandica* las glándulas accesorias producen fenol (Figura 4B), sustancia identificada como feromona sexual de esta especie (Hoyt *et al.*, 1971; Marshall *et al.*, 2016). En la mayoría de los casos, no se ha llegado a elucidar la estructura química y sólo se mencionan las sustancias emitidas por la hembra que provocan la atracción de los machos. Tal es el caso de *M. mexicanus*, para la cual se analizaron extractos de la cámara genital y las glándulas accesorias, de las cuales se extrajeron e identificaron veinte compuestos químicos, los cuales en su mayoría son ácidos grasos, aldehídos, metil ésteres y ácidos carboxílicos, aunque los ácidos n-hexanoico, octadecanoico y oleico fueron los más abundantes, mismos que han sido reportados como precursores de feromonas, principalmente en lepidópteros (García-Canales y Romero-López, 2017). Además, en el género *Melolontha* se demostró a partir de extractos corporales de *Melolontha hippocastani* F. y *Melolontha* L. que el fenol atrae a los machos y por lo tanto, es un posible constituyente de su feromona sexual (Ruther *et al.*, 2002).

2.3 *Phyllophaga*

El género *Phyllophaga* fue propuesto en 1827 por Harris y forma parte de la subfamilia Melolonthinae, la cual se divide en nueve subgéneros: *Phytalus*, *Chlaenobia*,

Listrochelus, *Tostegoptera*, *Eugastra*, *Chirodines*, *Clemora*, *Cnemaris* y *Tryodonyx* (Morón, 1986). Los miembros de *Phyllophaga* presentan un cuerpo alargado u ovalado, glabro o cubierto con sedas, las antenas están conformadas por ocho a diez artejos y la maza antenal con tres a seis lamelas de longitud y grosor variable; las meso y metatibias tienen carinas o proyecciones dentiformes en la parte media externa; el edeago cuenta con estructuras esclerosadas. Presentan dimorfismo sexual, mismo que se acentúa en las antenas, la vestidura, el abdomen y las uñas tarsales. La identificación de la mayoría de las especies se hace principalmente a través de las genitalias de los machos o con las placas genitales de las hembras (Morón *et al.*, 1997).

En México, los adultos de *Phyllophaga* son conocidos de forma popular como “mayates de mayo”, “escarabajos sanjuaneros” o “escarabajos de junio” y sus larvas se denominan “gallinas ciegas”, “gusanos blancos” o “nixticuiles”. Los adultos son considerados plaga, ya que atacan el follaje de diversas plantas frutales, forrajeras y de ornamento; sin embargo, las larvas son las causantes de mayor número de afectaciones y por lo tanto de pérdidas económicas, puesto que se alimentan de las raíces de cultivos (Morón, 1986; Marshall *et al.*, 2016). No obstante, hay especies que son consideradas de importancia ecológica como *Phyllophaga macrocera* Bates y *Phyllophaga vetula* Horn al interaccionar con otras especies, incluso vegetales, sin provocarles alguna afectación evidente (Romero-López *et al.*, 2007).

2.3.1 Taxonomía

Tradicionalmente la taxonomía emplea caracteres morfológicos para describir, clasificar, nombrar e identificar especies y con ello establecer las bases de la construcción de árboles de la vida, mismos que ofrecen datos para conocer aspectos ecológicos y de conservación de las especies. Sin embargo, con el surgimiento de otras herramientas, como los análisis moleculares basados en el uso de marcadores moleculares se permitió el surgimiento de la denominada taxonomía integrativa (Barcenas-Villalobos, 2018). La taxonomía integrativa surge como una ciencia cuyo objetivo es delimitar las unidades de diversidad de la vida a partir de la utilización de múltiples y complementarias herramientas

las cuales incluyen aspectos de morfología comparada, moleculares, filogeográficos, ecológicos, de desarrollo y comportamiento además de genética de poblaciones (Dayrat, 2005). Los estudios sobre taxonomía de *Phyllophaga* son abundantes, basados en el estudio de caracteres morfológicos, principalmente de la genitalia de los machos (Morón, 1986; Cherman y Morón, 2014). Sin embargo, a la fecha ya se cuenta con un primer trabajo sobre taxonomía integrativa para un ensamble de por lo menos cinco especies del género, utilizando caracteres morfológicos (uñas tarsales) y moleculares (amplificación del gen MIT-CO1) (Salgado-Farias, 2019) y un estudio cercano efectuado con *Phyllophaga brevidens* Bates y *Phyllophaga lenis* Horn, aunque en este caso sólo se emplearon caracteres moleculares (gen MIT-CO1) sin una revisión morfológica simultánea (Zaragoza-Ortega *et al.*, 2017).

2.3.2 Anatomía del aparato reproductor

Son pocas las descripciones del aparato reproductor de hembras de especies de *Phyllophaga* distribuidas en México, restringiéndose a *P. opaca*, *P. obsoleta*, *P. ravida*, *Phyllophaga testaceipennis* Blanchard, *Phyllophaga latipes* Bates, *Phyllophaga pruinosa* Blanchard, *Phyllophaga rugipennis* Poppius, *Phyllophaga setifera* Burmeister, *Phyllophaga subrugosa* Moser y *Phyllophaga tenuipilis* Bates; todas ellas coinciden con la anatomía general del aparato reproductor de los Melolonthidae (Figura 5) (Romero-López *et al.*, 2010, 2011; Martínez-M y Morón, 2015; Pérez-Estrada *et al.*, 2020). El aparato reproductor de *P. opaca* está formado por el oviducto común, la espermateca y su glándula, la *bursa copulatrix*, un par de glándulas accesorias y la cámara genital (Romero-López *et al.*, 2010). Esto es similar en hembras de *P. obsoleta*, cuyo aparato reproductor está conformado por una cámara genital, la cual se asocia con las glándulas accesorias, dos ovarios, un oviducto común, una espermateca y una *bursa copulatrix* (Romero-López *et al.*, 2011). De igual forma, el de *P. ravida* está formado por los ovarios, el oviducto común, la cámara genital, las glándulas accesorias tipo I y tipo II, además de una espermateca y su glándula, la cual se encuentra unida en la parte basal con la *bursa copulatrix* (Pérez-Estrada *et al.*, 2020). Para el caso de las especies restantes, estas

presentan una estructura semejante en los ovarios y cuentan con seis ovariolas en cada ovario; en todas las especies la espermateca es pequeña y alargada y su glándula es mucho más grande con relación a esta. Entre los aspectos comparativos que destacan está la morfología de las placas genitales, ya que esta es diferente en cada especie, razón por la cual se les considera para la determinación de las especies (Martínez-M y Morón, 2015) y el número de glándulas accesorias (Figura 6).

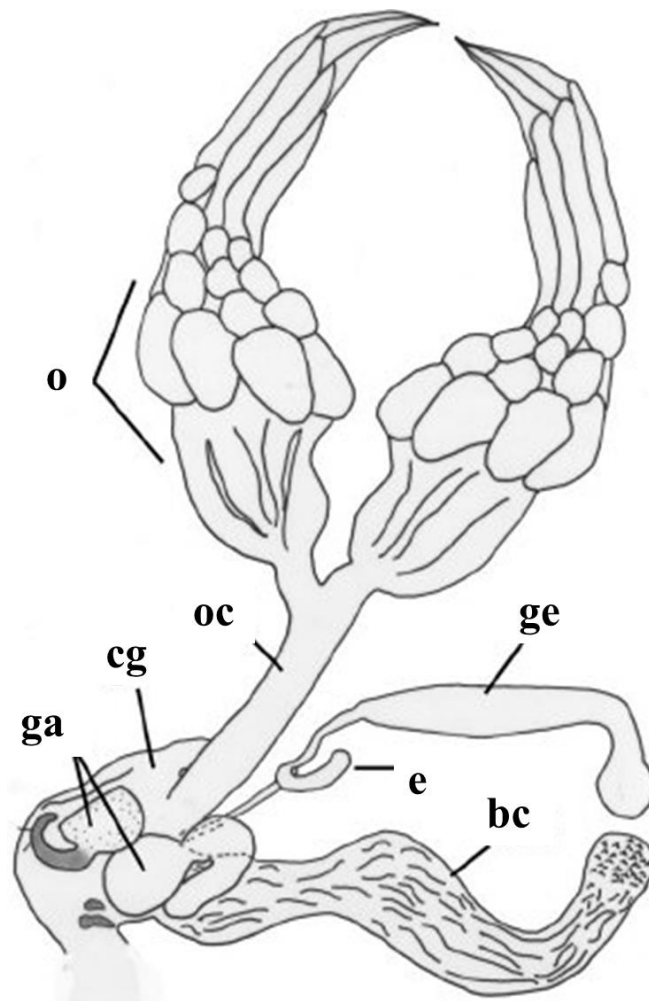


Figura 5. Ilustración del aparato reproductor de hembras *Phyllophaga*. *bc*, bursa copulatrix; *cg*, cámara genital; *e*, espermateca; *ga*, glándulas accesorias; *ge*, glándula de la espermateca; *o*, ovarios; *oc*, oviducto común (Modificado de Romero-López *et al.*, 2011).

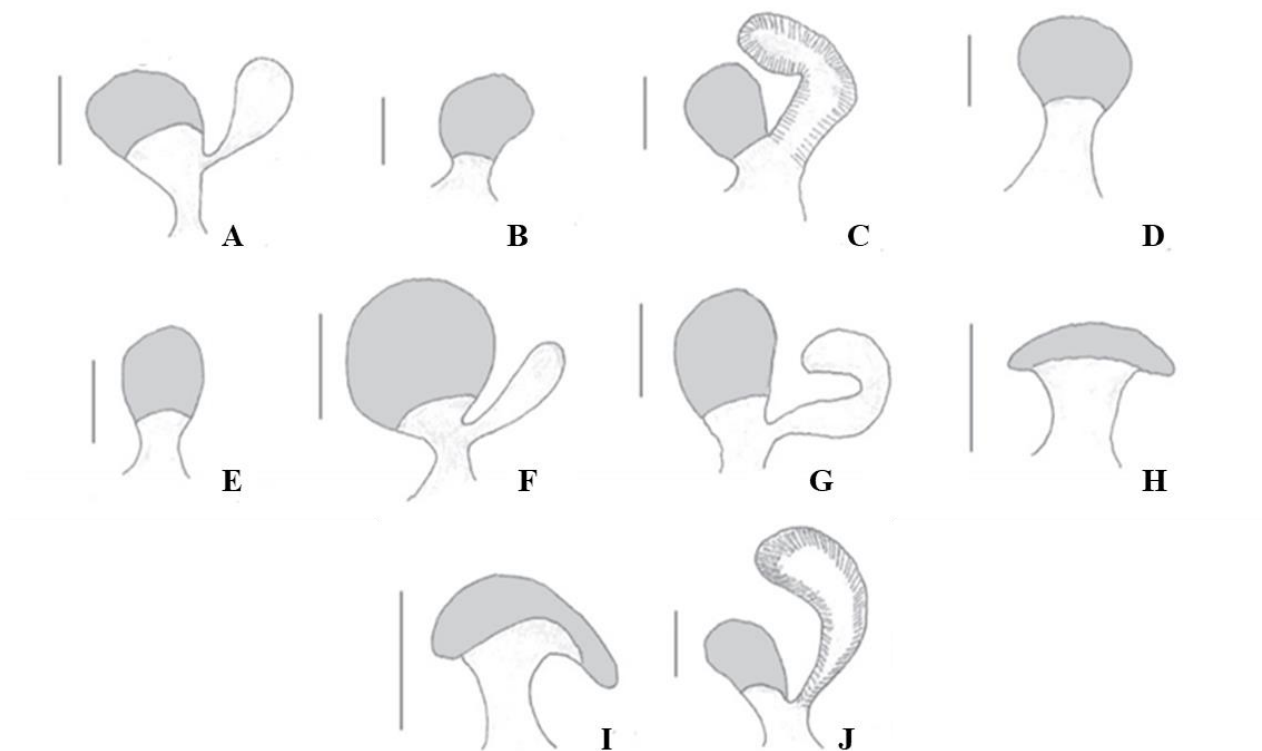


Figura 6. Esquema de las glándulas accesorias de varias especies de *Phyllophaga*. A) *P. testaceipennis* B) *P. latipes*. C) *P. obsoleta*. D) *P. opaca*. E) *P. pruinosa*. F) *P. ravida*. G) *P. rugipennis*. H) *P. setifera*. I) *P. subrugosa*. J) *P. tenuipilis*. Escalas = 1 mm (Modificado de Martínez-M. y Morón, 2015).

2.3.3 Comunicación química sexual

2.3.3.1 Comportamiento precopulatorio e importancia de la cámara genital

Se han efectuado estudios y descripciones del comportamiento precopulatorio para algunas especies de *Phyllophaga*, además de que se ha relacionado la morfología de la cámara genital y las glándulas accesorias con aspectos del comportamiento precopulatorio y de su comunicación química sexual (Romero-López, 2016). Se sabe que cuando los machos de *Phyllophaga* emergen del suelo, vuelan hacia un punto elevado para posarse y localizar a las hembras, las cuales liberan sustancias químicas que los atraen, promoviendo su acercamiento y la cópula (Morón, 1986; Romero-López, 2016).

Para este género se ha descrito el comportamiento precopulatorio en campo para *P. obsoleta*, *P. ravidia*, *Phyllophaga macrocera* Bates (Romero-López *et al.*, 2007) y *P. opaca* (Romero-López *et al.*, 2010, 2016) y *Phyllophaga cristagalli* Arrow (Romero-López *et al.*, 2016). Se ha observado que tras emerger del suelo, las hembras y machos de *P. obsoleta* inmediatamente se posan en las ramas y hojas de árboles, y las hembras llevan a cabo su “llamado sexual” exponiendo la cámara genital y realizando movimientos del abdomen y metatarsos, marcando así el inicio de la actividad sexual, a su vez los machos atraídos, se acercan y se posan en la parte posterior del cuerpo de la hembra para intentar copular. Al concluir la cópula, los machos retiran el edeago y se alejan volando, para posteriormente enterrarse (Romero-López *et al.*, 2007).

Para adultos de *P. ravidia* se sabe que estos emergen del suelo y se posan inmediatamente sobre ramas y hojas de árboles. Posteriormente, muestran una secuencia de movimientos y posturas que comprenden el comportamiento precopulatorio y su llamado. En el momento de la cópula, el macho expone su edeago, evagina el saco interno y lo introduce en el gonoporo. Al concluir el contacto sexual, los machos retraen el saco interno, retiran el edeago y se alejan volando, mientras que las hembras, permanecen inmóviles y posteriormente se entierran (Romero-López *et al.*, 2007). En *P. macrocera*, se ha registrado que los adultos tras emerger inician inmediatamente su actividad sexual en el suelo. Las hembras levantan su abdomen y lo mueven en círculos, exponen su cámara genital y llevan a cabo su llamado sexual. El macho extiende sus lamelas y se dirige hacia una hembra, se coloca por detrás de la hembra y se monta sobre ella intentando copular. En el momento en que un macho inicia la cópula otros machos intentan separarlos. Al finalizar la cópula la hembra se entierra inmediatamente y el macho continúa volando (Romero-López *et al.*, 2007). Por último, se ha documentado que antes de la cópula, las hembras de *P. opaca* y *P. cristagalli* presentan una serie de patrones de comportamiento que comprenden el llamado sexual, exponen la cámara genital para atraer a los machos, los cuales extienden sus lamelas y se acercan a la hembra para llevar a cabo la cópula (Romero-López *et al.*, 2016).

2.3.4 Identidad de componentes feromonales

En *Phyllophaga cuyabana* Moser se demostró que la feromona sexual está conformada por dos compuestos que son fenol y p-cresol, este último reportado por primera vez como parte de una feromona sexual (Figura 7C y 7D) (Zarbin *et al.*, 2007). También se han reportado especies que utilizan el mismo compuesto químico como feromona sexual, tal es el caso de *Phyllophaga anxia* Leconte (Zhang *et al.*, 1997) y *Phyllophaga georgiana* Horn (Robbins *et al.*, 2009), ambas responden de forma positiva al éster metílico de L-iso-leucina (LIME) (Figura 7A). El LIME, también se ha reportado como componente de la feromona sexual de *Phyllophaga elenans* Saylor, además de que también se identificaron al éster metílico de N-formil L-iso-leucina (For-LIME) y el N-acetil éster metílico de L-iso-leucina (Ac-LIME). Sin embargo, Leal *et al.*, (2003) menciona que estos dos últimos compuestos no resultan indispensables para cebar trampas y capturar insectos. Por último, en *Phyllophaga lanceolata* Say fue identificado el éster metílico de L-leucina como su feromona sexual, compuesto similar en estructura al LIME (Figura 7B) (Nojima *et al.*, 2003).

En el caso de la identidad química de las feromonas sexuales de especies de *Phyllophaga* distribuidas en México, se han identificado derivados cuticulares basados principalmente en hidrocarburos alifáticos, derivados de ácidos grasos y derivados fenólicos, como el butilhidroxianisol, el cual ya ha sido probado en bioensayos de olfatómetro y en campo (Romero- López y Arzuffi, 2010). También se ha obtenido el perfil químico de *P. opaca* y *P. ravidia*: para la primera se han identificado colestadienol-4,6,3; colesterol; colestadieno-3,5; 2-metil heptadecano; dl-á-tocoferol succinato; 9,19-ciclolanostenol-24,3, acetato y lupenol -20, 3 acetato, mientras que para *P. ravidia* se han extraído e identificado ciclohexano, 1,1' (2 tridecil 1,3 propanedil) bis- ; 10 metil eicosano; 5 butil hexadecano; 3 hexen 2 ona; 3,3 dietil 2,4 azetidina; 3 metileno 2 pentanona; 2 metoxi 2 metil butano y tetrametil oxirano (Romero-López *et al.*, 2019).

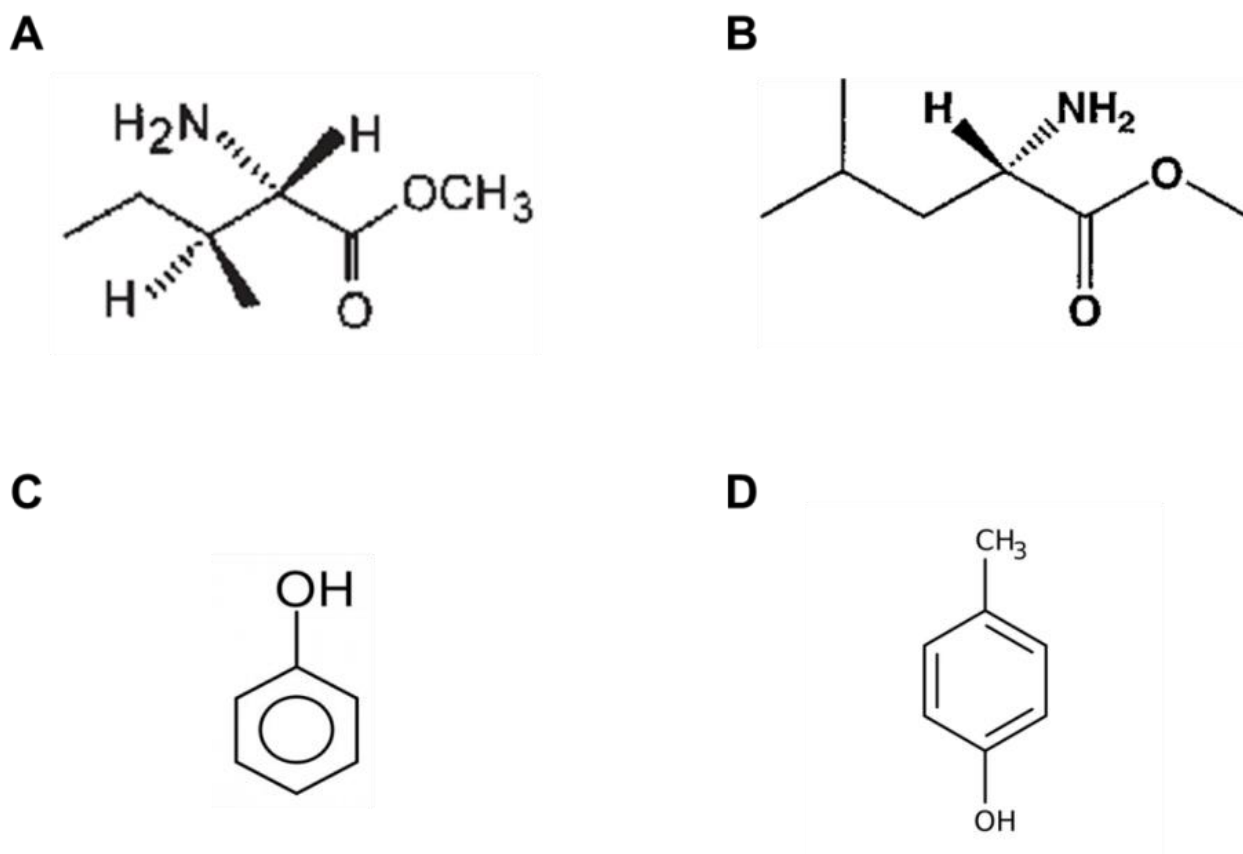


Figura 7. Feromonas sexuales identificadas en el género *Phyllophaga*. A) Éster metílico de L-isoleucina (*Phyllophaga anxia*, *Phyllophaga georgiana* y *Phyllophaga elenans*), B) Éster metílico de L-leucina (*Phyllophaga lanceolata*), C) Fenol y D) p-cresol (*Phyllophaga cuyabana*).

2.4 *Phyllophaga vetula*

2.4.1 Generalidades

Phyllophaga vetula fue descrita por Horn en 1887. Sus integrantes presentan un ciclo de vida anual y su actividad de vuelo se presenta durante abril y mayo, pero la máxima actividad es a finales de abril, aunque el periodo de lluvias no se inicie (Aragón-García *et al.*, 2005). La longitud de los adultos va entre 13 a 20 mm; el cuerpo es ovalado y robusto ensanchado hacia atrás y el color es pardo oscuro, pardo rojizo, castaño oscuro o castaño amarillento. La región dorsal está cubierta con sedas largas cortas y abundantes, principalmente en la mitad anterior. La cabeza es pequeña en proporción al protórax; el clípeo es corto, ligeramente sinuado. Las antenas están formadas por diez artejos. En los machos la maza antenal es de igual longitud que el funículo o hasta 2.8

veces más larga que este y en hembras la maza antenal tiene una longitud equivalente al funículo. El labro es reniforme, poco excavado, setífero y poco prominente. Se les encuentra en bosques tropicales perennifolios y caducifolios de diversos tipos, en bosque mesófilo de montaña, matorrales xerófilos, encinares, bosques de coníferas, pastizales naturales e inducidos, terrenos cultivados y en parque y jardines urbanos. Los imagos están activos entre los meses de abril, mayo y junio. Sus larvas han sido observadas consumiendo raíces de numerosas especies de gramíneas silvestres y cultivadas, constituyendo plagas severas (Morón, 1986).

Además de lo anterior, existe incertidumbre acerca de la clasificación, filogenia, ecología y hábitos de los integrantes de esta especie; de ahí el estudio de Romero-López *et al.* (2007) donde se describe el comportamiento precopulatorio y de alimentación de adultos y el de Salgado-Farias (2019), basado en taxonomía integrativa.

2.4.2 Comportamiento precopulatorio

Para esta especie se han llevado a cabo estudios en campo y laboratorio; en el primer caso, se ha observado que los machos son los primeros en emerger del suelo (aproximadamente a las 20:06 hrs); estos inician el vuelo y se aglomeran al ras del suelo en espera de que emerjan las hembras. Tras emerger, las hembras inmediatamente efectúan el llamado sexual, el cual consiste en una serie de movimientos y posturas en los que destacan la elevación de su abdomen en un ángulo de 45°, moviéndolo en círculos y de sus metatarsos en un ángulo similar, para finalmente exponer la cámara genital (Figura 8). Con ello, se detona el acercamiento del macho previo a la cópula (Aragón-García *et al.*, 2005; Romero-López *et al.*, 2007). En los registros de comportamiento en laboratorio, en promedio, las hembras fueron las primeras en emerger del suelo a las 20:04 hrs y los machos a las 20:06 hrs. Las hembras después de algunos vuelos cortos y desplazamientos sobre el suelo, enterraron la parte anterior de su cuerpo, dejando expuesta la región abdominal. Después de ello, comenzaron a levantar su abdomen en un ángulo de 45°, moviéndolo en círculos y levantando sus patas posteriores en un ángulo similar. Al final de dicha secuencia se observó la protrusión de la cámara

genital, siendo visibles también las glándulas accesorias y, en algunos casos, las placas genitales. Los machos se acercaron inmediatamente y se presentó la cópula. Desde que se presentó la exposición de la cámara genital y glándulas accesorias hasta el acercamiento de los machos, en el 90% de los registros de este comportamiento en *P. vetula*, se observaron movimientos circulares y de arriba-abajo de su abdomen, moviendo sus patas posteriores también de arriba a abajo. Además, en las quince observaciones se observó que inmediatamente después del llamado de una hembra, los tres machos se acercaban a ella intentando copular, incluso después de que alguno de estos machos lograba la introducción del saco interno, los demás continuaban forcejeando con la pareja durante varios minutos (Fernández-Campos *et al.*, 2020). Esto coincide con los reportes en campo para esta especie, citándose que hasta tres machos pueden competir por una hembra.

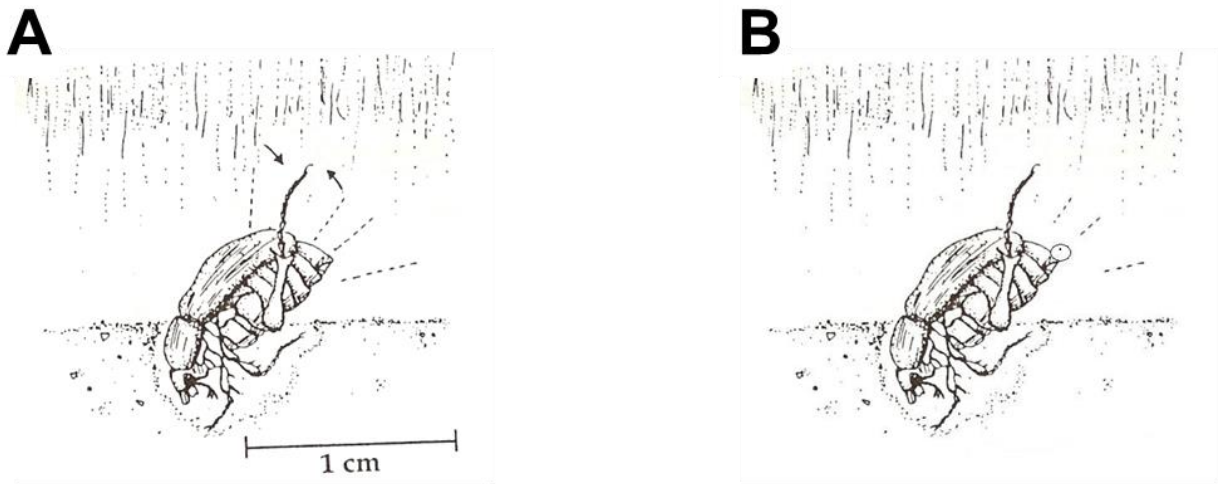


Figura 8. Llamado sexual en hembras de *Phyllophaga vetula*. A. Inicio del llamado, en el cual la hembra inclina el cuerpo en un ángulo de 45° aproximadamente, quedando enterrada en el suelo la parte anterior y al descubierto la región abdominal. Es evidente el movimiento constante, de arriba abajo, de las patas posteriores. B. Momento de la protrusión de la cámara genital y glándulas accesorias (Tomado de Fernández-Campos *et al.*, 2020 y adaptado de Facundo *et al.*, 1999).

3. JUSTIFICACIÓN

Varias especies de *Phyllophaga* se encuentran agrupadas dentro de los “complejos gallina ciega”, caracterizadas por generar pérdidas económicas o en “ensambles gallina ciega” donde se agrupa a las especies desde un enfoque netamente ecológico (Romero-López, 2012). Para disminuir los daños agrícolas que llegan a provocar algunas especies del género, se utilizan principalmente insecticidas sintéticos que afectan negativamente al ambiente. Es por ello, que el conocimiento de la biología reproductiva, del comportamiento y de la ecología química de cada especie involucrada, resulta fundamental para el establecimiento de una estrategia de manejo adecuada (Romero-López, 2016). Asimismo, en especies con importancia ecológica que conforman “ensambles *Phyllophaga*”, con el estudio de los esquemas de comunicación química se obtiene información fundamental para la comprensión y el esclarecimiento de aspectos morfológicos, sistemáticos y evolutivos del grupo (Salgado-Farias, 2019).

Por ello, en el presente estudio se describe la anatomía del aparato reproductor de las hembras de *P. vetula* y se obtiene el perfil químico de extractos de estructuras como la cámara genital, glándulas accesorias y el abdomen, en la búsqueda de potenciales sitios productores de feromonas sexuales. Dicha información complementará el esquema de comunicación química sexual de esta especie, además de que permitirá el esclarecimiento de aspectos aún controversiales de su clasificación y brindará elementos para establecer programas de manejo o conservación de ésta y otras especies de *Phyllophaga*.

4. HIPÓTESIS

El aparato reproductor de hembras de *P. vetula* presenta un arreglo anatómico similar al de otras especies de *Phyllophaga*, además de que extractos del interior de la cámara genital y de las glándulas accesorias presentan un perfil químico similar al conformado por compuestos ya identificados en otras especies del género.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Integrar el estudio anatómico del aparato reproductor de cámara genital y glándulas accesorias de hembras de *P. vetula* con la elucidación del perfil químico de dichas estructuras, como parte de la búsqueda de sitios productores de feromonas.

5.2 Particulares

- Describir la anatomía del aparato reproductor completo de hembras de *P. vetula*.
- Identificar los compuestos químicos extraídos del interior de la sección posterior de la cámara genital, de las glándulas accesorias y del abdomen.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Obtención del material biológico

Se recolectaron manualmente coleópteros adultos de *P. vetula* en las zonas de pastos del Jardín Botánico Universitario, en Ciudad Universitaria de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), durante mayo y junio de 2019, entre las 19:50 y 20:30 hrs. Los insectos capturados fueron llevados al “Laboratorio de Infoquímicos y Otros Productos Bióticos” ubicado en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Biológicas, BUAP, para la confirmación de su identidad taxonómica con base en Morón (1986) y para su sexado.

6.2 Descripción anatómica del aparato reproductor de hembras de *P. vetula*

Se sacrificaron ocho hembras de *P. vetula* a las que se les extrajo el aparato reproductor completo. De acuerdo con la técnica propuesta por Martínez-M. (2002), la extracción de cada aparato reproductor se efectuó en solución Ringer para evitar la retracción de los tejidos. Posteriormente, fueron fijados con AFATD (mezcla de etanol 96°- formaldehído – ácido acético – dimetilsulfóxido - ácido tricloracético) durante 2 h. Al terminar la fijación, las piezas fueron lavadas con alcohol al 96% y después con agua destilada. Seguido de esto se realizaron dos técnicas, la primera fue la técnica de tinción con verde luz que sirve para una observación clara de las estructuras del aparato reproductor completo y la segunda fue la técnica de negro de clorazol para una observación clara de las estructuras cuticulares. En la primera técnica, después de que las piezas fueron lavadas, cada aparato reproductor fue teñido ligeramente con solución alcohólica verde luz al 0.05% para finalmente ser revisados y dibujados. En el segundo caso, los ovarios fueron retirados y almacenados y posteriormente las estructuras restantes correspondientes a la cámara genital fueron maceradas con una solución de hidróxido de potasio al 10% durante 24 h y lavado con agua destilada. Las piezas fueron colocadas en peróxido de hidrógeno de 30 volúmenes con tres gotas de hidróxido de amonio hasta que se aclaró la pieza y fueron enjuagadas con agua destilada. Las piezas diseccionadas se colocaron en una mezcla de lactofenol y negro de clorazol hasta que quedaron totalmente teñidas. Finalmente, se almacenaron en lactofenol para posteriormente revisar y dibujar. Para el dibujo de la morfología del aparato reproductor, se empleó un microscopio estereoscópico modelo Zeiss-Stemi SV-11 con cámara clara.

6.3 Obtención del perfil químico de extractos de la cámara genital, glándulas accesorias y abdomen

6.3.1 Extracción directa con disolvente

Se emplearon treinta y seis hembras de *P. vetula* seleccionadas al azar. La extracción de la cámara genital consistió en apretar el abdomen de manera que la sección posterior de la cámara genital quedara expuesta, posteriormente esta estructura fue

cortada e inmediatamente se procedió con el aislamiento de ambos tipos de glándulas accesorias (Robbins *et al.*, 2003; Romero-López *et al.*, 2019). Para el caso de los extractos de abdomen se utilizó a partir del segmento IV en adelante (Tada y Leal, 1997; Benítez-Herrera, 2018). Cada una de las estructuras fue colocada en un vial de 2 ml a un volumen de 100 µl de hexano. En cada vial se colocaron las estructuras anatómicas de las seis hembras (6 equivalentes hembra) y se hicieron tres repeticiones por estructura.

6.3.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

De cada muestra obtenida de la extracción, se inyectó un volumen de 1 µl en el cromatógrafo de gases (CG) con ayuda de una jeringa de 10 µl. El análisis de las muestras se efectuó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG-EM). El CG cuenta con una columna capilar DB5 MS (de 30 m. de largo x 250 µm de diámetro interno x 0.25 µm de espesor de película). El inyector se programó en modo Splitless a 225°C y el auxiliar a 280°C, con un volumen de inyección de 1 µl. El programa de temperaturas del horno consistió en una temperatura inicial de 50°C con un incremento de 15°C/min, con una temperatura final de 250°C. El espectrómetro de masas (EM), se programó en modo SCAN, con un intervalo de masas de 35 a 550 uma. Se utilizó helio como gas acarreador, un flujo de 1ml/min y un tiempo de corrida de 34.33 min (tiempo inicial de 1 min y final de 20 min) para cada una de las muestras inyectadas. Finalmente, para la identificación de los compuestos se recurrió a una base de datos espectral en la cual se discriminaron y se eligieron los compuestos químicos que aparecen en los cromatogramas generados para los extractos de cada estructura.

7. RESULTADOS

7.1 Estudio morfológico del aparato reproductor de hembras

7.1.1 Anatomía del aparato reproductor completo

El aparato reproductor de las hembras de *P. vetula* está formado por dos ovarios, dos oviductos laterales, un oviducto común, una espermateca y su glándula, una *bursa copulatrix*, dos pares de glándulas accesorias y una cámara genital (Figura 9). Cada ovario tiene seis ovariolas, cada una de ellas con un filamento terminal, germario, vitelario y el pedicelo. En el vitelario se observan ovocitos en diferentes estados de desarrollo; cada pedicelo desemboca en su respectivo oviducto lateral y éstos a su vez en el oviducto común. La espermateca es una estructura delgada, pequeña de forma tubular, con la punta redondeada, mientras que su glándula es muy alargada, casi cuatro veces mayor que la espermateca. La *bursa copulatrix* es una estructura grande voluminosa y redondeada en la parte anterior, con un conducto grueso casi del mismo tamaño. La cámara genital es una estructura pequeña de forma redondeada a la que desembocan, en la parte dorsal anterior el oviducto común, en la parte dorsal media el conducto de la espermateca, que en su base es excesivamente ensanchado, y en la parte dorsal posterior el conducto de la *bursa copulatrix*. Lateralmente desembocan dos pares de glándulas accesorias, las tipo I de forma ovalada y las tipo II, más pequeñas de forma arriñonada que desembocan hacia la parte anterior de cada glándula tipo I.

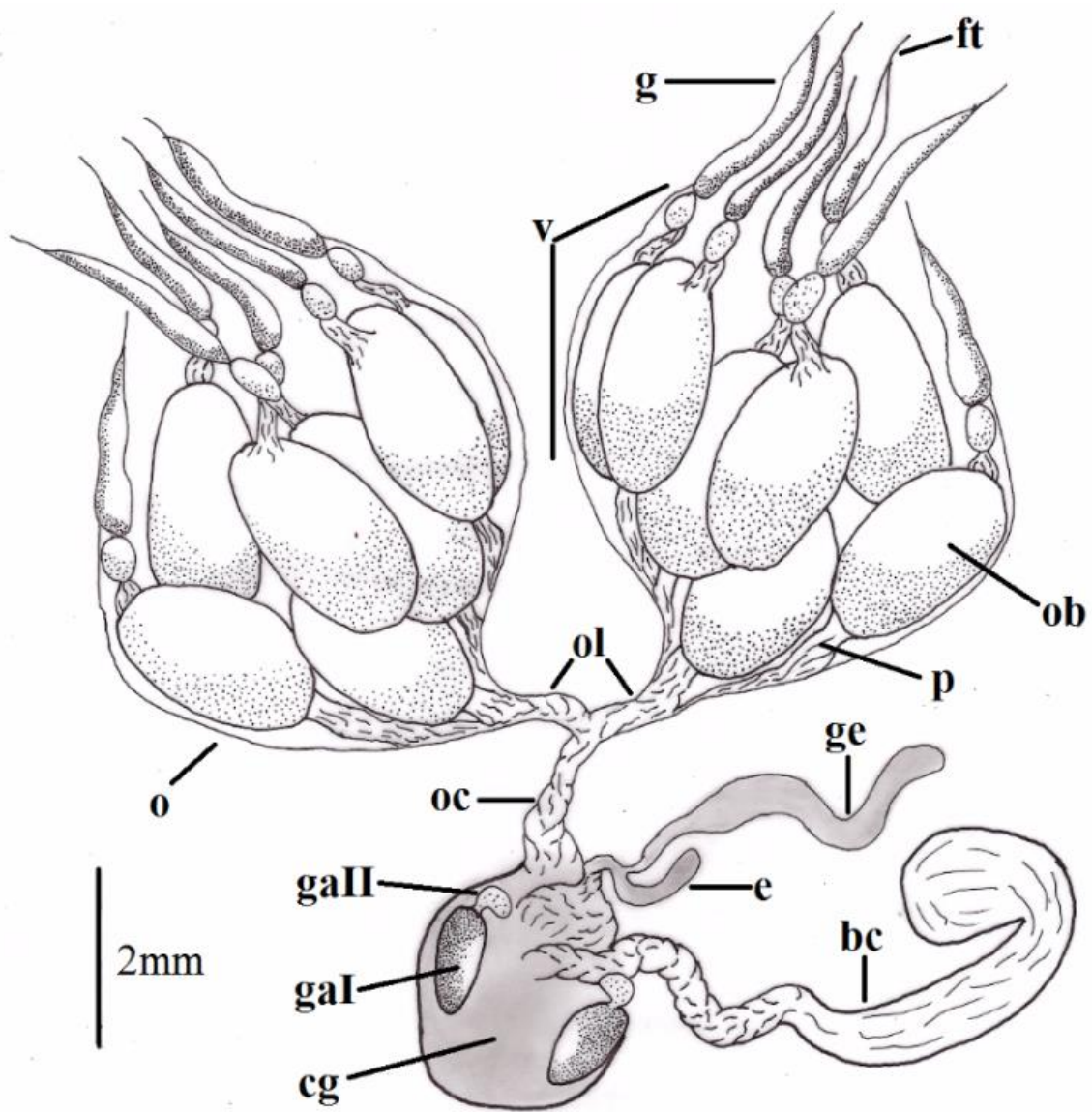


Figura 9. Esquema del aparato reproductor de *Phyllophaga vetula*. *bc*, bursa copulatrix; *ce*, conducto de la espermateca; *cg*, cámara genital; *e*, espermateca; *ft*, filamento terminal; *gal*, glándulas accesorias tipo I; *gall*, glándulas accesorias tipo II; *ge*, glándula de la espermateca; *g*, germen; *o*, ovario; *ob*, ovocito basal; *oc*, oviducto común; *ol*, oviducto lateral; *p*, pedicelo; *v*, vitelario.

7.2 Perfil químico de extractos corporales

7.2.1 Cámara genital

Fueron identificados veinte compuestos en la sección posterior de la cámara genital (Cuadro 1); entre estos se encuentran alcanos, derivados de alcanos, cetonas, alcoholes, compuestos azufrados, compuestos con silicio, un derivado halogenado y un compuesto alílico.

Cuadro 1. Compuestos químicos identificados por CG-EM de la sección posterior de la cámara genital de hembras de *Phyllophaga vetula*.

COMPUESTO	FORMULA	PESO MOLECULAR	CAS	TIPO DE COMPUESTO
2-metil-hexacosano	C27H56	380,7	1561-02-0	Alcano
2-metil-octacosano	C29H60	408,8	1560-98-1	Alcano
(E)-8-metil-tetradec-9-en-1-ilo acetato	C17H32O2	268,4		Cetona
2-metil-tetracosano	C25H52	352,7	1560-78-7	Alcano
3-metil-5-propilnonano	C13H28	184,36	31081-18-2	Alcano
2-bromo-dodecano	C12H25Br	249,23	13187-99-00	Derivado halogenado
Butil heptadecil sulfito	C21H44O3S	376,6		Derivado de azufre
2,2,8,8-tetrametil-3,7-dioxa-2,8-disilanonan-5-yl (9E,12E,15E)-octadeca-9,12,15-trienoato	C27H52O4Si2	496,9	ChemSpider ID 455595	
1-Heptatriacotanol	C37H76O	537	105794-58-9	Alcohol
Etil (E)-octadec-9-enoato	C20H40O2	310,5	6114-18-7	Ácido carboxílico
8-hexil-pentadecano	C21H44	296,57	13475-75-7	Alcano
7-metil-heptadecano	C18H38	254,5	20959-33-5	Alcano
Etil palmitate	C18H36O2	284,5	628-97-7	
2,6,10,15-tetrametil-heptadecano	C21H44	296,57	54833-48-6	Alcano
1-allylciclohexano-1,2-diol	C9H16O2	156,22		
Butil tetradecano-6-sulfonato	C18H38O3S	334,6		Derivado de azufre
Propil (E)-octadec-9-enoato	C21H40O2	324,5	111-59-1	Ácido carboxílico
Ácido hexadecanoico, propil éster	C19H38O2	298,5	2239-78-3	Ácido carboxílico

Propil (Z)-octadec-11-enoato	C21H40O2	324.5	1937-63-9	Ácido carboxílico
Estearato de propilo	C21H42O2	326.6	3634-92-2	

CAS (por sus siglas en inglés) = Número de servicio de resúmenes químicos

7.2.2 Glándulas accesorias tipo I

En total fueron extraídos e identificados veinticuatro compuestos (Cuadro 2), mismos que por su estructura son clasificados como alcanos, derivados de alcanos, ácidos carboxílicos, derivados halogenados, derivados de colesterol, alcoholes y cetonas.

Cuadro 2. Compuestos químicos identificados por CG-EM de las glándulas accesorias tipo I de hembras de *Phyllophaga vetula*.

COMPUESTO	FORMULA	PESO MOLECULAR	CAS	TIPO DE COMPUESTO
2-metil-tetracosano	C25H52	352,7	1560-78-7	Alcano
2-metiloctadecano	C19H40	268,5	1560-88-9	Alcano
2-metil-octacosano	C29H60	408,8	1560-98-1	Alcano
propil (Z)-octadec-11-enoato	C21H40O2	324,5	1937-63-9	
2-bromo-dodecano	C12H25Br	249,23	13187-99-00	Derivado halogenado
n-propil 11-octadecenoato	C21H40O2	324,5		Ácido carboxílico
1-monolinoleoilglicerol trimetilsilil éter	C27H54O4Si2	498,89	54284-45-6	
Heptasiloxano, hexadecametil	C16H48O6Si7	533,15	541-01-5	
Colesterol margarato	C44H78O2	639,1	24365-37-5	Derivado de colesterol
(E)-8-metiltetradec-9-en-1-ilo acetato	C17H32O2	268,4		Cetona
10-metil-eicosano	C21H44	296,6	54833-23-7	Alcano
2-metil-hexacosano	C27H56	380,7	1561-02-0	Alcano
1-Heptatriacotanol	C37H76O	537	105794-58-9	Alcohol
Hexadecametil-ciclooctaxiloxano	C16H48O8Si8	593,2	556-68-3	Alcano
9,12,15-ácido octadecatrienoico, 2-[(trimetilsilil)oxy]-1-[[[(trimetilsilil)oxi]metil] etil éster, (Z,Z,Z)-	C27H52O4Si2	496,9	PubChem 319300262	Ácido carboxílico

Acetato de (Z)-7-1-1 metiltetradecenilo	C17H32O2	268,4	1173190-48-1	Cetona
2,6,10,15-tetrametilheptadecano	C21H44	296,57	54833-48-6	Alcano
3-metil-5-propilnonano	C13H28	184	31081-18-2	Alcano
Ácido tereftálico, 4-octil éster	C24H37O4	389,5		
3,5,24-trimetiltetracontano	C43 H88	605,2	55162-61-3	Alcano
1,4-ácido benzenedicarboxílico, bis(2-etilhexil) éster	C24H38O4	390,6	6422-86-2	Alcano
Ácido sulfuroso butil heptadecil éster	C21H44O3S	376,6	Pub Chem CID 6420807	Derivado de azufre
(3Z,13Z)-2-metiloctadeca-3,13-dien-1-ol	C19H36O	280,5	ChemSpider ID4516567	
Etil docosanoato	C24H48O2	368,6	5908-87-2	

CAS (por sus siglas en inglés) = Número de servicio de resúmenes químicos

7.2.3 Glándulas accesorias tipo II

Se identificaron doce compuestos (Cuadro 3), que por su estructura son: alcanos, derivados de alcanos, ácidos carboxílicos, cetonas y alcoholes.

Cuadro 3. Compuestos químicos identificados por CG-EM de las glándulas accesorias tipo II de hembras de *Phyllophaga vetula*.

COMPUESTO	FORMULA	PESO MOLECULAR	CAS	TIPO DE COMPUESTO
2-metiloctadecano	C19H40	268,5	1560-88-9	Alcano
1-Monolinoleoilglicerol trimetilsilil éter	C27H54O4Si2	498,89	54284-45-6	
7-hexilicosano	C26H54	366,7	55333-99-8	Alcano
(E)-8-metiltetradec-9-en-1-ilo acetato	C17H32O2	268,4	PubChem CID: 5363273	Cetona
10-metil-eicosano	C21H44	296,6	54833-23-7	Alcano
1-heptatriacotanol	C37H76O	537	105794-58-9	Alcohol
2-metilhexacosano	C27H56	380,7	1561-02-0	Alcano

1-O-Linoleoil-2-o,3-O-bis(trimetilsilil)glicerol	C27H54O4Si2	498,89	54284-45-6	
2,6,10,15-tetrametilheptadecane	C21H44	296,57	54833-48-6	Alcano
(Z)-7-metiltetradec-1-en-1-ilo acetato	C17H32O2	268,4		Cetona
2,6,10-trimetiltetradecano	C17H36	240,5	14905-56-7	Alcano
Etil colato	C26H44O5	436,6	47676-48-2	

CAS (por sus siglas en inglés) = Número de servicio de resúmenes químicos

7.2.4 Abdomen

Se identificaron en total veintiún compuestos químicos (Cuadro 4); entre estos se encuentran alcanos, derivados de alcanos, colesterol, derivados de colesterol, alcoholes y compuestos con silicio.

Cuadro 4. Compuestos químicos identificados por CG-EM en el abdomen de hembras de *Phyllophaga vetula*.

COMPUESTO	FORMULA	PESO MOLECULAR	CAS	TIPO DE COMPUESTO
2-metil-hexacosano	C27H56	380,7	1561-02-0	Alcano
Etil iso-allocolato	C26H44O5	436,62	15073-99-1	
3,5,24-trimetiltetracontano	C43H88	605,2	55162-61-3	Alcano
2-metil-tetracosano	C25H52	352,7	1560-78-7	Alcano
Colesterol margarato	C44H78O2	639,1	24365-37-5	Derivado de colesterol
Colesta-4,6-dien-3-ol	C27H44O	384,64	14214-69-8	Derivado de colesterol
Colesterol	C27H46O	386,65	57-88-5	Colesterol
2-metil-octadecano	C19H40	268,5	1560-88-9	Alcano
Propil (E)-octadec-11-enoato	C21 H40O2	324,5	111-59-1	Ácido carboxílico
Estearato de propilo	C21H42O2	326,6	3634-92-2	
3,3,6,6-tetrametil-1,2,4,5 tetroxano	C6H12O4	148,2	1073-91-2	
2,6,10,15-tetrametilheptadecano	C21H44	296,6	54833-48-6	Alcano
Ácido hexadecanoico, propil éster	C19H38O2	298,5	2239-78-3	Ácido carboxílico
Etil (E)-octadec-9-enoato	C20H40O2	310,5	6114-18-7	Ácido carboxílico

Etil icosanoato	C22H44O2	340,6	18281-05-5	
Colest-22-ene-21-ol, 3,5-dehidro-6-metoxi-, pivalato	C33H54O3	498		Derivado de colesterol
3-etil-5-(2-etilbutil) octadecano	C26H54	366,7	55282-12-7	

CAS (por sus siglas en inglés) = Número de servicio de resúmenes químicos

Además de lo anterior se hizo una comparación de compuestos comunes y similares entre especies de *Phyllophaga* (Cuadro 5). Entre los compuestos comunes están el 10-metil-eicosano hallado en la cámara genital de *P. ravidia* y en ambas glándulas accesorias de *P. vetula*, colesterol y colest-4,6-dien-3-ol previamente identificados en la cámara genital de *P. ravidia* y en el abdomen de *P. vetula*. También se observan compuestos con estructura similar como el 7-metil-heptadecano y el 2-metil-heptadecano, incluyendo varios derivados de colesterol.

Cuadro 5. Comparación de compuestos identificados a partir de extractos corporales de hembras de *Phyllophaga*.

<i>P. vetula</i>	<i>P. ravidia</i> *	<i>P. opaca</i> *	<i>P. obsoleta</i> *
7-metil-heptadecano *	Ciclohexano, 1,1'- (2-tridecil-1,3-propanodiol) bis-	colest-4,6-dien-3-ol	Butilhidroxianisol
Colesterol margarato ^°	10-metil-eicosano	Colesterol	
10-metil-eicosano ^~	5-butil-hexadecano	Colesta-3,5-dien	
Colesterol margarato °	3-hexen-2-ona	2-metil-heptadecano	
Colesta-4,6-dien-3-ol °	3,3-dietil-azetidín-2,4-diona	Succinato de α-tocoferol	
Colesterol °	Tetrametil-oxirano	Acetato de 9,19-ciclolanost-24-en-3-ol	
Colest-22-ene-21-ol, 3,5-dehidro-6-metoxi-, pivalato °	3-metil-2-pentanona	Acetato de lup-20-en-3-ol	
	2-metoxi-2-metil-butano		

Clave de extractos en los que fueron identificados: (*) cámara genital, (^) glándulas accesorias tipo I, (~) glándulas accesorias tipo II, (°) abdomen.

CAS (por sus siglas en inglés) = Número de servicio de resúmenes químicos.

8. DISCUSIÓN

8.1 Anatomía del aparato reproductor

La morfología del aparato reproductor de las hembras de *P. vetula* cumple con el modelo general observado en otros Melolonthidae. Cada ovario posee seis ovariolas como en el caso de las hembras de los géneros *Costelytra*, *Hoplia*, *Phyllophaga*, *Plusiotis* y *Macroductylus* (Stringer, 1988; Carrillo-Ruiz *et al.*, 2006; Benítez-Herrera *et al.*, 2015; Martínez-M. y Morón, 2015; Pérez-Estrada *et al.*, 2020). La espermateca es una estructura pequeña y tubular en comparación con su glándula que es sumamente alargada; este es un patrón recurrente en las hembras de diferentes especies de *Phyllophaga* (Martínez-M. y Morón, 2015), aunque también se ha observado en las hembras de *Macroductylus mexicanus* Burmeister (Benítez-Herrera *et al.*, 2015).

La *bursa copulatrix* es una estructura grande, voluminosa y redondeada en la punta, con un conducto grueso y lleno de pliegues casi del mismo tamaño; esto es muy semejante a lo descrito para la especie *P. testaceipennis* (Martínez-M. y Morón., 2015). La morfología de las glándulas accesorias es similar a lo ya reportado para el género (Romero-López *et al.*, 2010, 2011), aunque difiere con las especies *P. latipes*, *P. opaca*, *P. pruinosa*, *P. setifera* y *P. subrugosa* en cuanto al número, ya que estas especies presentan solamente un par (Figura 4) (Martínez-M y Morón, 2015; Romero-López *et al.*, 2010). Por último, la cámara genital es una estructura pequeña y redondeada, igual a lo descrito en otras especies del mismo género.

Debido a la relación anatómica existente entre las glándulas accesorias tipo I y tipo II junto con la cámara genital, además de lo observado en el llamado sexual, es probable que en *P. vetula*, estas estructuras estén relacionadas con la producción y liberación de feromonas sexuales (Romero-López *et al.*, 2007; Fernández-Campos *et al.*, 2020), como en el caso de *P. obsoleta*, ya que dichas estructuras han sido relacionadas con la producción de componentes volátiles que pueden funcionar como atrayentes sexuales (Romero-López *et al.*, 2011).

8.2 Perfil químico

8.2.1 Cámara genital

De los veintiún compuestos químicos extraídos e identificados de la cámara genital de *P. vetula*, los alcanos 2-metil-hexacosano, 2-metil-octacosano y 2-metil-tetracosano han sido reportados como hidrocarburos cuticulares en otros grupos de coleópteros.

En esta especie aparece el 2-bromo-dodecano, reportado por primera vez para un insecto. Sin embargo, esta sustancia ha sido identificada como un compuesto volátil liberado por las rizobacterias *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas brassicacearum* y *Bacillus megaterium* (mVOC 2.0 Database), las cuales son clasificadas como estimuladoras del crecimiento de plantas como el tomate y la papa. Debido a lo anterior, podría sugerirse que quizá existan bacterias productoras y liberadoras de este compuesto en el interior de la cámara genital de las hembras de estos insectos, como en el caso de *P. obsoleta* (Rosete-Enríquez y Romero-López, 2017), *P. ravidia* (Pérez-Estrada *et al.*, 2020), *C. barrerae* y *C. lunulata* (Sánchez-Cruz *et al.*, 2020). Asimismo, es posible que estas bacterias sean adquiridas a través de la dieta en su etapa larvaria y que sean participes en la producción y liberación de feromonas sexuales.

Otros de los compuestos encontrados en el extracto de la cámara genital de *P. vetula*, corresponde a compuestos azufrados como el hexil pentadecil sulfito, butil heptadecil sulfito y butil tetradecano-6-sulfonato, mismos que se reportan por primera vez en un insecto. Aunque anteriormente a partir de un extracto de la cámara genital de *P. crinita* se identificó un derivado de azufre como componente de su feromona sexual (Robbins, 2003).

El alcano 7-metil-heptadecano previamente ha sido reportado como feromona sexual en hembras de lepidópteros del género *Lambdina* (Gries *et al.*, 1993, 1995; Maier *et al.*, 1998). Por otro lado, el etil palmitato fue identificado como parte de la feromona sexual del acaro *Varroa destructor* Anderson and Trueman (Ziegelmann *et al.*, 2013) y el etil (E)-octadec-9-enoato en configuración Z, en la mosca de la fruta *Bactrocera correcta* Bezzy.

Además, el 1-allylciclohexano-1,2-diol se reporta por primera vez en un insecto; sin embargo, existe un antecedente de un compuesto alílico como atrayente de coleópteros Melolonthidae, se trata del 4-Alil-2-metoxifenol (eugenol), que atrae a las especies *P. crinita*, *P. congrua*, *Cyclocephala lurida* Bland, *Maladera matrida* Argaman, *Phyllotocus navicularis* Blanchard y algunos Rutelinae como *Popillia japonica* Newman (Ben-Yahir *et al.*, 1995; Klein *et al.*, 1981).

8.2.2 Glándulas accesorias tipo I

De los veinticuatro compuestos químicos identificados en estas estructuras, tres de estos han sido reportados como componentes de la feromona sexual de algún insecto.

El 2-metiloctadecano, ha sido identificado como componente de la feromona sexual de hembras de *Euchaetes egle* (Lepidoptera: Erebidae) (Simmons *et al.*, 1998). El 1-heptatriacotanol fue reportado por primera vez en hembras *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) (El-Gashingy *et al.*, 2018). Por último, el alcano 10-metil-eicosano previamente fue identificado en hembras de *P. ravidia* y reportado por primera vez como posible componente de la feromona sexual (Romero-López *et al.*, 2019), por lo que podría considerarse como posible componente de la feromona sexual de *P. vetula*.

Entre los demás compuestos, algunos alcanos han sido identificados como hidrocarburos cuticulares de escarabajos, tal es el caso de 2-metil-tetracosano y el 2-metil-octadecano encontrado en hembras de *Gastrophysa atrocyanea* Motschulsky (Coleoptera: Chrysomelidae) (Sugeno *et al.*, 2006) y el 2-metil-hexacosano reportado como hidrocarburo cuticular de hembras y machos de *Xylotrechus colonus* (Coleoptera: Cerambycidae) (Ginzel *et al.*, 2003).

Al igual que en el extracto de la cámara genital, el 2-bromo-dodecano fue identificado en las glándulas accesorias tipo I de *P. vetula*, lo cual apunta nuevamente a la teoría de la posible presencia de bacterias productoras y liberadoras de este compuesto asociadas a las glándulas accesorias como se ha

encontrado en otras especies de Melolonthidae (Hoyt *et al.*, 1971; Marshall *et al.*, 2016; Rosete-Enriquez y Romero-López, 2017; Pérez-Estrada *et al.*, 2020; Sánchez-Cruz *et al.*, 2020).

8.2.3 Glándulas accesorias tipo II

De los extractos de estas glándulas, se identificaron doce compuestos químicos, de los cuales algunos coinciden con lo encontrado en las glándulas accesorias tipo I, lo cual puede ser porque anatómicamente se encuentran interconectadas.

Entre los compuestos comunes y que han sido reportados anteriormente en insectos y como feromonas o posibles componentes de alguna feromona sexual están los alcanos: 2-metil octadecano y 10-metil-eicosano, el hidrocarburo cuticular 2-metilhexacosano y finalmente el 1-heptatriacotanol. Además de los compuestos extraídos, se reportan por primera vez los alcanos 7-hexilicosano, 2,6,10,15-tetrametilheptadecano y 2,6,10-trimetiltetradecano; ésteres de acetato: (E)-8-metiltetradec-9-en-1-il acetato y (Z)-7-metiltetradec-1-en-1-il acetato.

8.2.4 Abdomen

De los compuestos químicos del extracto de esta región corporal, se identificaron colesterol y derivados de colesterol. Recientemente el colesterol fue identificado en la cámara genital de *P. opaca*, al igual que el derivado de colesterol, cholesta-4,6-dien-3 α -ol. La aparición de estos compuestos en el abdomen de las hembras de *P. vetula* podría sugerir la participación de algún epitelio glándular o poro cuticular liberador de feromonas sexuales como en el caso de especies de la subfamilia Rutelinae (Tada y Leal, 1997).

También se encontraron hidrocarburos cuticulares como el 2-metilhexacosano y el 2-metil-tetracosano, cuya función podría ser evitar la desecación o incluso funcionar como atrayente sexual, y el alcano 2-metil-octadecano,

previamente identificado como componente de la feromona sexual de lepidópteros (Simmons *et al.*, 1998).

Debido se identificaron compuestos comunes o con estructura similar a los que previamente ya han sido reportados como componentes de la feromona sexual de algún Melolonthidae, se propone que para *P. vetula* quizá tengan la misma función. Sin embargo aún es necesario profundizar más al respecto e investigar cuál es el sitio donde se producen y liberan estos compuestos. Ya que, aunque se encontraron compuestos que han sido reportados para otras especies de *Phyllophaga*, como *P. ravida* y *P. opaca*, existe “diferencia” en cuanto a las estructuras corporales de las que fueron identificados. Lo anterior puede deberse a que en los estudios con los que se hizo la comparación no se realizó la separación de cada estructura (cámara genital y glándulas accesorias) como se hizo en este trabajo, o porque efectivamente estos compuestos están siendo producidos y liberados por diferentes estructuras.

Además de lo anterior, una única investigación realizada para el género *Phyllophaga* concluye que ciertas especies relacionadas filogenéticamente suelen ser atraídas por el mismo compuesto químico (Zaragoza *et al.*, 2017), por lo que la similitud de los compuestos encontrados y la semejanza de algunos de ellos en cuanto a su grupo funcional podría servir como característica taxonómica del grupo.

Por otro lado, la mayor parte de los trabajos existentes que implican aspectos relacionados con quimiotaxonomía basada en el uso de feromonas sexuales de insectos se restringen principalmente a lepidópteros, donde ya se ha demostrado la utilidad de estos compuestos como carácter taxonómico para resolver la filogenia del grupo (Newcomb y Gleeson, 1998).

Entre los estudios que se han realizado en coleópteros está uno efectuado en la familia Geotrupidae (Niogret *et al.*, 2019). estos autores emplearon caracteres químicos (compuestos cuticulares) y moleculares para generar y comparar las filogenias de estos coleópteros. En este caso se confirma la eficacia del uso de

caracteres químicos como herramienta de diagnóstico para la separación de especies donde el uso de caracteres morfológicos resulta insuficiente debido a la gran similitud entre especies. Además estos autores proponen el uso de caracteres químicos, específicamente compuestos cuticulares como complemento o alternativa “simplificada” y menos costosa en comparación con las técnicas moleculares actuales.

Otro ejemplo es el del género *Alphitobius* (Coleoptera: Tenebrionidae) (Elshaier *et al.*, 2015), en el que a través de la comparación de los hidrocarburos cuticulares identificados por especie, también se confirma la utilidad del uso de compuestos químicos como herramienta taxonómica, ya que según el autor pueden servir como “huellas dactilares” y representan un fenotipo único y específico para cada especie.

Por otro lado, la elucidación de los compuestos químicos presentes en los extractos corporales de las hembras de *P. vetula* genera un avance para la identificación de la feromona sexual de esta especie. Por lo que, a mediano plazo esto podría ser utilizado para establecer una estrategia de conservación para el monitoreo de especies, o para una estrategia de manejo de especies consideradas plaga. En ambos casos, el conocimiento sobre aspectos de la comunicación química de los insectos puede ser aprovechado para su seguimiento y control mediante cebos y trampas. Un ejemplo es el uso de señuelos con feromonas, los cuales confunden al insecto e interrumpen su potencial de apareamiento y, por lo tanto, reducen su descendencia. Esta técnica usada junto con otras, también pueden ser útiles para atraer, atrapar o matar plagas, lo que tendría un impacto positivo en el ambiente, ya que se evitaría el uso de insecticidas sintéticos (Romero-López, 2016; Leal, 2017).

Además de lo anterior, la información obtenida en este trabajo en conjunto con lo que ya se conoce sobre los componentes químicos de las feromonas sexuales de otras especies del género *Phyllophaga* podría funcionar como característica taxonómica que junto con caracteres morfológicos, de comportamiento y la amplificación de genes como el gen mitocondrial citocromo oxidasa 1 (MIT-

CO1), podrían servir para esclarecer aspectos relacionados con la filogenia del grupo.

9. CONCLUSIONES

- La anatomía del aparato reproductor de *P. vetula* es similar a lo observado en otras especies del género *Phyllophaga*.
- Los principales compuestos encontrados en los extractos de las estructuras corporales e identificados por CG-EM, corresponden a alcanos, derivados de alcanos, ácidos carboxílicos, derivados de colesterol, cetonas y alcoholes.
- En la cámara genital, los compuestos con mayor abundancia fueron 2-metil-hexacosano, 2-metil-octacosano, (E)-8-metil-tetradec-9-en-1-ilo acetato, 2-metil-tetracosano, 3-metil-5-propilnonano y 2-bromo-dodecano.
- En las glándulas accesorias tipo I, los compuestos con mayor abundancia fueron 2-metil-tetracosano, 2-metil-octadecano, 2-metil-octacosano, propil (Z)-octadec-11-enoato y 2-bromo-dodecano.
- En las glándulas accesorias tipo II, los compuestos con mayor abundancia fueron 2-metil-octadecano, 1-monolinoleoilglicerol trimetilsilil éter, 7-hexilicosano, (E)-8-metiltetradecenilo 9-1 acetato y 10-metil-eicosano.
- En , los compuestos más abundantes fueron 2-metil-hexacosano, etil iso-allocolato, 3, 5, 24-trimetiltetracontano, 2-metil-tetracosano y colesterol margarato.
- En *P. vetula* se encontraron compuestos que previamente ya han sido identificados como componentes o posibles componentes de la feromona sexual de otras especies de Melolonthidae, por lo que en este caso podrían tener la misma función.

11. LITERATURA CITADA

Aragón-García, A., Morón, M.Á., López-Olguín, J.F. y Cervantes-Peredo, L.M. (2005). Ciclo de vida y conducta de adultos de cinco especies de *Phyllophaga*

- Harris, 1827 (Coleoptera: Melolonthidae; Melolonthinae). *Acta Zoológica Mexicana*, 87-99.
- Bárcenas-Villalobos, A.G. (2018). Taxonomía integrativa de especies de *Paranomala* y *Cyclocephala* (Coleoptera: Melolonthidae). Tesis de licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 70 p.
- Benítez-Herrera, L.N., Martínez-M., I. y Romero-López, A.A. (2015). Anatomía del aparato reproductor de *Macroductylus mexicanus* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae) y su posible participación en su comunicación química sexual. *Southwestern Entomologist*, 40(1): 189-198.
- Blanco-Metzler, H. (2004). Las feromonas y sus usos en el manejo integrado de plagas. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 112-118.
- Carrillo-Ruiz, H., I. Martínez-M., I. and Morón, M.Á. 2008. Comparative study of the reproductive system of two species of *Hoplia* (Coleoptera: Scarabaeidae: Hopliinae). *Proceedings Entomological Society of Washington*, 110: 778-788.
- Cherman, M.A., y Morón, M.Á. (2014). Validación de la familia Melolonthidae Leach, 1819 (Coleoptera: Scarabaeoidea). *Acta Zoológica Mexicana*, 30(1): 201-220.
- Cortez, V. (2013). Ecología química y perspectivas de su aplicación en la conservación de la biodiversidad. *Cuadernos de Biodiversidad*, 41: 16-21.
- Cristóvão, J. P., and Vaz-De-Mello, F. Z. (2020). The terminalia of the superfamily Scarabaeoidea (Coleoptera): specific glossary, dissecting methodology, techniques and previously unrecorded sexual dimorphism in some difficult groups. *Zoological Journal of the Linnean Society*.
- Ben-Yahir, D., Bazar, A., Chen, M. (1995). Attraction of *Maladera matrida* (Coleoptera: Scarabaeidae) to Eugenol and Other Lures. *Journal of Economic Entomology*. Volume 88: 415-420.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85: 407-415.

- Dicke, M. and Sabelis, M. (1988). Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds. *Functional Ecology*, 2:131-139.
- El-Gashingy, D. H., Naiem, E. S. A., Abou Seada, M. R., and Seif, A. I. (2018). Age-related changes in the chemical composition of female pheromone glands of the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *The Egyptian Journal of Experimental Biology (Zoology)*, 14(1), 1-9.
- Elshaier, M. E., Galhoum, A. M. M., Elshewy, D. A., and Elmetwaly, N. E. Cuticular Hydrocarbons as Chemotaxonomic Character for Two Species of Genus *Alphitobius* Stephens (Coleoptera: Tenebrionidae) in Egypt. *International Journal of Science and Research*. ISSN (Online): 2319-7064.
- Fernández-Campos, A.N., Martínez-M., I., y Romero-López, A.A. (2020). Descripción del aparato reproductor de hembras de *Phyllophaga vetula* Horn, 1887 (Coleoptera: Melolonthidae) y de las estructuras relacionadas con el “llamado sexual”. *Entomología mexicana*. Vol. 7:481-486. ISSN: 2448-475X
- Ganesh, M., and Mohankumar, M. (2017). Extraction and identification of bioactive components in *Sida cordata* (Burm.f.) using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of food science and technology*, 54(10), 3082–3091. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2744-z>
- García-Canales, S.C., y Romero-López, A.A. (2015). Respuesta de machos *Macrodactylus mexicanos* Burmeister (Coleoptera: Melolonthidae) en pruebas de olfatómetro y extracción de compuestos con posibles implicaciones químico-ecológicas. *Entomología mexicana*: 443-449.
- Ginzel, M.D., Blomquist, G.J., Millar, J.G., and Hanks, L.M. (2003). Role of contact pheromones in mate recognition in *Xylotrechus colonus*. *Journal of Chemical Ecology*. 29:533-545.
- Gries, R., Gries, G., Li, J.-X., Maier, C.T., Lemmon, C.R., and Slessor, K.N. (1994). Sex pheromone components of the spring hemlock looper, *Lambdina*

- athasaria* (Walker) (Lepidoptera: Geometridae). *Journal of Chemical Ecology*. 20:2501-2511.
- Gries, G., Gries, R., Krannitz, S.H., Li, J.-X., King, G.G.S., Slessor, K.N., Borden, J.H., Bowers, W.W., West, R.J., and Underhill, E.W. (1993). Sex pheromone of the western hemlock looper, *Lambdina fiscellaria lugubrosa* (Hulst) (Lepidoptera: Geometridae). *Journal of Chemical Ecology*. 19:1009-1019.
- Hoyt, C.P., Osborne, G.O., and Mulcock, A.P. (1971). Production of an insect sex attractant by symbiotic bacteria. *Nature*, 230: 472-473.
- Kim, J.Y. and Leal, W.S. 1999. Eversible pheromone glands in a melolonthidae beetle, *Holotrichia parallela*. *Journal of Chemical Ecology*, 25(4): 825-833.
- Klein, M.G., Tumlinson, J.H., Ladd, T.L. Jr., Doolittle, R.E. (1981) Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) Response to synthetic sex attractant plus phenethyl propionate: Eugenol. *Journal of Chemical Ecology*. DOI: 10.1007/BF00988630. PMID: 24420422.
- Leal, W.S. (1998). Chemical ecology of phytophagous scarab beetles. *Annual Review of Entomology*, 43: 39-61.
- Maier, C.T., Gries, R., and Gries G. 1998. Sex pheromone components of pitch pine looper, *Lambdina pellucidaria*. *Journal of Chemical Ecology*. 24:491-500.
- Malosse, C., Ramirez-Lucas, P., Rochat, D., and Morin, J. P. (1995). Solid-phase microextraction, an alternative method for the study of airborne insect pheromones (*Metamasius hemipterus*, Coleoptera, Curculionidae). *Journal of High Resolution Chromatography*. 669-670.
- Marshall, D., Unelius, C., Jackson, T., Wee, S., Young, S., Townsend, R. J., and Suckling, D. M. (2016). *Morganella morganii* bacteria produces phenol as the sex pheromone of the New Zealand grass grub from tyrosine in the colleterial gland. *The Science of Nature*, 103(7-8): 59.

- Martínez-M., I. (2002). Técnicas básicas de anatomía microscópica y de morfometría para estudiar los insectos. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 30: 187-195.
- Martínez-M., I. y Morón, M.Á. (2015). Los sistemas reproductivos en hembras de Melolonthinae, Rutelinae y Dynastinae (Coleoptera: Scarabaeoidea, Melolonthidae). *Southwestern Entomologist*, 40(2): 369-386.
- Morón, M.Á. (1986). El género *Phyllophaga* en México. Morfología, distribución y sistemática supraespecífica (Insecta: Coleoptera). México: Instituto de Ecología.
- Morón, M.Á., Nogueira, G., Rojas-Gómez, C.V., y Arce-Pérez, R. (2014). Biodiversidad de Melolonthidae (Coleoptera) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, (85): 298-302.
- Morón, M. Á., Ratcliffe, B. C., y Deloya, C. (1997). Atlas de los escarabajos de México. Xalapa, Veracruz, México: *Sociedad Mexicana de Entomología*.
- Newcomb, R. D. and Gleeson, D. M. (1998). Pheromone evolution within the genera *Ctenopseustis* and *Planotortrix* (Lepidoptera: Tortricidae) inferred from a phylogeny based on cytochrome oxidase I gene variation. *Biochemical Systematics and Ecology*, 26(5), 473-484.
- Niogret, J., Felix, A. E., Nicot, A., and Lumaret, J. P. (2019). Chemosystematics Using Cuticular Compounds: A Powerful Tool to Separate Species in Mediterranean Dung Beetles (Coleoptera: Geotrupidae). *Journal of Insect Science*, 19(2), 18.
- Pérez-Estrada, F.J. (2016). Búsqueda de bacterias en el aparato reproductor de *Phyllophaga ravid*a (Coleoptera: Melolonthidae), desde un enfoque químico-ecológico. Tesis de licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 46 p.
- Pérez-Estrada, F.J., Rosete-Enríquez, M., Trujillo-Vélez, M.R. y Romero-López, A.A. (2020). Aparato reproductor de hembras de *Phyllophaga ravid*a

- Blanchard, 1850 (Coleoptera:Melolonthidae) asociado con colonias bacterianas. *Entomología mexicana*. Vol. 7:487-493. ISSN: 2448-475X
- Robbins, P.S., Crocker, R.L., Nojima, S., Morris, B.D., Roelofs, W.L., and Villani, M.G. (2003). Metil 2-(metilthio) benzoate: the unique sulfur-containing sex pheromone of *Phyllophaga crinita*. *Naturwissenschaften*, 90(11), 517-520.
- Robbins, P.S., Nojima, S., Polavarapu, S., Koppenhöfer, A.M., Rodriguez-Saona, C., Holdcraft, R. J., Consolie, N. H., Peck, D. C. and Roelofs, W. L. (2009) Sex pheromone of the scarab beetle *Phyllophaga* (*Phytalus*) *georgiana* (Horn). *Journal of Chemical Ecology*, 35: 336-341.
- Romero-López, A.A. (2012). Uso de feromonas sexuales para el conocimiento y manejo de los ensambles "gallina ciega" en México. *Interciencia*, 37: 559-564.
- Romero-López, A.A. (2016). Comunicación química de coleópteros Melolonthidae distribuidos en México: a una década de distancia. *Dugesiana*, 23(1), 59-73.
- Romero-López, A.A. y Arzuffi, R. (2010) Evidencias sobre la producción y liberación de compuestos bioactivos de la feromona sexual de un melolóntido mexicano. En: Rodríguez del Bosque, L.A. y Morón, M.A. (Eds.) *Ecología y Control de Plagas Edafícolas*. INECOL. Xalapa, México. pp. 204-222.
- Romero-López, A.A., Arzuffi, R. y Morón, M.Á. (2005). Feromonas y atrayentes sexuales de coleópteros Melolonthidae de importancia Agrícola. *Folia Entomológica Mexicana*, 44(2): 233-245.
- Romero-López, A.A., Aragón, A. y Arzuffi, R. (2007). Estudio comparativo del comportamiento sexual de cuatro especies de *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae). En: E. G. Estrada, A. Equihua, C. Luna y J. L. Rosas-Acevedo (Eds.) *Entomología mexicana*. Vol. 6. Publicación especial de la Sociedad Mexicana de Entomología. México. pp. 275- 281.
- Romero-López, A.A., Martínez-M., I. and Morón, M.A. (2010). Morphology of the genital chamber and accessory glands of *Phyllophaga opaca* Moser

(Coleoptera: Scaraboidea: Melolonthidae) females. *World Journal of Zoology*, 5 (3): 210-216.

Romero-López, A.A., Arzuffi, R., Valdez, J., Sánchez-Espíndola, E. and Morón, M. A. (2011). Tissues involved in sex pheromone production in *Phyllophaga obsoleta* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 104(5): 960-965.

Romero-López, A.A., Lugo-García, G.A. y Yanes-Gómez, G. (2016). Esquema de liberación y recepción de infoquímicos en dos “melolontidos” (Coleoptera: Melolonthidae) de Sinaloa, México. En: Diversidad, ecología y Manejo de plagas edafícolas. Lugo-García, G.A., A. Aragón y A. Reyes-Olivas (Eds.). La UAS y La BUAP, México. pp. 117-133.

Romero-López, A.A., Reyes-Chilpa, R., Pérez-Flores, F.J., Lugo-García, G.A. and Maldonado-Rodríguez, J.I. (2019). Chemicals in the genital chamber of two Mexican species of *Phyllophaga*. *Southwestern Entomologist*, 44(2): 457-464 (in press).

Rubio-Gómez, J. D., Bustillo-Pardey, Á. E., Vallejo-Espinosa, L. F., Benavides-Machado, P. y Acuña-Zornosa, J. R. (2007). Morfología del sistema reproductivo femenino y masculino de *Hypothenemus hampei* (Ferrari). *Cenicafé*, 58(1):75-81.

Ruther, J., Reinecke, A., Tolasch, T., and Hilker, M. (2002). Phenol - Another cockchafer attractant shared by *Melolontha hippocastani* Fabr. and *M. melolontha* L. *Z. Naturforsch.* 57: 910-913.

Salgado-Farias, F. (2019). Revisión de un “ensamble gallina ciega” (Coleoptera: Melolonthidae) desde un enfoque de la taxonomía integrativa. *Tesis de licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*.

Sánchez-Cruz, A. (2017). Identificación de microorganismos con potencial químico-ecológico residentes del aparato reproductor de hembras y machos de *Cyclocephala lunulata* (Coleoptera: Melolonthidae). *Tesis de licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*. 89 p.

- Sanchez-Cruz, A., Robledo, N., Rosete-Enríquez, M., and Romero-López, A. A. (2020). Attraction of adults of *Cyclocephala lunulata* and *Cyclocephala barrerai* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae) towards bacteria volatiles isolated from their genital chambers. *Molecules* 25(19): 4430. <https://doi.org/10.3390/molecules25194430>
- Sreejith, P.E., Linu, N.K., Sasikumar, P., Radhakrishanan, K.V., and Sabu, M. (2016). Phytochemical studies of an endemic and critically endangered hill banana, *Musa acuminata* Colla (AA) 'Karivazhai' fruit by GC-MS. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 8(5):164-168
- Stringer, I.A.N. (1988). The female reproductive system of *Costelytra zealandica* (White) (Coleoptera: Scarabaeidae: Melolonthinae). *New Zealand Journal of Zoology*, 17(3): 323-339.
- Sugeno, W., Hori, M., and Matsuda, K. (2006). Identification of the contact sex pheromone of *Gastrophysa atrocyanea* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Applied entomology and zoology*. 42(2), 269-276.
- Tada, S., and Leal, W. S. (1997). Localization and morphology of sex pheromone glands in scarab beetles. *Journal of Chemical Ecology*, 23: 903-915.
- Trujillo-Vélez, M.R. (2015). Localización de sitios productores de infoquímicos en *Macrodactylus nigripes* (Coleoptera: Melolonthidae): evidencia morfológica y microbiológica. *Tesis de licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*. 64 p.
- Zaragoza-Ortega, M., Segura-León, O.L., Hernández-Cruz, J., Valdez-Carrasco, J. and Sánchez-Soto, S. (2017). The response of *Phyllophaga brevidens* and *Phyllophaga lenis* (Coleoptera: Scarabaeidae) to metil 2-(metilthio) benzoate and light. *Florida Entomologist*, 100(3): 546-550
- Zarbin, P. H., Leal, W. S., Ávila, C. J., and Oliveira, L. J. (2007). Identification of the sex pheromone of *Phyllophaga cuyabana* (Coleoptera: Melolonthidae). *Tetrahedron Letters* 48.1991–1992.

Ziegelmann, B., Tolasch, T., Steidle, J. L., and Rosenkranz, P. (2013). The mating behavior of *Varroa destructor* is triggered by a female sex pheromone. Part 2: Identification and dose-dependent effects of components of the *Varroa* sex pheromone. *Apidologie*, 44(4), 481-490.

12. ANEXO

EXTRACCIÓN DEL APARATO REPRODUCTOR

Reactivos utilizados

Acetato de etilo

Ringer:	
Cloruro de sodio	0.5 g
Cloruro de potasio	0.25 g
Cloruro de calcio	0.30 g
Bicarbonato de sodio	0.20 g
Agua destilada	1000 ml

Procedimiento

Previo a la disección, los insectos deben ser sacrificados por cámara letal con acetato de etilo. Una vez sacrificados, se retira el primer par de alas (élitros) y el segundo par (alas membranosas). Posterior a esto, se retira la capa de terguitos abdominales, dejando visible el interior del insecto, para después separar las traqueolas, túbulos de Malpighi y tubo digestivo, con el fin de dejar visible el aparato reproductor. Después se limpia y se retira del interior del insecto. Durante la disección, se utiliza solución Ringer para evitar la deshidratación de los tejidos.

FIJACIÓN CON AFATD

Reactivos utilizados

AFATD:	
Alcohol de 96°	75 ml
Formaldehído	10 ml
Ácido acético	5 ml
Dimetilsulfóxido	10 ml
Ácido tricloracético	1 g

Procedimiento

Una vez extraído el aparato reproductor, se coloca en un líquido fijador para conservar los tejidos. La duración de la fijación es de 1 a 2 h; el tiempo óptimo es de 2 h, siempre y cuando la pieza no pase de un tamaño de 3 mm. Al término de la

fijación, la pieza se lava en alcohol de 96° donde se puede guardar varios días o algunas semanas.

TINCIÓN CON NEGRO DE CLORAZOL

Reactivos utilizados

Negro de clorazol:

Potasa:

Hidróxido de potasio	10 g
Agua destilada	100 ml

Solución de negro de clorazol:

Negro de clorazol	1 g
Alcohol al 70°	100 ml

Procedimiento

Ya que esta técnica se utiliza para teñir estructuras cuticulares, el primer paso es retirar los ovarios realizando un corte en el oviducto común. Posterior a esto, se macera la pieza en una solución de potasa y se lava, tiñe, deshidrata, transparenta y guarda en algún líquido conservador o en su defecto, se monta en bálsamo de Canadá.

Se coloca la estructura en una solución de hidróxido de potasio al 10%, misma que se puede calentar para acelerar el proceso. Después, la pieza se lava con abundante agua destilada para detener la maceración, Posteriormente, se despigmenta durante 15 min utilizando peróxido de hidrogeno de 30 volúmenes, más unas gotas de hidróxido de amonio hasta que la cutícula se blanquee. Las piezas se lavan con agua destilada y se colocan en lactofenol o alcohol bencílico con unas gotas de solución de negro de clorazol y se dejan ahí hasta que tomen la coloración

deseada. Finalmente, se efectúan dos cambios en alcohol de 96° y tres cambios de tolueno de 10 min cada uno, para que las piezas se almacenen en lactofenol o se monten con bálsamo de Canadá.

TINCIÓN CON VERDE LUZ

Reactivos utilizados:

Verde luz	0.01 g
Agua destilada	100 ml

Después del fijado la pieza se hidrata; para ello, el aparato reproductor guardado en alcohol de 96° se pasa a alcohol de 70° durante 5 min y a agua destilada, de 5 a 10 min. Se coloca en solución de verde luz durante 1 min y se deshidrata pasando por dos cambios de alcohol en 96° para evitar que el colorante se diluya completamente en el alcohol. Después, se efectúan dos cambios de 10 min cada uno en alcohol absoluto y dos cambios de 10 min en tolueno.