



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**TAXONOMÍA INTEGRATIVA DE ESPECIES DE  
*Paranomala* Y *Cyclocephala* (COLEOPTERA:  
MELOLONTHIDAE)**

Tesis que para obtener el título de  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

**PRESENTA:**

**Alma Gabriela Barcenas Villalobos**

DIRECTORA: María Rosete Enríquez

CO-DIRECTOR: Angel Alonso Romero López



MAYO, 2018

# Índice General

Índice General.....	I
Índice de Cuadros.....	II
Índice de Figuras.....	III
Abreviaturas.....	IV
1.- Resumen.....	1
2.- Introducción.....	2
3.- Antecedentes.....	3
3.1.- Aspectos históricos de la Sistemática y la taxonomía.....	3
3.2.- Taxonomía integrativa.....	4
3.3.- Código de barras en insectos.....	9
3.4.- Generalidades de los integrantes de la familia Melolonthidae.....	12
3.4.1.- Ciclo de vida.....	13
3.4.2.- Características morfológicas corporales, distribución y hábitos.....	14
3.5.- Características morfológicas externas distintivas de especies de los géneros de <i>Paranomala</i> y <i>Cyclocephala</i> , empleadas como modelos de estudio.....	18
3.6.1.- <i>Paranomala</i> .....	18
<i>Paranomala hoepfneri</i> Bates.....	18
<i>Paranomala semicincta</i> Bates.....	19
3.6.2.- <i>Cyclocephala</i> .....	19
<i>Cyclocephala barrerae</i> Martínez.....	19
<i>Cyclocephala lunulata</i> Burmeister.....	20
4.- Justificación.....	20
5.- Hipótesis.....	21
6.- Objetivos.....	21
6.1.- General.....	21
6.2.- Particulares.....	21
7.- Metodología.....	22
7.1.- Área de estudio.....	22
7.2.- Recolección y revisión de caracteres morfológicos de adultos.....	23
7.2.1.- Preparación de <i>vouchers</i> morfológicos.....	23
7.3.- Preparación de <i>vouchers</i> moleculares.....	25
7.3.1.- Purificación del ADN genómico.....	25
7.3.2.- Amplificación del gen MT-COI con iniciadores universales.....	26
7.3.3.- Obtención del código de barras de ADN y análisis de secuencias del gen MT-COI.....	26
8.- Resultados.....	28
8.1.- Revisión de caracteres morfológicos de adultos.....	28
8.2.- Estudio taxonómico con caracteres moleculares.....	32
8.3.- Registro de secuencias del gen MT-COI.....	35
8.4.- Análisis de secuencias del gen MT-COI.....	49
9.- Discusión.....	52
10. Conclusiones.....	56
11.- Literatura citada.....	57

## Índice de Cuadros

**Cuadro 1.-** Índice de similitud de las secuencias obtenidas del gen mitocondrial MT-COI

**Cuadro 2.-** BIN's de especies registradas

**Cuadro 3.-** Especímenes *vouchers* de *Paranomala hoepfneri*

**Cuadro 4. -** Especímenes *vouchers* de *Paranomala semicineta*

**Cuadro 5.-** Especímenes *vouchers* de *Cyclocephala barrerae*

**Cuadro 6.-** Especímenes *vouchers* de *Cyclocephala lunulata*

**Cuadro 7.-** Distancias genéticas por pares de las secuencias registradas en BOLD Systems y especies externas.

## Índice de Figuras

**Figura 1.-** Representación esquemática de la taxonomía integrativa

**Figura 2.-** Ciclo de vida de coleópteros Melolonthidae

**Figura 3.-** Especies representantes de la familia Melolonthidae

**Figura 4.-** Esquema representativo de caracteres presentes en Melolonthidae

**Figura 5.-** Mapa del sitio de colecta

**Figura 6.-** Imagen representativa de un adulto macho considerado en el presente estudio como *Paranomala hoepfneri* y de estructuras diagnósticas a nivel de especie

**Figura 7.-** Imagen representativa de un adulto macho considerado en el presente estudio como *Paranomala semicincta* y de estructuras diagnósticas a nivel de especie

**Figura 8.-** Imagen representativa de un adulto macho considerado en el presente estudio como *Cyclocephala barrerai* y de estructuras diagnósticas a nivel de especie

**Figura 9.-** Imagen representativa de un adulto macho considerado en el presente estudio como *Cyclocephala lunulata* y de estructuras diagnósticas a nivel de especie

**Figura 10.-** Dendograma construido a partir de las secuencias parciales del gen MT-COI de los adultos empleados como modelo de estudio, junto con las de otros taxa de Melolonthidae ya registradas con anterioridad

## Abreviaturas

**μL:** microlitros

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ADNmt:** ácido desoxirribonucleico mitocondrial

**ARNr:** ácido ribonucleico ribosomal

**BIN:** número de índice de código de barras

**BLAST:** Basic Local Alignment Search Tool

**°C:** grados Celsius

**COI:** citocromo oxidasa I

**cm:** centímetros

**DO:** densidad óptica

**GenBank:** base de datos de secuencias genéticas del NIH

**h:** horas

**LED:** iluminación de un diodo emisor de luz

**ml:** mililitros

**mm:** milímetros

**MT-COI:** gen mitocondrial de la citocromo oxidasa I

**mV:** milivoltios

**NCBI:** National Center for Biotechnology Information

**ng:** nanogramos

**nm:** nanómetros

**NOM-059:** Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2015

**pb:** pares de bases

**PCR:** Reacción de en Cadena de la Polimerasa

**rpm:** revoluciones por minuto

**sp:** especie

**TAE:** tris, ácido acético glacial y EDTA

## 1.- Resumen

La taxonomía integrativa se caracteriza por el uso simultáneo de diferentes tipos de caracteres para delimitar las unidades de diversidad de vida a partir de perspectivas múltiples y complementarias que incluyen filogeografía, morfología comparada, genética de poblaciones, ecología, desarrollo, comportamiento y aspectos moleculares. Debido a que los insectos y en particular, los coleópteros, son los animales que poseen la mayor parte de la riqueza de especies de nuestro planeta, es necesaria la correcta identificación y delimitación de estas mediante el uso sinérgico de herramientas de la taxonomía integrativa. Por ello, el presente trabajo tuvo como objetivo identificar cuatro especies de coleópteros de la familia Melolonthidae residentes de áreas verdes de CU de la BUAP, mediante el uso de caracteres morfológicos y moleculares. Se utilizaron claves dicotómicas basadas en información tradicional de estructuras morfológicas diagnósticas, complementándolo con la obtención del código de barras de ADN del gen MT-COI. Para ello se emplearon adultos de dos especies del género *Paranomala* y dos especies del género *Cyclocephala*. Con las claves dicotómicas tradicionales se encontró que los caracteres morfológicos corresponden a *Paranomala hoepfneri* Bates, *Paranomala semicineta* Bates, *Cyclocephala lunulata* Burmeister y *Cyclocephala barrerae* Martínez, describiéndose por primera vez el edeago, parámetros y *spiculum gastrale* de las especies de *Paranomala*. Se obtuvo el código de barras de cada adulto representante, observándose una coincidencia alta a nivel de género. A partir de las secuencias parciales del gen MT-COI, se calcularon las distancias genéticas correspondientes, analizándose por el método de Máxima Verosimilitud. La topología del árbol construido con estas secuencias mostró agrupamientos de individuos del mismo género y separan a los especímenes de diferentes subfamilias. Se trata de uno de los trabajos pioneros en combinar ambos tipos de caracteres para la identificación de especies de esta familia, destacándose como una alternativa viable y con un enfoque integral.

## **2.- Introducción**

La descripción, identificación y clasificación de especies es fundamental para la biología, ya que permite el ordenamiento de la biodiversidad para facilitar su estudio. Una vez que se consigue clasificar a los organismos, se favorece la comprensión de sus relaciones ecológicas, la predicción de sus historias evolutivas y la propuesta de estrategias para la biología de la conservación (Kress *et al.*, 2015). Por lo anteriormente, la identificación de especies es un pilar esencial para conocer detalladamente múltiples aspectos morfológicos, fisiológicos, ecológicos y evolutivos de cualquier especie. Al respecto, la taxonomía es la ciencia encargada de descubrir, describir, clasificar, nombrar e identificar especies (Schlick-Steiner *et al.*, 2010, Kress *et al.*, 2015).

De manera tradicional, la taxonomía se ha fundamentado en el uso de caracteres morfológicos para establecer las bases de la construcción de árboles de la vida, ofreciendo datos básicos para conocer la ecología, la conservación y la explotación de una gran cantidad de especies. Sin embargo, con el surgimiento de la taxonomía molecular basada en el uso de diferentes marcadores moleculares permitió el surgimiento de la denominada taxonomía integrativa. Esta taxonomía revitalizada unifica los datos obtenidos de la morfología y de los códigos de barras de ADN para complementar y asegurar la eficiente descripción, identificación y clasificación de especies (Pires y Marinoni, 2010). Debido a que existe una gran diversidad de coleópteros, es muy importante realizar la identificación simultánea con características morfológicas y el código de barras de ADN para unificar los datos de ambas disciplinas y se fomente el uso de la taxonomía integrativa.

En el presente trabajo de tesis se plantea la identificación de cuatro especies de coleópteros Melolonthidae distribuidos en áreas verdes de CU en Puebla, utilizando claves taxonómicas morfológicas y los códigos de barras de ADN del gen MT-COI.

### **3.- Antecedentes**

#### **3.1.- Aspectos históricos de la Sistemática y la taxonomía**

Durante mucho tiempo se consideró a la Sistemática y a la taxonomía como disciplinas con el mismo objetivo y solo hasta después del siglo XX se hizo una distinción entre ambas disciplinas, reconociendo a la taxonomía como “la teoría y la práctica de la clasificación” y a la sistemática como “el estudio de la diversidad biológica y de las relaciones entre organismos como consecuencia de su historia evolutiva, para el establecimiento de las relaciones entre los organismos” (Panawala, 2017).

La Sistemática incluye todo el conocimiento que se genera sobre las especies, tanto su pasado como su presente y el cómo la evolución es la encargada de la diversidad, haciendo investigación evolutiva, llegando a establecer filogenias entre organismos (Martens y Segers, 2005). La historia de la Sistemática biológica comenzó por el intento de la clasificación de organismos, considerando a Aristóteles como el padre de la clasificación con fines científicos, iniciando con una clasificación dicotómica de organismos basándose en caracteres morfológicos.

En el siglo XVI, la actividad de clasificar e ilustrar diversos organismos produjo enciclopedias que pretendían separar las cosas certificables de aquello que no lo era (Moreno, 2005). Algunos científicos como Linneo preferían la utilización de pocos caracteres morfológicos para la identificación de especies, mientras que otros como Adanson creían que las identificaciones debían ser con el mayor número de caracteres posibles para evitar la subjetividad. Existieron otros científicos como Lamarck o Cuvier que agregaron conceptos como la homología, considerada como la piedra angular en la biología de la Sistemática. Posteriormente, el objetivo cambió por establecer las relaciones filogenéticas entre los organismos (historia evolutiva), convirtiéndose en una de las tareas más importantes de la Sistemática (Moreno, 2005).

Existen pocas dudas de que la unidad fundamental para la taxonomía es la especie y que debe nombrarse científicamente y sin errores para tener una

referencia confiable como sistema de información biológica. Actualmente la identificación de especies ha aumentado significativamente y esto se debe principalmente a la incorporación de nuevas herramientas. Gracias a este progreso surge una nueva disciplina científica sólida que incorpora avances tecnológicos, tales como acceso virtual a colecciones de museos, secuenciación de ADN, sistemas de información geográfica y múltiples funciones de internet (Padial *et al.*, 2010).

A pesar de los avances en la taxonomía, siguen existiendo problemas en la identificación ya que se considera que los caracteres morfológicos utilizados son elegidos subjetivamente por el investigador. Al mismo tiempo, se deja de lado el hecho de que la función más importante de la taxonomía no solo es identificar a las especies sino también cómo delimitarlas en función de su morfología, ecología y genética; ya que la delineación de especies es fundamental para el conocimiento de la biodiversidad de los organismos vivos, para que de esta manera se determinen los diferentes especímenes que pertenecen a un mismo linaje (Dayrat, 2005; Moreno, 2005).

### **3.2.- Taxonomía integrativa**

La taxonomía integrativa, como fue propuesta desde el 2005, se define como la ciencia que pretende delimitar las unidades de diversidad de vida a partir de perspectivas múltiples y complementarias que incluyen filogeografía, morfología comparada, genética de poblaciones, ecología, desarrollo, comportamiento y aspectos moleculares (Dayrat, 2005). Debido a que es necesario ordenar el conocimiento sobre las especies, en la actualidad se está utilizando cada vez más la taxonomía integrativa para clasificar a las especies. Un ejemplo, se observa en la identificación de insectos ya que estos organismos representan la mayor parte de la riqueza de especies residentes de nuestro planeta. El estudio de la historia evolutiva y de diversificación de los insectos ha sido abordada de manera integrada mediante datos morfológicos, moleculares, biogeográficos y paleontológicos. Por tal razón, se han realizado numerosos estudios a nivel internacional en donde la identificación de los insectos se lleva a cabo utilizando

herramientas morfológicas y moleculares como el código de barras de ADN del gen MT-COI (Mitchell *et al.*, 2011). En países como Alemania, Canadá y Japón ya se han identificado por taxonomía integrativa más de 3,500 especies de insectos con importancia ecológica, económica y médica. No obstante, en México las aproximadamente 35,500 especies de insectos se han identificado únicamente con los datos de características morfológicas (Morón y Valenzuela, 1993).

Los caracteres morfológicos son utilizados para la identificación de especies; estas características orgánicas sirven como evidencia para el descubrimiento y correcta identificación de los individuos (Padial *et al.*, 2010). Los atributos que permiten distinguir a integrantes de un grupo taxón de otro se conocen como caracteres taxonómicos y las distintas alternativas o variantes de estos caracteres se denominan estados de caracter. Estos caracteres son utilizados para facilitar la diagnosis de los individuos, ya que mediante claves taxonómicas que siguen una secuencia ordenada de opciones o dilemas alternativos se expresan los caracteres diagnósticos o discriminatorios (Fernández *et al.*, 2013). La principal ventaja de la identificación mediante caracteres morfológicos es que estos últimos sirven para asignar a los individuos a especies de forma casi inmediata mediante la inspección visual y son aplicables tanto a organismos conservados como a fósiles (Padial *et al.*, 2010). También permite la aplicación de un muestreo taxonómico mucho más cuidadoso que el que se realiza con análisis moleculares, lo que es importante para las revisiones sistemáticas, los estudios de la evolución, del carácter y la valoración filogenética (Rentarúa, 2007).

Asimismo, las herramientas moleculares se han convertido en un pilar del análisis taxonómico moderno, debido a que se puede utilizar sólo una pequeña cantidad de tejido para la correcta determinación de las especies. Los análisis se pueden realizar sin el conocimiento previo de la muestra y se puede aplicar a todas las etapas de desarrollo de la especie proporcionando una mejor eficiencia en la identificación (Kress *et al.*, 2015). Desde hace poco más de una década, existe una herramienta taxonómica en la que se utilizan secuencias de genes relativamente cortas tomadas de una parte estandarizada del genoma, llamadas

“Códigos de barras de ADN” ó “Código de barras de la vida”, las cuales proporcionan identificaciones a nivel de especie rápidas y fiables en todas las formas de vida, incluyendo animales, plantas, hongos y microorganismos (Kress *et al.*, 2015). La importancia del código de barras es encontrar un solo segmento de ADN que sea útil para la identificación de todos los taxones y esta identificación se basa en la especie diana que tiene suficiente diferenciación genética para permitir la separación de las especies, incluso cuando existen similitudes morfológicas (Fišer y Buzan, 2014). Existen tres propiedades características bien definidas que deben presentar los códigos de barras: el fragmento de ADN debe ser casi idéntico en organismos de la misma especie, pero diferente entre individuos de especies diferentes, la sección debe ser estandarizada (la misma sección debe ser utilizada en diferentes grupos taxonómicos) y el marcador debe ser robusto, con una secuencia conservadora y sitios de unión que le permitan su fácil amplificación y secuenciación (Herbert *et al.*, 2003). Los mismos autores citan que en los animales se ha optado por el genoma mitocondrial debido a su falta de intrones, su exposición limitada a recombinación y a que el ADN mitocondrial es haploide. El sistema de código de barras se basa en el gen que codifica para el COI. En las secuencias del gen MT-COI, las mutaciones existentes son en su mayoría sustituciones; inserciones y deleciones y sólo se producen a nivel de codón, lo cual hace que este marcador sea fácil de alinear. Por lo tanto, la secuencia del gen MT-COI permite la discriminación de más del 98% de las especies animales (Fišer y Buzan, 2014). Este gen presenta dos ventajas importantes: 1) los cebadores universales de este gen son muy robustos, ya que habilitan la recuperación de su extremo 5' de la mayoría de sus representantes y 2) parece poseer un mayor rango de señal filogenética que cualquier otro gen mitocondrial, debido a la evolución de este gen que es lo suficientemente rápida para permitir la discriminación no sólo de especies muy afines, sino también grupos filogeográficos dentro de una sola especie (Herbert *et al.*, 2003).

La identificación a nivel de especie es crucial en muchas aplicaciones de importancia económica y social, por lo tanto, la identificación rápida es importante

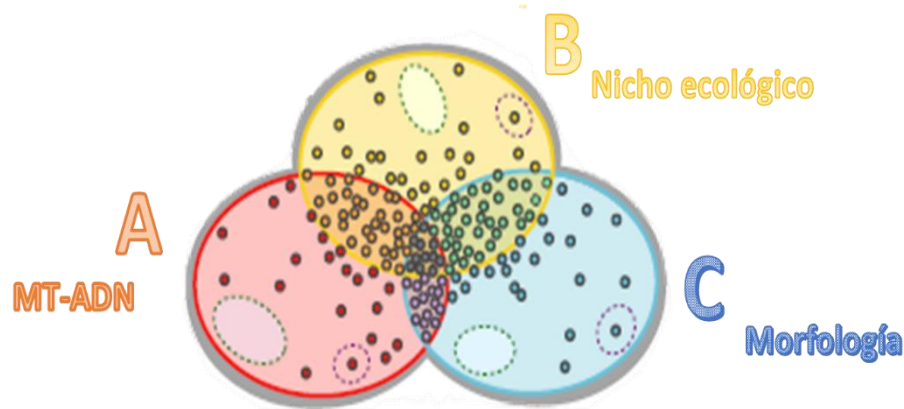
(Fišer y Buzan, 2014). El uso de códigos de barras sirve como una herramienta básica en la identificación taxonómica y para poder descubrir problemas con especies crípticas (Paz *et al.*, 2011).

La identificación de los códigos de barras de ADN ha demostrado tener éxito en los estudios de evaluación rápida de la biodiversidad y biomonitoreo, también en el seguimiento de propagación de patógenos y sus vectores asociados, en la ciencia forense, en la investigación sobre el comercio ilegal de especies en peligro de extinción y sus productos, en los estudios sobre la ecología de la alimentación, en plantas medicinales y venenosas y en las iniciativas de conservación (Fišer y Buzan, 2014). No obstante, también existen limitaciones en los métodos de identificación basados en herramientas moleculares. Por ejemplo, en los métodos basados en los árboles filogenéticos sigue siendo difícil elegir cuál de los múltiples clados fuertemente apoyados en bases moleculares corresponden a las especies. Además, un gran número de evidencias muestran que la discordancia entre los árboles filogenéticos de especies y árboles de genes es un fenómeno común causada por procesos tales como el incompleto linaje de clasificación, la hibridación, la duplicación de genes, la evolución reticulada o la recombinación. Estas situaciones complican enormemente la resolución de problemas taxonómicos (Padial *et al.*, 2010). Por lo tanto, el desarrollo de herramientas moleculares como el código de barras se debe integrar con la taxonomía descriptiva de caracteres morfológicos, es decir, se debe presentar como una herramienta complementaria en la identificación de especies (Padial *et al.*, 2010; Paz *et al.*, 2011).

El código de barras genético ha sido considerado como una ayuda eficaz a la taxonomía tradicional (Pires y Marinoni, 2010). De esta manera, la morfología tradicional se revitaliza mediante la adhesión a las tecnologías que se han propuesto con el impedimento taxonómico. Además, esto aumenta el nivel de confianza en las especies que son respaldadas por diferentes tipos de información. La asociación de la información para delimitar las especies es de hecho un verdadero desafío al que la taxonomía tiene que enfrentarse. Su

adopción por los taxónomos contribuirá a una mejor comprensión de la biodiversidad, ya que las especies requieren ser estudiadas desde múltiples perspectivas complementarias tal como filogeografía, morfología comparada, genética de poblaciones, ecología, desarrollo, comportamiento, etc. (Figura 1) (Dayrat, 2005; Pires y Marinoni, 2010).

De este modo la taxonomía integrativa introducida formalmente en 2004 como un marco integral para la delimitación y descripción de taxones, se puede lograr a través de tres pasos delimitados: 1) acumular diversos tipos de datos (ADN, morfológicos, ecológicos, entre otros) sobre numerosas especies, 2) circunscribir a los grupos de organismos con los diversos datos garantizando que los grupos corresponden a las especies y 3) Proporcionar diagnóstico y nombre para las especies identificadas (Pante *et al.*, 2014).



**Figura 1.- Representación esquemática de la taxonomía integrativa.** Se muestra un esquema de la interacción de los diversos tipos de identificación. Representan la variación de caracteres, siendo cada punto un individuo independiente que requiere identificación y delimitación. **A)** Se muestra la identificación por medio de caracteres de ADN mitocondrial. **B)** Se muestra identificación por medio de las interacciones en el nicho ecológico. **C)** Se muestra la identificación a través de la morfología. El esquema representa los límites de identificación y delimitación de acuerdo con cada uno de los caracteres, dando como resultado la integración al utilizar más de un caracter de identificación. Tomado y modificado de Padiál *et al.* (2010).

### 3.3.- Código de barras en insectos

El genoma mitocondrial ha tenido un gran impacto en la genética entomológica, debido a sus genes individuales en una amplia gama de estudios. El enfoque reciente del uso de código de barras de ADNmt como una fuente de datos casi exclusiva para la identificación y delimitación de especies ha aumentado significativamente dando como resultado una gran base de datos de los genes mitocondriales en secuencias de insectos más comunes en GenBank (Cameron, 2014). Desde que se dio la primera publicación del genoma mitocondrial del insecto *Drosophila* sp. en 1995, se ha presentado un aumento rápido de secuencias de insectos representado casi todas las ordenes disponibles, debido a esto los insectos representan el 80% de los genomas mitocondriales que han sido reportados (Cameron, 2014). Existen estimaciones recientes que sugieren que la fauna global de insectos incluye menos de seis millones de especies, aunque esta proyección es incierta ya que el trabajo taxonómico es muy limitado en grupos diversos.

En Canadá, Herbert *et al.* (2016), realizaron un análisis empleando el código de barras para evaluar patrones de riqueza de especies en veintisiete ordenes de insectos; el análisis de más de un millón de especímenes reveló conteos de especies congruentes con los anteriores resultados para casi todos los ordenes. Nagoshi *et al.* (2011) demostraron que el código de barras de ADN tiene el potencial de ser un suplemento eficiente y preciso para la identificación de plagas invasivas en campos de cultivo al realizar la comparación de tres especies de lepidópteros representado por *Spodoptera* sp., un género de polilla que afecta principalmente campos de cultivos en América de Norte (este género incluye varias plagas agrícolas importantes, dos de las cuales no son nativas.) Este análisis de secuencias del gen mitocondrial MT-COI arrojó la identificación y delimitación de las tres especies.

Además, existen problemas con la identificación de especies ya que los patrones de biodiversidad son complejos y difíciles de evaluar de manera exhaustiva. Para comprender mejor estos patrones en Alemania, Hendrich *et al.* (2015), participaron en un programa mundial de recolección de artrópodos obteniendo a su vez el código de barras de ADN. El muestreo se realizó en dos sitios de mayo a septiembre, obteniéndose que la diversidad de ambos sitios aumentó de mayo hasta julio antes de disminuir en septiembre. Los resultados ilustran cómo un banco de información de códigos de barras de ADN integral puede identificar especies desconocidas, pero también cómo está limitado por la cantidad de registros, especialmente para himenópteros y dípteros. En India se ha descrito un 4.6% de especies, mientras que en otros países se considera que la cantidad aproximada de especies descritas es de 16%; debido a esto, se realizó un análisis sobre el uso de código de barras de ADN en insectos pertenecientes a diferentes órdenes y familias, comparando la información morfológica y molecular demostraron que la filogenia coincide con ambos tipos de datos (Jalali *et al.*, 2015). Además, la identificación de insectos plaga de gran importancia económica está limitada debido a que se requiere de especialistas y mucho tiempo para su clasificación. Por esta razón, Cho *et al.* (2013) realizaron un estudio en donde secuenciaron y obtuvieron códigos de barras de ADN para identificar insectos plagas de alimentos. Estos investigadores analizaron el gen MT-COI de 55 especies de plagas en Corea, encontrando que una porción del gen discriminó efectivamente más del 90% de especies de estos insectos y marcó las divergencias genéticas entre individuos y entre especies del mismo género de cinco ordenes Blattodea, Coleoptera, Hymenoptera, Lepidoptera y Diptera.

En el caso de los coleópteros, se han reportado trabajos en diversos países con un gran número de individuos para la identificación y delimitación de las especies con el uso del código de barras, tal como lo reportado por Hendrich *et al.* (2015), cuya investigación se realizó con escarabajos residentes de Alemania. Ellos obtuvieron el código de barras del gen MT-COI para Coleoptera con 15,948 individuos que pertenecen a 3,514 especies bien identificadas, representando de

esta manera 97 de 103 familias. Solo se registraron aquellas secuencias mayores de 500 pb, recuperando 15,948 individuos (63%) de 25,294. En total reportaron la asignación de 395 BIN's y se encontraron 409 individuos que compartían una asignación de BIN con otra especie. En otro estudio realizado por Oba *et al.* (2015) en Japón, recolectaron y ensamblaron secuencias de código de barras del gen MT-COI de 762 pb, de un total de 275 especies de coleópteros Elateridae, que representan aproximadamente el 75% de las especies encontradas en Honshu, Japón. También, reportaron 20 de las 21 especies de plagas potenciales registradas en este país. Sus resultados muestran que la mayoría de las especies identificadas morfológicamente forman agrupaciones filogenéticas separadas por grandes distancias moleculares. Muraji *et al.*, en 2008, analizaron al escarabajo *Dasylepida ishigakiensis* Nijima and Kinoshita, conocido originalmente en la región de Yaeyama, Japón. Los investigadores obtuvieron secuencias del gen MT-COI, ARNr y genes de Citocromo b de ambas muestras recolectadas de las islas y al realizar un análisis filogenético usando estas secuencias, revelaron la separación de tres clados, sugiriendo que se han aislado geográficamente durante un largo periodo evolutivo. En 2006, Pons *et al.* analizaron 468 individuos del género *Rivacindela* en Australia, los cuales se separaron en 47 especies de acuerdo con la identificación morfológica, mientras que con la identificación molecular (MT-COI, Citocromo b y ARNr 16S) se obtuvo una variación de 47 a 51 especies, demostrando que existe una relación entre las propiedades morfológicas y moleculares. Al mismo tiempo, se muestra coherencia con los rangos geográficos, una amplia congruencia de las especies morfológicamente reconocidas y ciertos niveles de divergencias que son típicos para especies de insectos estrechamente relacionados.

En algunos casos, el uso de código de barras permite la identificación correcta de especies, separando individuos con plasticidad fenotípica o con la validación de las diferencias morfológicas, como es el caso del estudio realizado en el Este de África, por Seidel (2016), en donde secuenció el MT-COI de 29 individuos del género *Eudicella*, permitiendo la correcta delimitación entre individuos. Al mismo

tiempo, demostró que existían diferencias moleculares en aquellos individuos que presentaban diferencias morfológicas determinando de esta manera que estos individuos correspondían a una nueva especie: *Eudicella nana*. En 2005, Monaghan *et al.* analizaron secuencias cortas de ADN mitocondrial y nuclear para la delimitación de escarabajos de agua tropical de Madagascar (Dysticidae: Hydrophilidae) y “escarabajos peloteros” (Scarabaeidae) del género *Canthon* del Neotrópico, encontrando 16 genotipos y 12 genotipos respectivamente, en donde la distribución de ARNr 28S coincide con exactitud con la distribución de ADN mitocondrial. Al mismo tiempo, los genotipos de género *Canthon* se compararon con información presente en GenBank, lo cual demostró que coincidían los grupos cercanos.

En México se han realizado muy pocos trabajos en relación con el código de barras de ADN, como es el caso del estudio realizado por Zaragoza-Ortega *et al.* (2017) en donde se evaluó la atracción provocada por el 2 (metiltio) benzoato de metilo hacia diferentes especies de *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae), en combinación con iluminación de un diodo emisor de luz (LED) impulsado por energía solar. Con esto se determinó la capacidad de atracción de las especies en cultivos de caña de azúcar y posteriormente se obtuvo la amplificación del gen MT-COI de las especies que respondieron al tratamiento compuesto, construyendo un árbol que demostró que las especies *Phyllophaga brevidens* Bates y *Phyllophaga Lenis* Horn están estrechamente relacionadas filogenéticamente. Otro trabajo es el de Pérez-Flores *et al.* (2016), quienes reportaron una nueva especie de *Chrysina* para México, ya que la identificación molecular a partir de MT-COI permitió la confirmación de las diferencias obtenidas con datos morfológicos, demostrando así que existían diferencias significativas con la especie *Chrysina peruviana* Kirby.

### **3.4.- Generalidades de los integrantes de la familia Melolonthidae**

Los coleópteros Scarabaeoidea son el grupo de insectos más diversificado en cuanto a forma, tamaño, color y hábitos. Se han reconocido aproximadamente a 1,713 especies en México, de las cuales 1,179 pertenecen a la familia

Melolonthidae y 83 a la familia Passalidae (Reyes-Novelo y Morón, 2005; Morón *et al.*, 2014). Los integrantes de esta familia forman un grupo de insectos muy variados en cuanto a tamaño, forma, hábitos y coloración, lo que ha llevado a que muchos investigadores coleccionen, identifiquen y estudien sus hábitos. Además, este grupo de coleópteros tienen importancia económica y ecológica (Reyes-Novelo y Morón, 2005; Aragón-García *et al.*, 2008). Endrödi (1966) considera a cinco familias dentro de este grupo: Trogidae, Passalidae, Lucanidae, Melolonthidae y Scarabaeidae. A su vez, dentro de la familia Melolonthidae se encuentran las subfamilias Melolonthinae, Rutelinae y Dynastinae (Romero-López *et al.*, 2010; Cherman y Morón, 2014).

#### **3.4.1.- Ciclo de vida**

Los coleópteros Melolonthidae son holometábolos. Su ciclo de vida atraviesa por cuatro estados marcados: huevo, larva, pupa y adulto. La etapa de huevo se caracteriza por que su color varía en diversos tonos de blanco y puede ser esferoide, elipsoide o cilíndrico. Conforme se desarrolla el embrión el huevo incrementa casi el doble de su tamaño y se forma esférico. Las larvas se caracterizan por desarrollarse en tres estados. El primero cuando emerge se rompe la cubierta del huevo (corión); consta de una cápsula cefálica con partes bucales masticatorias. Ocurren cambios significativos en la cápsula cefálica para el paso a los siguientes estadios. En el estado de pupa se parece morfológicamente al adulto, a excepción de las alas, patas y antenas están plegadas y próximas al cuerpo y en adulto se caracterizan por permanecer en una celda pupal hasta que se endurece la quitina de la cutícula, se expanden las alas a su tamaño normal y maduran los órganos sexuales (Morón *et al.*, 1997) (Figura 2).

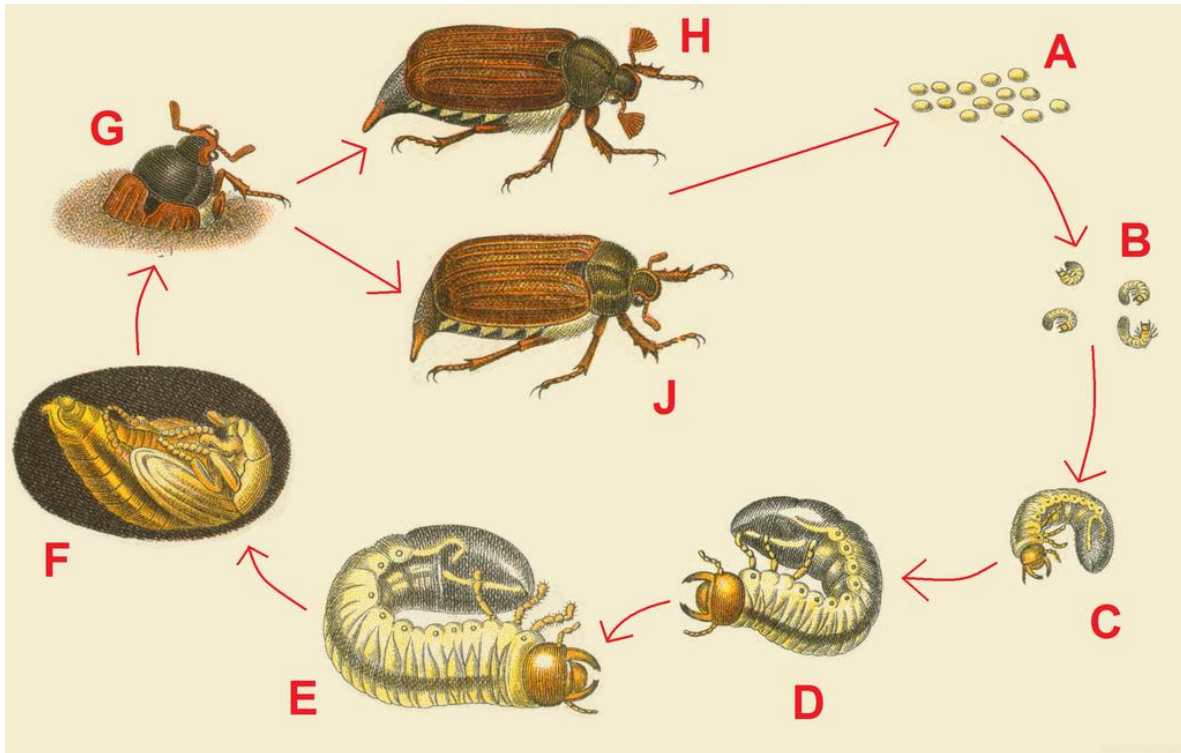
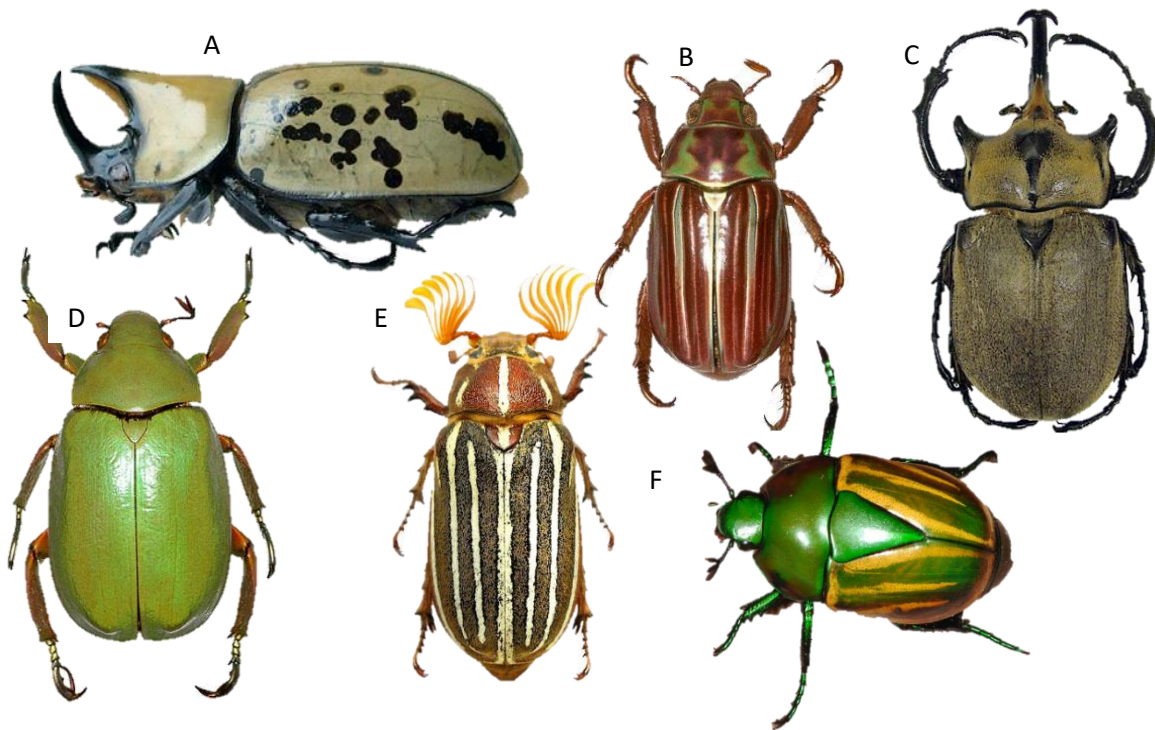


Figura 2. Ciclo de vida del coleóptero Melolonthidae, *Melolontha melolontha* (Linnaeus, 1758). Se muestran los diferentes estadios A) huevos, B, C, D y E) larvas del primero a tercer estadio, respectivamente F) Pupa G, H y J) Adulto. Tomada de Edmund Reitter (1908).

### 3.4.2.- Características morfológicas corporales, distribución y hábitos

Los adultos presentan colores diversos y vestidura variada tal como se muestra (Figura 3). El labro y las mandíbulas están parcialmente expuestas u ocultas bajo el clípeo. Mandíbulas esclerosadas. Antenas formadas por 8 a 10 artejos, 3 a 7 de los cuales corresponden a la maza antenal y éstas son brillantes con sedas dispersas; canthus ocular siempre presente, escapo antenal mucho más corto que el flagelo, usualmente las lamelas son más largas en los machos que en las hembras. Presentan cabeza pequeña, cuerpo ovalado y robusto ó deprimido y esbelto. Abdomen con 6 esternitos visibles y 7 pares de orificios respiratorios, 3 ó 4 en las regiones pleurales, 2 ó 3 en los extremos esternales y uno en la región tergal. Placa pigidial completamente expuesta o cubierta en parte por los élitros. Élitros siempre desarrollados, en ocasiones fusionados entre sí; parámetros genitales masculinos bilobulados o fusionados. Patas anteriores fuertes, esbeltas y

más alargadas en los machos. Los tarsos son pentámeros en los tres pares de patas y las uñas tarsales bien desarrolladas con formas diversas. Los machos pueden presentar proyecciones en la cabeza y el pronoto con formas de cuernos o protuberancias con diseños muy variados. El tamaño de las especies es muy variable; los adultos tienen una longitud total de 3 a 130 mm, la anchura máxima de los élitros es de 1.8 a 51 mm y la extensión alar de 8 a 230 mm (Cherman y Morón, 2014; Morón *et al.*, 2014) (Figura 4).



**Figura 3. Especies representantes de Melolonthidae.** Se muestran algunas especies distintivas con una variedad de vestiduras y colores dentro de esta familia. **A) *Dynastes tityus*, B) *Chrysina quetzalcoatli* C) *Megasoma nogueirai* D) *Chrysina prototolica* E) *Polyphylla decemlineata* F) *Macraspis* sp.** Tomado de Moore (2006); Jameson (2006); Madidi (2011).

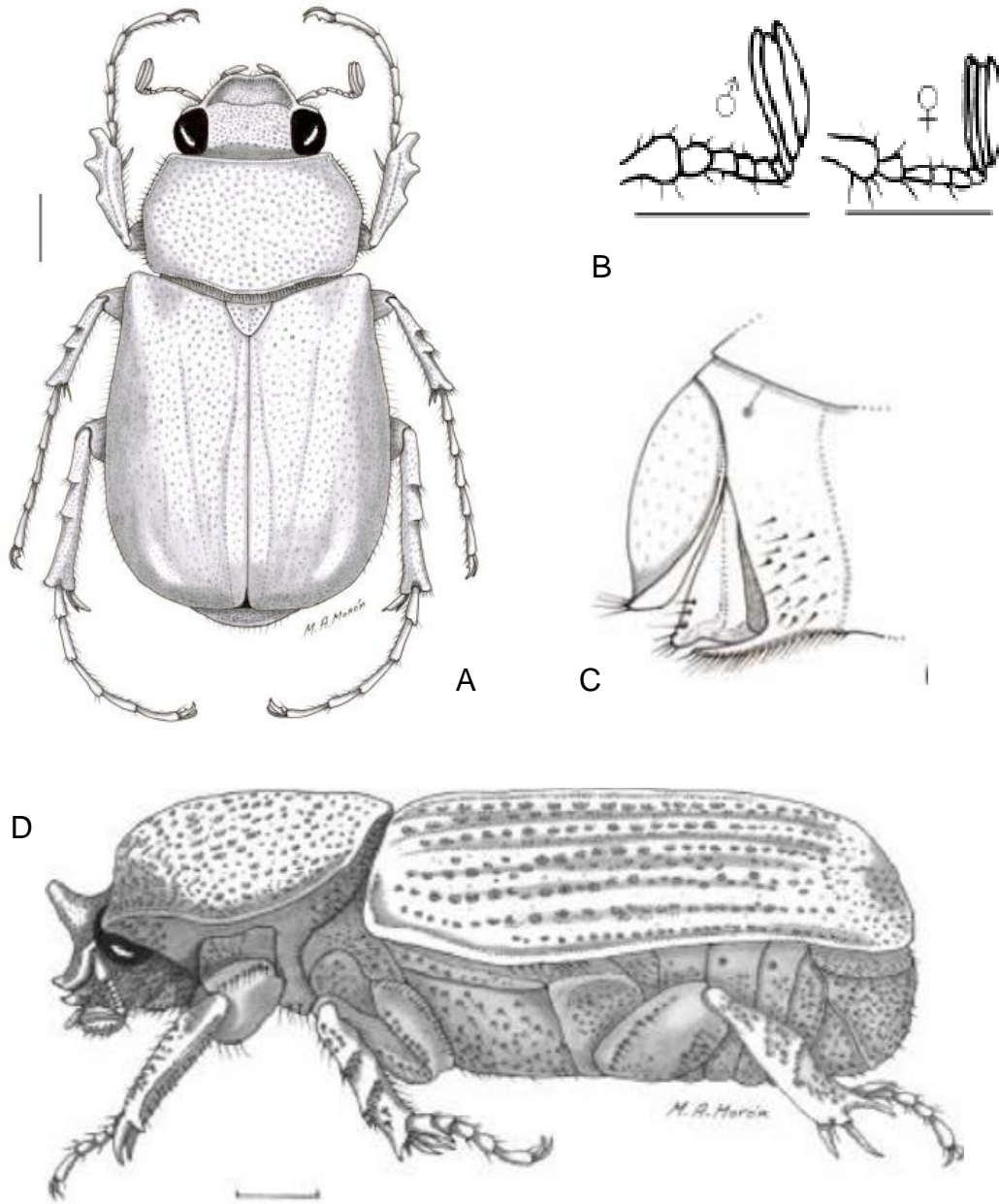


Figura 4. Esquema representativo de caracteres presentes en adultos de Melolonthidae. A) Posición dorsal de *Phyllophaga gaumeri* Bates. B) Artejos antenales y maza antenal de *Epectinaspis mexicana* Burmeister, en donde se muestra la diferencia en el tamaño en machos y hembras. C) Placa pigdial expuesta de *Phyllophaga (Phytalus) obsoleta* Blanchard y D) Posición lateral de *Hemiphileurus dejeani* (Bates), en donde se logran observar los esternitos y la condición pleurostictii. Tomado y modificado de Reyes-Novelo y Morón (2005); Morón (2006); Ramírez-Ponce y Morón (2009) y Alcázar-Ruiz et al. (2003).

Las larvas son de tipo escarabaeiforme y presentan la galea y la lacinia maxilar completa o parcialmente fusionadas entre sí formando una mala. Palpos maxilares con cuatro artejos, mandíbulas con proceso ventral, epifaringe sin epitorma, antenas con cuatro artejos; el último con forma diferente y provisto con áreas sensoriales de forma variable. Los tres pares de patas bien desarrolladas, cada pata con cuatro artejos diferenciados y el último tiene una uña (tarsungulus). Tienen un par de espiráculos protorácicos y ocho pares de espiráculos abdominales de tipo cribiforme. El abdomen consta de diez segmentos y la abertura anal usualmente es horizontal. Las pupas son exaratas, con abdomen formado por nueve segmentos bien delimitados, frecuentemente con órganos dioneiformes en sus bordes dorsales. Los espiráculos de los segmentos segundo a cuarto tienen un peritrema esclerosado, mientras que los correspondientes a los segmentos quinto al octavo están atrofiados, y carecen de peritrema (Cherman y Morón, 2014).

Los coleópteros de la familia Melolonthidae se encuentran en todos los hábitats continentales, excepto en ambientes con hielo. Los adultos se alimentan con hojas, tallos, flores, frutos, polen, néctar, savia, corteza y detritus vegetal, comúnmente son fitosaprófagas, rizófagas o xilófagas. Son holometábolos con huevo, tres estadios larvales, pupa y adultos; su ciclo es anual o bianual y pocos bivoltinos o trianales (Cherman y Morón, 2014; Morón *et al.*, 2014).

En México se han descrito 1,179 especies de Melolonthidae incluidas en las subfamilias Melolonthinae, Rutelinae y Dynastinae principalmente distribuidas en Chiapas, Durango, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Oaxaca, Puebla y Veracruz. El 47.6% del total de las especies registradas en México tienen una distribución restringida, presentando así un alto nivel de endemismo. En la península de Baja California y en Sonora se registran las mayores proporciones de endemismo seguidos por Chiapas, Oaxaca, Coahuila, México, Chihuahua y Durango (Morón *et al.*, 2014). De las 1,179 especies de Melolonthidae en México, ninguna se encuentra en la lista del UICN, (2017) en la NOM-ECOL-059-SEMARNAT-2014, por lo tanto no se encuentra bajo explotación. El estudio tanto

taxonómico como biológico de este grupo de organismos ha aumentado significativamente en los últimos 30 años; se estima que existe un 10% de información sobre la biología y ecología de estos organismos (Morón *et al.*, 2014).

### **3.5.- Características morfológicas externas distintivas de especies de los géneros de *Paranomala* y *Cyclocephala*, empleadas como modelos de estudio**

#### **3.6.1.- *Paranomala***

Los adultos del género *Paranomala* Casey, 1915, presentan un dimorfismo sexual escaso, ligero a notable en la longitud de la maza antenal, los élitros presentan una textura lisa o punteada, el borde lateral engrosado y generalmente con una figura ovalada o ligeramente ensanchada apicalmente. El escutelo presenta una puntuación moderada, no liso ni rugoso-punteado; los esternitos abdominales generalmente glabros a moderadamente sedosos. El clípeo variable, sinuado, recto o redondeado, con la superficie convexa o ligeramente plana y el borde anterior ligeramente elevado o plano, rugoso-punteado, glabro, sutura frontoclipeal completa y recta. Presenta una maza antenal de longitud similar a la del funículo, la mandíbula derecha con quillas inferiores no más largas que la región molar y el pronoto subrectangular o subtrapezoidal, con la anchura media mayor a la anchura posterior y similar a la de la base de los élitros. Los mesepímeros internos o alineados con el húmero elitral. La protibia presenta un espolón en posición subapical, el margen lateral bi o tridentado, ensanchamiento en machos discreto o nulo. Las mesotibias y metotibias con 1 o 2 carinas transversales. Propigidio, pigidio y placa anal con notable puntuación o aspecto estriado. Cápsula genital masculina con parámetros más largos o con longitud similar al tecto. *Spiculum gastrale* en forma de “T” o de “Y”, con las placas asociadas generalmente grandes, no rectangulares (Ramírez-Ponce y Morón, 2009).

#### ***Paranomala hoepfneri* Bates**

Se encuentra distribuida en diversas comunidades vegetales en localidades de Nayarit, Jalisco, México, Morelos, Guerrero, Oaxaca, Puebla, Hidalgo y Chiapas

en tierras altas, ubicadas entre los 600 y 2,100 de altitud (Morón *et al.*, 1997; Aragón *et al.*, 2001; Lugo *et al.*, 2013). Los adultos se caracterizan por presentar élitros amarillos con una franja ancha, oscura y opaca y una longitud corporal 13 a 15 mm (Aragón *et al.*, 2001; Lugo *et al.*, 2013).

### ***Paranomala semicincta* Bates**

Se distribuye a lo largo de Costa Rica, Honduras, México y Nicaragua. Los adultos consumen follaje y flores mientras que las larvas se encuentran desarrollándose en cultivos de maíz y presentan hábitos fitófagos. (Delgado y Márquez, 2006). Élitros verde o pardo con reflejos metálicos con ápice amarillo; pronoto verde metálico con lados amarillentos (Filippini *et al.*, 2016)

### **3.6.2.- *Cyclocephala***

Los adultos del género *Cyclocephala* Dejean, 1821, presentan el borde anterior del clípeo redondeado o sinuado, antenas con ocho a diez artejos, frente y pronoto convexo, sin tubérculos, carinas o depresiones, meso y metatibias con ápices rectos, no ensanchados a diferencia de las hembras los machos presentan los protarsos engrosados y la uña interna más grande que la externa por lo que el dimorfismo sexual se considera acentuado (Morón *et al.*, 1997)

### ***Cyclocephala barrerae* Martínez**

Se encuentra distribuida principalmente en Aguascalientes, Chihuahua, Durango, Jalisco, Morelos, Puebla y Distrito Federal, entre los 1,500 a 2,500 m de elevación (Morón *et al.*, 2014). Sus larvas consumen raíces de gramíneas silvestres y los adultos frecuentan el follaje y las flores de diversos árboles y arbustos, aunque no se han evaluado formalmente las pérdidas que provocan en los cultivos (Aragón *et al.*, 2001). En el caso de los adultos se desconocen sus plantas hospederas (Morón *et al.*, 2014). Los adultos se caracterizan por presentar pronoto y élitros testáceos, sin manchas contrastantes, con una maza antenal masculina más larga que los artejos precedentes y una longitud corporal 11 a 14 mm (Aragón *et al.*, 2001).

### ***Cyclocephala lunulata* Burmeister**

Tiene una distribución muy amplia en México, excepto en la península de Baja California, Chihuahua, Coahuila, Durango, Campeche y Zacatecas (Aragón *et al.*, 2001; Morón *et al.*, 2014). Presentan hábitos crepusculares y nocturnos, emergiendo en épocas lluviosas (Stechauner-Rohringer y Pardo-Locarno, 2010). Los adultos se han considerado como una plaga importante de cultivos de frutos ya que se alimentan de árboles frutales como guayaba, mango, higo, durazno y manzana (Morón *et al.*, 2014). Sus larvas se encuentran en diversos tipos de suelo, incluyendo suelos cultivados con maíz, caña de azúcar, alfalfa, arroz, cultivos de flores de *Limonium* (Plumbaginaceae) y hierbas silvestres. También se encuentran presentes en suelos ricos en materia orgánica y aunque no se han confirmado sus hábitos alimentarios, al parecer tienen un comportamiento saprófago (Aragón *et al.*, 2001; Morón *et al.*, 2014). Los adultos presentan una coloración amarilla pajiza, con patrones de manchas oscuras, simétricas y muy variables en el pronoto y los élitros. La base del pronoto no presenta margen, el clípeo trapezoidal presenta un borde anterior redondeado y se caracteriza por tener una longitud de 11 a 18 mm (Reyes-Novelo y Morón, 2005).

#### **4.- Justificación**

Debido a la gran relevancia biológica, ecología y económica de los coleópteros Melolonthidae, la delimitación de especies es primordial para iniciar cualquier estudio sobre estos insectos de diversidad y abundancia extraordinaria. En México, la principal fuente de información para la identificación de integrantes de la familia es la taxonomía morfológica basada en la revisión rigurosa de caracteres morfológicos externos e internos. Sin embargo, en Norte América, Europa y Asia, la tendencia en la identificación es el uso integrado de las herramientas morfológicas y moleculares para asegurar la correcta identidad de las especies.

Por tal razón, en el presente trabajo se resalta la importancia de la taxonomía integrativa en el estudio de los coleópteros Melolonthidae distribuidos en territorio mexicano, vinculando el uso de caracteres morfológicos tradicionales con el análisis simultáneo del código de barras de ADN del gen MT-COI. En este caso,

considerando como modelo de estudio a dos especies de *Paranomala* y dos especies de *Cyclocephala* localizados en áreas verdes de Ciudad Universitaria de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (CU, BUAP), todas con importancia ecológica y por lo menos una de ellas, con importancia económica. La información generada contribuirá al desarrollo de herramientas eficaces que faciliten una identificación precisa a nivel de especie de los integrantes de este grupo. Esto además de impactar directamente en el ámbito agrícola mexicano, brindará información relevante para la filogenia de los Melolonthidae.

## **5.- Hipótesis**

La taxonomía integrativa permite la identificación precisa a nivel de género de los adultos de *Paranomala* y *Cyclocephala* recolectados en áreas verdes de CU, BUAP y proponer una similitud cercana al 100% en la mayor parte de los *vouchers* considerados para las especies revisadas.

## **6.- Objetivos**

### **6.1.- General**

Proponer la identidad a nivel de especie de los adultos de *Paranomala* y *Cyclocephala* recolectados en CU, BUAP por taxonomía integrativa, considerando sus *vouchers* morfológicos y moleculares.

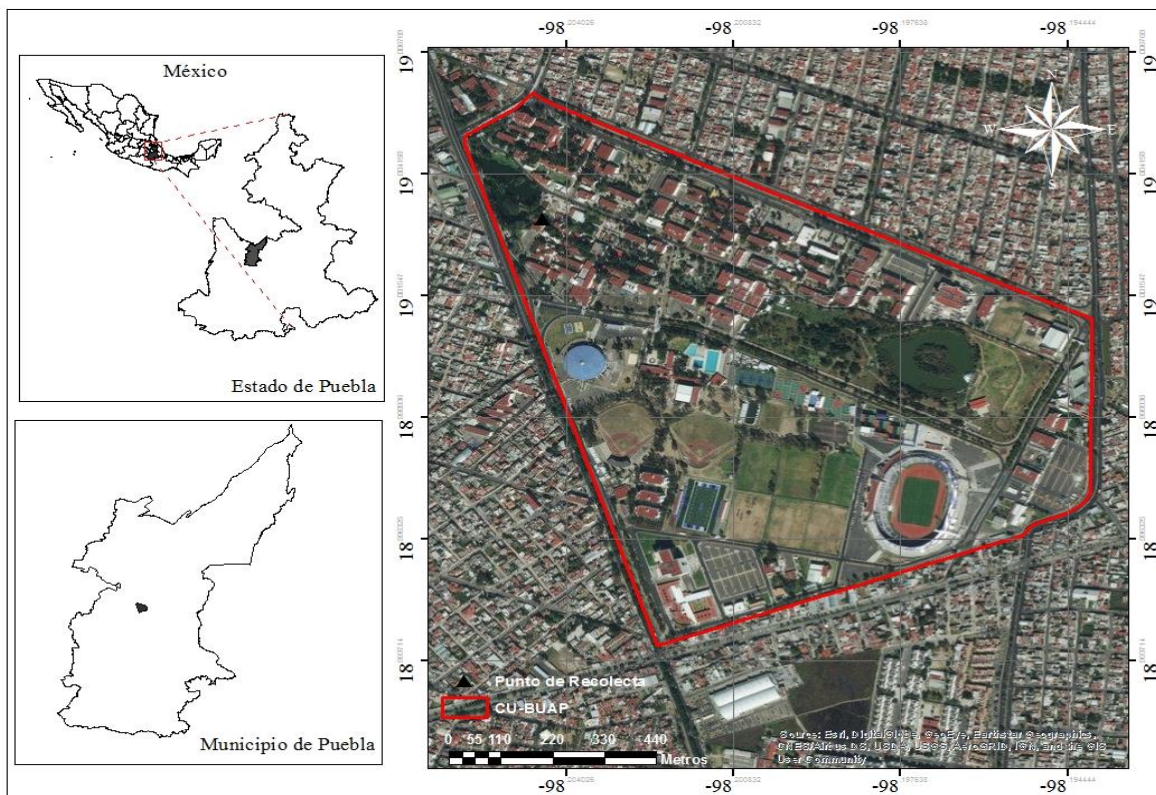
### **6.2.- Particulares**

- Identificar a nivel de especie a los coleópteros adultos recolectados, revisando caracteres morfológicos externos con base al uso de claves dicotómicas.
- Registrar y analizar las secuencias del gen MT-COI de los ejemplares de cada género, usando bases de datos internacionales y herramientas bioinformáticas.

## 7.- Metodología

### 7.1.- Área de estudio

El muestreo se realizó en áreas verdes de CU, BUAP (Figura 5) ubicada en la capital del estado de Puebla (paralelos 19°03'05" LN 98°13'04" LO, 2135 msnm), en la zona geográfica conocida como "El Valle", la cual se extiende entre las elevaciones de la Malinche y el Iztaccíhuatl limitando hacia el norte con el estado de Tlaxcala. El Valle se extiende hacia el sur, abarca hasta los poblados de Santa Isabel Cholula y Totimehuacán. Presenta un clima templado subhúmedo con lluvias en verano, de mayor humedad (48.69%), templado subhúmedo con lluvias en verano, de humedad media (47.30) y semifrío subhúmedo con lluvias en verano (4.01%) (INEGI, 2010).



**Figura 5. Mapa del sitio de recolecta.** Áreas verdes de CU, BUAP, Puebla. México (paralelos 19°03'05" LN 98°13'04" LO, 2135 msnm). Elaborado en el sistema de información geográfica ArcGIS 10.3.

## **7.2.- Recolecta y revisión de caracteres morfológicos de adultos**

Los adultos se recolectaron entre los meses de mayo a junio en un horario de 20:00 a 22:00 hrs de forma manual con la ayuda de linternas de luz blanca. Los individuos capturados fueron depositados en contenedores de plástico, preparados previamente con la mitad de su volumen con suelo del lugar de recolecta. Posteriormente, los organismos se transportaron al “Laboratorio de Infoquímicos y Otros productos Bióticos” de la Facultad de Ciencias Biológicas de la BUAP para su mantenimiento y separación por caracteres morfológicos externos visibles a simple vista. La mitad de los individuos fueron preservados en etanol al 70% y la otra mitad se mantuvo en contenedores con suelo, hasta el momento del montaje, no se sacrificaron. Posteriormente, todos los adultos fueron revisados y se propuso su identidad taxonómica con base en las claves dicotómicas tradicionales (caracteres morfológicos) de Morón *et al.* (1997), Aragón *et al.* (2001), Reyes-Novelo y Morón (2005) y Lugo-García *et al.* (2013), además de la opinión experta del Dr. Agustín Aragón del Centro de Agroecología del Instituto de Ciencias, BUAP. Cada uno de los especímenes se observó con minuciosidad en un microscopio estereoscópico VE-S4 Velab. Los especímenes salvaguardados en contenedores con suelo fueron sacrificados en una cámara letal mediante la acción del acetato de etilo y más tarde, se prepararon para el montaje correspondiente. Por otra parte, los ejemplares preservados en etanol al 70% fueron trasladados al laboratorio de Macromoléculas de la Facultad de Ciencias Biológicas, BUAP, para llevar a cabo la identificación por caracteres moleculares.

### **7.2.1.- Preparación de *vouchers* morfológicos**

El montaje de los adultos seleccionados consistió en pinchar al ejemplar con un alfiler entomológico No. 2 en la región derecha del tórax, en posición vertical, atravesando entre el segundo y tercer par de patas. Posteriormente, se colocó en un “montador” (estructura de unicel que permite la colocación del insecto en la forma deseada), en el cual el ejemplar se orientó horizontalmente en la placa y se procedió a acomodar los apéndices sujetándolos (sin perforar) con alfileres

entomológicos: el primer par de patas dirigiéndola hacia adelante, así como el segundo y tercero hacia atrás; los tres pares se acomodaron en posición natural y paralela al cuerpo, mientras que la antena derecha se colocó en posición horizontal en un ángulo de 90° (Márquez, 2005). En el caso del edeago y de *spiculum gastrale* de cada uno de los ejemplares, se utilizaron pinzas entomológicas finas, las cuales se introdujeron en el poro genital para extraer el edeago bajo un microscopio estereoscópico. Se retiró el tejido membranoso dejando únicamente la estructura esclerosada, se separaron el edeago y el *spiculum gastrale* y, estos se colocaron en una estructura de papel en forma triangular previamente insertado con un alfiler entomológico del No. 1, al cual se le agregó solución de montaje a base de resina, ubicando el edeago en posición dorsal con los parámetros expuestos, tomando como base lo propuesto por Márquez (2005).

Los ejemplares se dejaron secar aproximadamente por una semana; posteriormente, se procedió a retirar los alfileres que sujetaban los apéndices y se colocaron en una caja entomológica de 25x18 cm en donde se introdujeron los ejemplares formando un ángulo de 90° entre el cuerpo del ejemplar y el alfiler. Por debajo de ellos se ubicaron las etiquetas elaboradas previamente. Se emplearon dos tipos de etiquetas: una de determinación y otra de datos de recolecta. A las etiquetas de determinación se les incluyó información sobre el orden, familia y nombre científico del ejemplar, además de los apellidos del identificador separados por un guion, seguidos por la primera letra de cada nombre. En el caso de las etiquetas de datos de recolecta, se incluyeron los datos relacionados con el país, estado, municipio, localidad, coordenadas geográficas, altitud, fecha y recolector. Ambas etiquetas se imprimieron en papel bond base 20, en un tamaño de 1.5 x 2.5 cm, como recomienda Estrada (2013).

### **7.3.- Preparación de *vouchers* moleculares**

#### **7.3.1.- Purificación del ADN genómico**

Para realizar la purificación del ADN genómico, se realizó una disección del tejido interno del fémur o se diseccionó la región del protórax dependiendo del tamaño de los individuos. Posteriormente, los tejidos fueron congelados en hielo seco durante 1.5 h y más tarde fueron triturados en un mortero a  $-40^{\circ}\text{C}$  para obtener un polvo fino. A continuación, la purificación del ADN se efectuó de acuerdo con las instrucciones del Kit PureLink® Genomic DNA (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.). El tejido triturado se depositó en un microtubo estéril de 1.5 ml, se agregaron 180  $\mu\text{l}$  del amortiguador para digestión y 20  $\mu\text{l}$  Proteinasa K. Inmediatamente, las muestras se agitaron en un vórtex y se incubaron durante 45 min a  $56^{\circ}\text{C}$  para la lisis del tejido. Más tarde, se agregaron 200  $\mu\text{l}$  del amortiguador lisis/unión PureLink® y se agitó en un vórtex. Consecutivamente, se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de etanol (96-100%), las muestras se mezclaron en un vórtex y el lisado fue transferido a una columna PureLink® acoplada a un tubo colector de 2 ml. Se realizó una centrifugación durante un minuto a 10,000 rpm. En seguida, se descartó el sobrenadante y se colocó la columna en un tubo recolector nuevo. Se agregaron 500  $\mu\text{l}$  de amortiguador de lavado 1 y se centrifugó nuevamente por 1 min a 10,000 rpm; se descartó el sobrenadante y se colocó la columna recolectora en otro tubo. Se agregaron 500  $\mu\text{l}$  del amortiguador de lavado 2 y se centrifugó durante 3 min a 14,000 rpm. Se transfirió la columna recolectora en un microtubo estéril de 1.5 ml y se agregaron 25  $\mu\text{l}$  de agua libre de DNAsas y se procedió a una incubación a temperatura ambiente por 1 min. Seguidamente, se realizó una centrifugación durante 1 min a 8,000 rpm. Finalmente, el ADN recuperado se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis. El ADN genómico fue cuantificado mediante la lectura de la densidad óptica (DO) a 260 nm utilizando un espectrofotómetro nanodrop UV ND-1000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EE. UU.). De igual manera, para verificar la pureza del ADN adicionalmente se realizó una lectura de DO a 280 nm para obtener un índice derivado de la relación de absorbancia a 260nm/280nm, siendo 1.8 una relación perfecta de pureza para

muestras de ADN. La integridad del ADN fue verificada por una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE, a 60 mV durante 90 min.

### **7.3.2.- Amplificación del gen MT-COI con iniciadores universales**

La amplificación enzimática del gen MT-COI se realizó por PCR punto final utilizando iniciadores universales previamente reportados (Folmer *et al.*, 1994). En un tubo de PCR se colocaron 10 ng de ADN, amortiguador de PCR 1X, 200  $\mu$ M de una mezcla de dNTPs, 1  $\mu$ M de cada iniciador universal (sentido LCO1490 5'GGTCAACAATCATAAAGATATTGG3' y anti-sentido HC02198 5'TAAACTTCA GGGTGACCAAAAATCA3'), 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1.25 Unidades de Taq polimerasa® Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA). Todos los reactivos se mezclaron y los tubos se colocaron en el termociclador para la amplificación de acuerdo con el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min, 35 ciclos de amplificación exponencial desnaturalizando a 95°C por 1 min, alineando los iniciadores a 40°C por 1 min, sintetizando el ADN a 72°C durante 1.5 min y un ciclo de extensión final 7 min a 72°C. La eficiencia de la amplificación y la determinación del peso molecular de los amplicones se determinó mediante el corrimiento de una electroforesis al 1.5% de agarosa en TAE 1X a 60 volts durante 1.5 h. El gel agarosa fue visualizado en un transiluminador de luz UV y mediante la comparación de la migración con las bandas de ADN del marcador de 100 pb (Invitrogen, Carlsbad, CA) se corroboró que el amplicón obtenido tuviera 710 pb. Posteriormente, los amplicones de PCR fueron sometidos a una secuenciación Sanger mediante el servicio de Macrogen Inc. (Geumcheon-gu, Seoul República de Korea).

### **7.3.3.- Obtención del código de barras de ADN y análisis de secuencias del gen MT-COI**

Los electroferogramas de las secuencias del gen MT-COI obtenidos fueron visualizados en el programa de libre distribución Chromas Pro para verificar la calidad de la secuenciación. Posteriormente, se realizó la edición y el ensamble de las secuencias usando el programa Bioedit 7.2 (Hall, 1997). Para realizar la identificación de los especímenes por caracteres moleculares, cada secuencia

ensamblada fue comparada con secuencias homólogas ortólogas del gen MT-COI usando el algoritmo Basic Local Alignment Search Tool BLAST (Altschul *et al.*, 1990), suministrado por el National Center for Biotechnology Information NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) o reporte taxonómico de la base de datos BOLD Systems v4. Posteriormente, todas las secuencias ensambladas se utilizaron para obtener el código de barras de cada individuo de las cuatro especies analizadas mediante el registro de las secuencias parciales del gen MT-COI en la base de datos Barcode of Life Data Systems v4 (BOLD Systems <http://www.boldsystems.org>). Una vez que las secuencias fueron validadas para la identificación por códigos de barras de ADN del gen MT-COI para los adultos bajo estudio, se llevó a cabo el análisis bioinformático.

Usando el programa Mega 7 (Kumar *et al.*, 2017), se realizó un alineamiento múltiple de secuencias CLUSTALW como base para la creación de una matriz de distancias por pares y para la construcción de un dendograma. Para la matriz de distancias se consideró una estimación de varianza por el método Bootstrap con 1000 remuestreos, con un modelo de sustitución de nucleótidos mediante el análisis Kimura 2 parámetros y un patrón de distribución gamma. Para la elaboración del árbol, se empleó el análisis de Máxima Verosimilitud con un modelo general reversible en el tiempo en distribución gamma con sitios invariantes (G + I) y un soporte de ramas mediante un análisis de Bootstrap con 1000 remuestreos. El modelo de sustitución nucleotídica se eligió mediante una prueba estadística en donde los modelos con los valores más bajos en el criterio bayesiano son los mejores para describir los patrones de sustitución, encontrando que el modelo GTR+G+I era el que mejor se ajustaba a los datos obtenidos. En total se utilizaron 25 secuencias para la elaboración del dendograma, se obtuvieron de la base de datos de BOLD Systems, considerando como especies cercanas a *Paranomala* a las especies *Anomala innuba* AAH6841 perteneciente al mismo género y *Strigoderma* sp. ABW8722 perteneciente a la misma subfamilia. Mientras que en el caso de *Cyclocephala* se utilizaron las secuencias de las especies *Cyclocephala parallela* AAY5367 perteneciente al mismo género y de la

misma subfamilia *Euetheola humilis* AAH6821. Como grupo externo se utilizó la secuencia de la especie *Diplotaxis* sp. AAN6079 perteneciente a la subfamilia Melolonthinae, ya que es una especie filogenéticamente muy cercana debido a que pertenece a la misma familia.

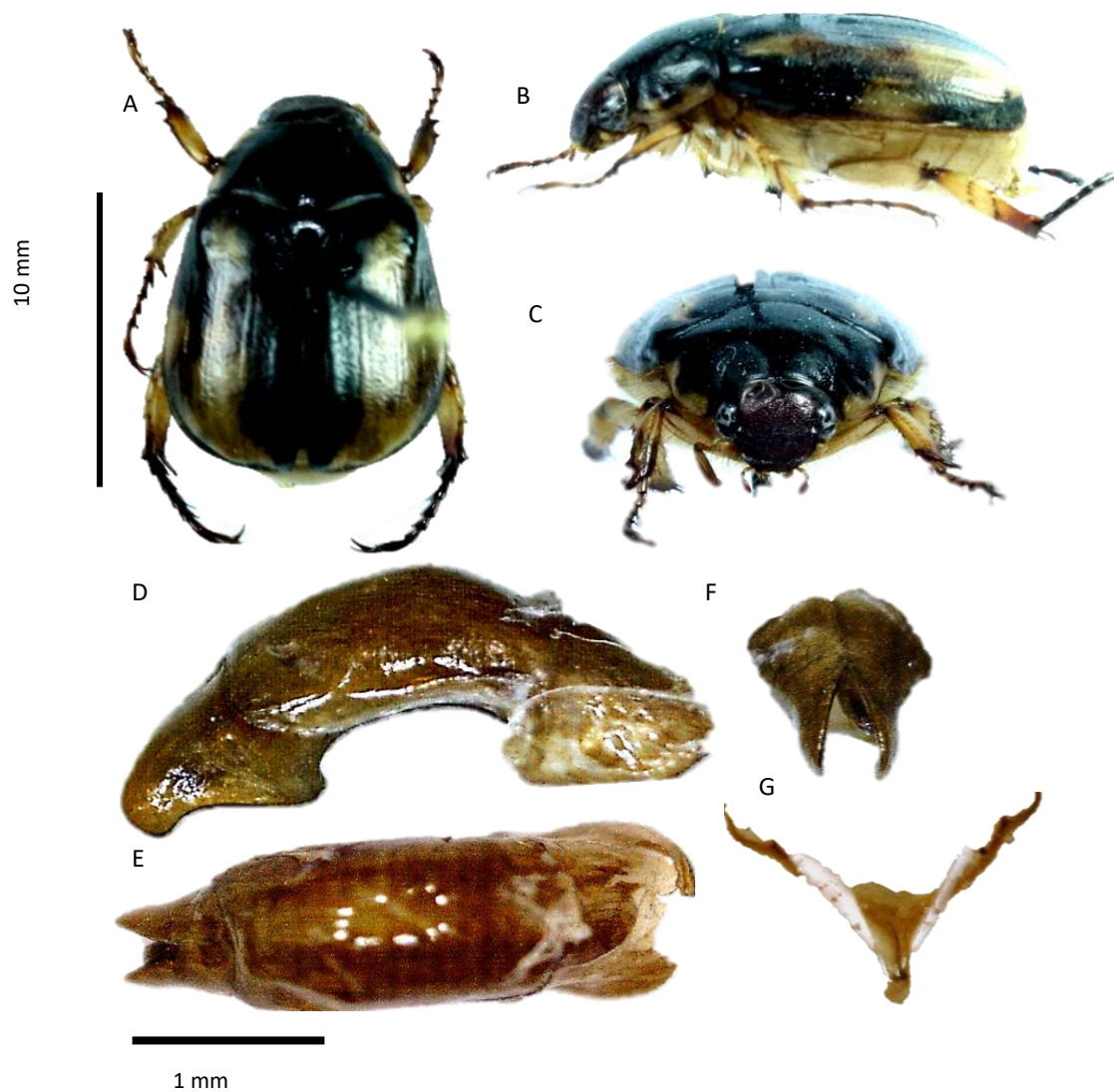
## 8.- Resultados

### 8.1.- Revisión de caracteres morfológicos de adultos

Como parte del ejercicio taxonómico, se inició con la identificación de 42 adultos a nivel de familia, considerando las características siguientes (Cherman y Morón, 2014): maza antenal conformada por tres a siete lamelas brillantes con sedas dispersas; cuerpo oval y con colores diversos; abdomen formado por seis segmentos visibles y segmentos cuarto y quinto con espiráculos situados en los extremos laterales de los esternitos; penúltimo terguito fuertemente esclerosado y fusionado lateralmente con el esternito respectivo, cerca del último par de espiráculos y orificios respiratorios de los últimos tres segmentos abdominales situados cerca del borde superior de los esternitos (condición Pleurostictii).

En el caso de los integrantes del género *Paranomala*, se determinó su identidad para 20 individuos con base en las características siguientes:

*Paranomala hoepfneri*: Los machos presentaron el borde exterior de las mandíbulas expuesto a los lados del clípeo; tercio apical del margen externo de los élitros con una franja ancha, oscura y opaca, así como un margen sutural de los élitros con una franja oscura que se ensanchaba cuando menos en el tercio central; con una longitud corporal de 13-15 mm. Edeago de color pardo rojizo más o menos oscuro, con una longitud de 3.10x1.08 mm, glabro, con parámetros cortos y formando un ángulo de 90° con respecto a la falobase; ápice de los parámetros con simetría rectangular. El *spiculum gastrale* fue visualizado en forma de “Y” con un tamaño de 1.5 mm por la proyección de los brazos separados y con una posición basal curva (Figura 6).



**Figura 6.** Imagen representativa de un adulto macho considerado en el presente estudio como *Paranomala hoepfneri* y de estructuras diagnósticas a nivel de especie. A) Apariencia corporal del ejemplar montado, en posición dorsal; B) Apariencia corporal del ejemplar, en posición lateral; C) Apariencia corporal del ejemplar, en posición frontal; D) Edeago en posición lateral; E) Edeago en posición dorsal; F) Parámetros en posición distal; G) *Spiculum gastrale*.

*Paranomala semicincta*: Los machos presentaron el borde lateral del pronoto moderadamente angulado de color verde metálico intenso y élitros de color café pardo oscuro; placa pigdial punteada con rugosidades dispuestas en sentido concéntrico. El edeago presentó una longitud de 3.18x 1.45 mm, con un color pardo-rojizo más o menos oscuro, con aspecto glabro, parámetros cortos y redondeados, formando un ángulo de 125° con respecto a la falobase; el ápice de los parámetros mostró simetría en forma redonda. Con respecto al *spiculum gastrale*, este presentó forma de “V” con un tamaño de 1.87 mm por la proyección de los brazos separados y con una posición basal recta (Figura 7).

Para el género *Cyclocephala*, se revisaron 22 ejemplares. Los machos revisados mostraron la frente y el pronoto convexo, sin tubérculos, carinas o depresiones; uña interna hendida y más grande que la uña externa; meso y metatibias con ápices rectos, no ensanchados.

*Cyclocephala barrerai*: pronoto y élitros testáceos, sin manchas contrastantes; maza antenal masculina más larga que los artejos precedentes; borde anterior del clípeo estrechamente redondeado y un poco levantado; longitud corporal entre 11 y 14 mm. El edeago presentó una coloración pardo-rojiza, con una longitud de 2.66x1.06 mm, con aspecto glabro, exhibiendo parámetros largos y triangulares en un ángulo de 135° con respecto a la falobase. Los parámetros cuentan con un ápice con simetría ovalada y son más cortos en comparación con la falobase. El *spiculum gastrale* presenta forma de “T”, con un tamaño de 1.95 mm por la proyección de los brazos separados y con una posición basal curva (Figura 8).

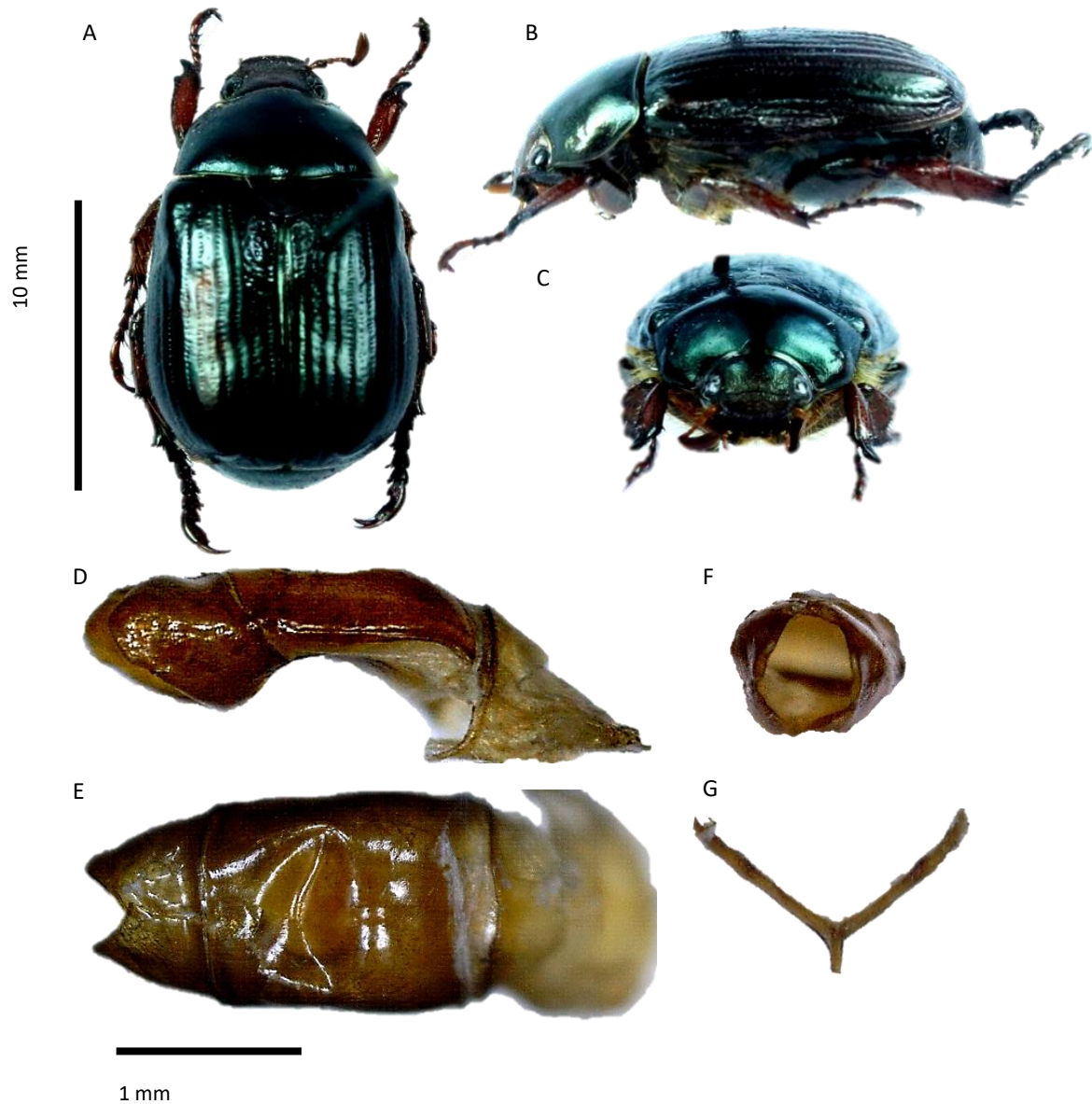


Figura 7. Imagen representativa de un adulto macho considerado en el presente estudio como *Paranomala semicincta* y de estructuras diagnósticas a nivel de especie. A) Apariencia corporal del ejemplar montado, en posición dorsal; B) Apariencia corporal del ejemplar, en posición lateral; C) Apariencia corporal del ejemplar, en posición frontal; D) Edeago en posición lateral; E) Edeago en posición dorsal; F) Parámetros en posición frontal; G) *Spiculum gastrale*.

*Cyclocephala lunulata*: maza antenal masculina más corta que la longitud de todos artejos precedentes; clípeo testáceo con una frente pardo-obscura base del pronoto sin margen, con tres conjuntos de franjas o manchas irregulares poco definidas. Los élitros presentaron una coloración amarilla-pajiza con dos conjuntos de franjas parduzcas transversales, irregulares, sinuosas, muy variables en extensión e intensidad; esternitos y placa pigdial testáceos; longitud corporal entre 13 y 16 mm. El edeago presentó una coloración pardo-rojiza, con una longitud de 3.04x 1.17mm, con aspecto glabro; parámetros largos y triangulares, formando un ángulo de 90° con respecto a la falobase. Los parámetros muestran simetría triangular y son cortos con respecto a la falobase. El *spiculum gastrale* tuvo una forma de “V” con un tamaño de 1.82 mm por la proyección de los brazos separados y con una posición basal curva (Figura 9).

## **8.2.- Estudio taxonómico con caracteres moleculares**

Se obtuvieron veinte secuencias del gen MT-COI de aproximadamente 676 a 688 nucleótidos para la identificación por caracteres moleculares de cinco especímenes de cada especie estudiada. Las secuencias ensambladas fueron sometidas a un reporte taxonómico en la base de datos BOLD Systems, obteniéndose la identidad a través de la comparación con secuencias homólogas ortólogas del gen MT-COI (Cuadro 1). La similitud obtenida de las secuencias indicó que los especímenes pertenecen al orden Coleoptera, a la superfamilia Scarabaeoidea y a la familia Melolonthidae. Diez individuos fueron identificados como miembros de la subfamilia Rutelinae (*Paranomala*) y los otros diez organismos fueron clasificados como parte de la subfamilia Dynastinae (*Cyclocephala*).

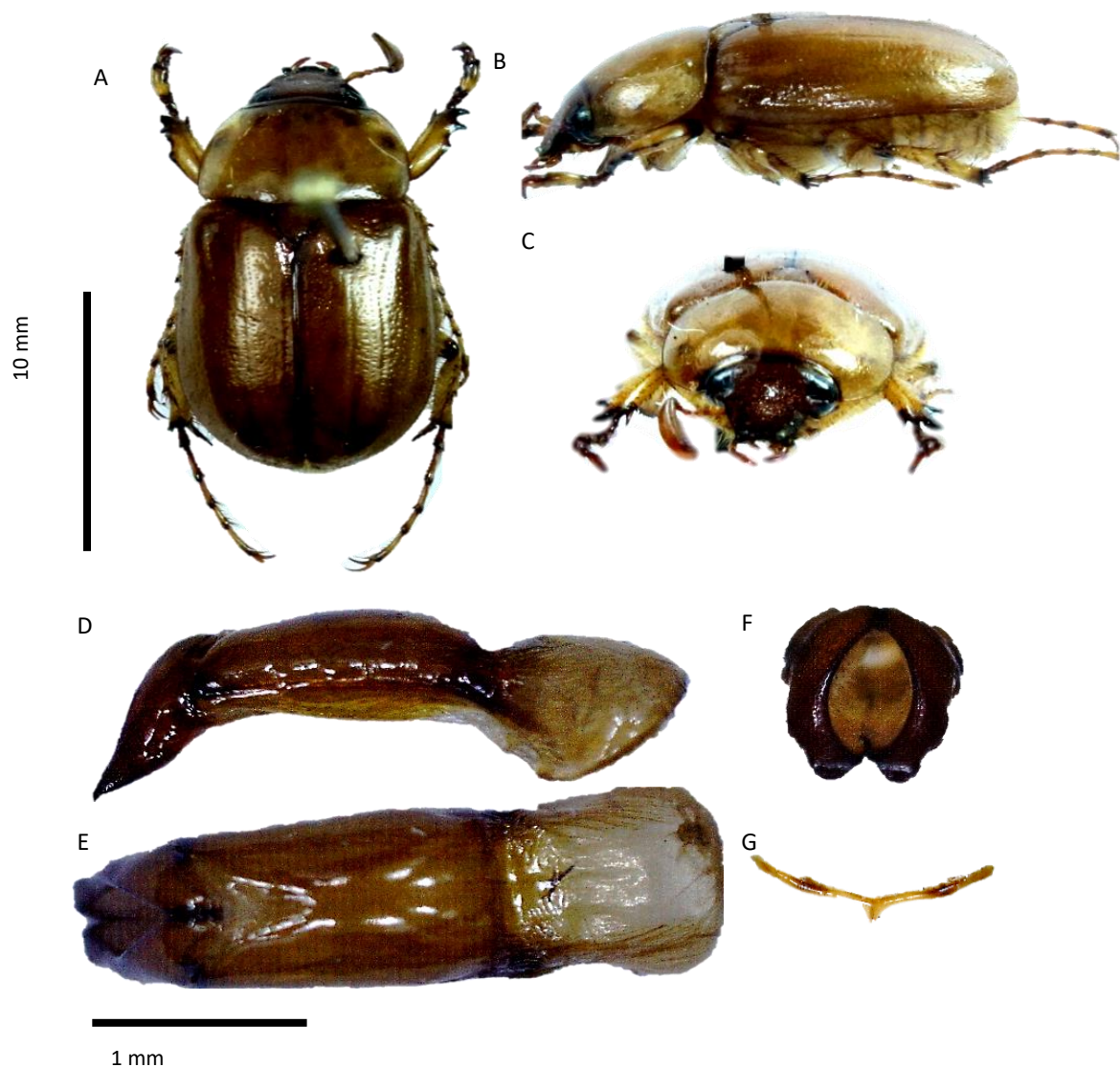


Figura 8. Imagen representativa de un adulto macho considerado en el presente estudio como *Cyclocephala barrerai* y de estructuras diagnósticas a nivel de especie. A) Apariencia corporal del ejemplar montado, en posición dorsal; B) Apariencia corporal del ejemplar, en posición lateral; C) Apariencia corporal del ejemplar, en posición frontal; D) Edeago en posición lateral; E) Edeago en posición dorsal; F) Parámetros en posición distal; G) *Spiculum gastrale*.

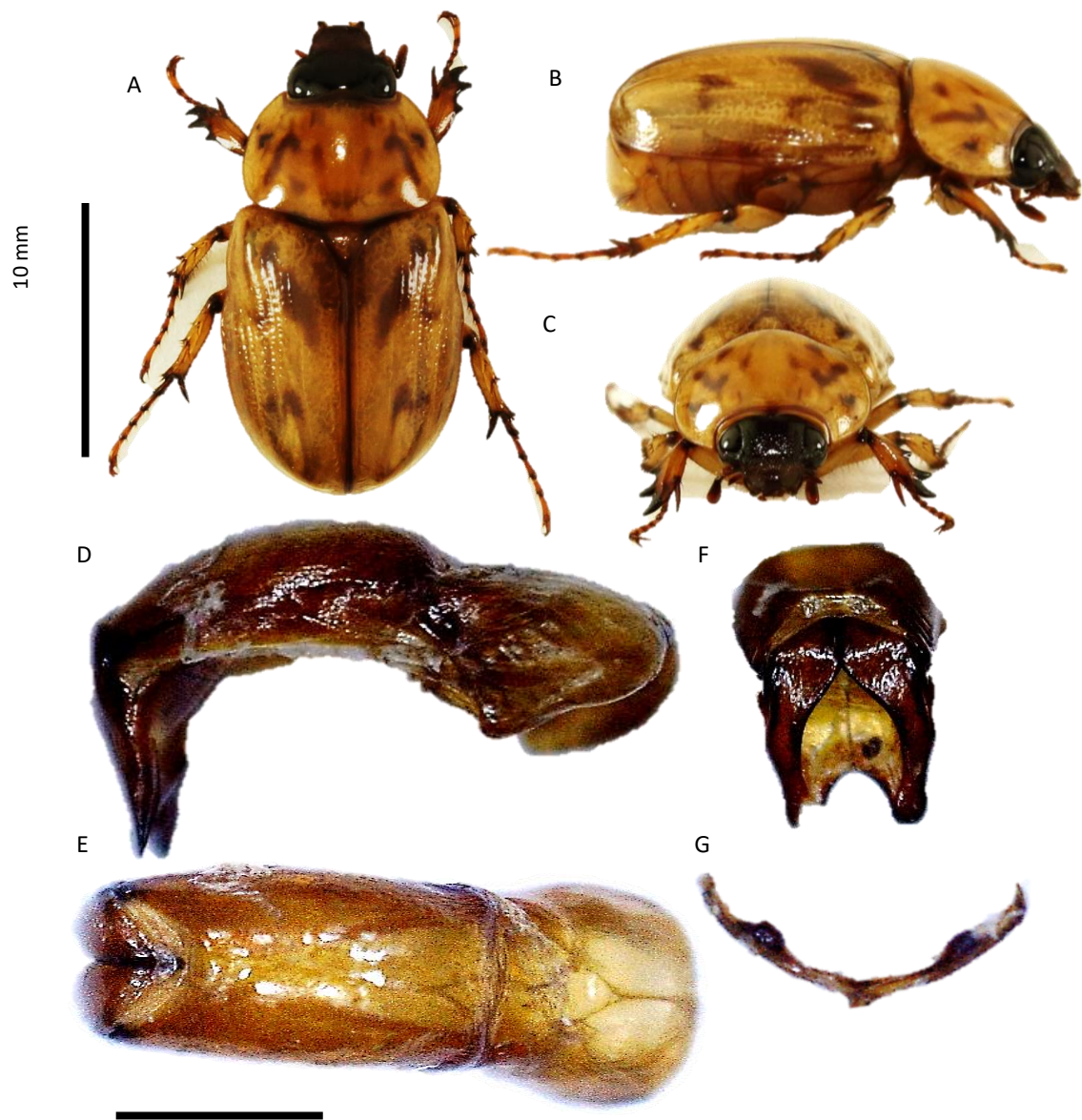


Figura 9. Imagen representativa de un adulto macho considerado en el presente estudio como *Cyclocephala lunulata* y de estructuras diagnósticas a nivel de especie. A) Apariencia corporal del ejemplar montado, en posición dorsal; B) Apariencia corporal del ejemplar, en posición lateral; C) Apariencia corporal del ejemplar, en posición frontal; D) Edeago en posición lateral; E) Edeago en posición dorsal; F) Parámetros en posición distal; G) *Spiculum gastrale*.

**Cuadro 1.- Índice de similitud de las secuencias del gen mitocondrial MT-COI de cinco vouchers de integrantes de *Paranomala* y cinco de *Cyclocephala*. Rango de similitud obtenido por reporte taxonómico en la base de datos BOLD Systems de secuencias homólogas ortólogas del gen MT-COI.**

<b>Especie</b>	<b>Especies comparadas</b>	<b>Índice de similitud</b>
<b><i>Paranomala hoepfneri</i></b>	<i>Anomala digressa</i>	96.46 a 96.16%
	<i>Callistethus parapulcher</i>	91.4%
	<i>Callistethus lativittis</i>	91.4 a 91.06%
<b><i>Paranomala semicincta</i></b>	<i>Callistethus multiplicatus</i>	89.21 a 88.69%
	<i>Callistethus specularis</i>	89.16 a 88.53%
	<i>Anomala marginata</i>	88.38%
<b><i>Cyclocephala barrerai</i></b>	<i>Cyclocephala pasadenae</i>	92.72 a 92.17%
	<i>Cyclocephala lurida</i>	91.71 a 91.4%
	<i>Cyclocephala castaniella</i>	89.25%
	<i>Cyclocephala parallela</i>	89.09 a 88.17%
	<i>Cyclocephala borealis</i>	88.63 a 87.86%
<b><i>Cyclocephala lunulata</i></b>	<i>Dyscinetus dubius</i>	92.92 a 92.26%
	<i>Cyclocephala williami</i>	92.17%
	<i>Cyclocephala signaticollis</i>	88.08 a 87.74%
	<i>Cyclocephala insulicola</i>	87.45 a 87.04%

### **8.3.- Registro de secuencias del gen MT-COI**

La información obtenida en este trabajo fue de secuencias parciales del gen MT-COI recopiladas de la base de datos BOLD Systems y se obtuvo el código de barras para veinte especímenes. Fue así como se adquirió un Número de Índice de Código de Barras (BIN, Barcode Index Number, por sus siglas en inglés) para cada uno de los cinco vouchers revisados por cada especie (Cuadro 2). Las trazas, secuencias y código de barras obtenidas para los vouchers de los adultos revisados y ubicados a nivel de especie, se muestran en las Cuadros 3, 4, 5 y 6. Las trazas muestran el electroferograma obtenido del secuenciador indica una buena calidad de la secuencia debido a que no se observa ruido en la base de la línea y los picos de la señal de cada nucleótido están bien definidos sin interferencias ni solapamiento, las secuencias editadas y ensambladas en dirección sentido y el código de barras obtenido de la base de datos de BOLD Systems que representa la secuencia en líneas verticales asignando el color verde para

Adenina, rojo para Timina, amarillo para los nucleótidos de Guanina y azul para Citosina.

**Cuadro 2.- BIN's de especies registradas.** Se muestran los BIN's asignados a cada uno de los *vouchers* de los adultos revisados, a partir de la base de datos de BOLD Systems.

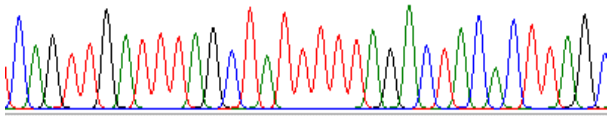
<b>Ejemplar</b>	<b>BIN</b>
<b><i>Paranomala hoepfneri</i></b> <b><i>PhV1, PhV2, PhV3, PhV4 y PhV5</i></b>	ADK8884
<b><i>Paranomala semicineta</i></b> <b><i>PsV1, PsV2, PsV3, PsV4 y PsV5</i></b>	ADK8945
<b><i>Cyclocephala barrerae</i></b> <b><i>CbV1, CbV2, CbV3, CbV4 y CbV5</i></b>	ADK8931
<b><i>Cyclocephala lunulata</i></b> <b><i>CIV1, CIV2, CIV3, CIV4 y CIV5</i></b>	ADK9101

BIN= Barcode Index Number / V= *voucher*

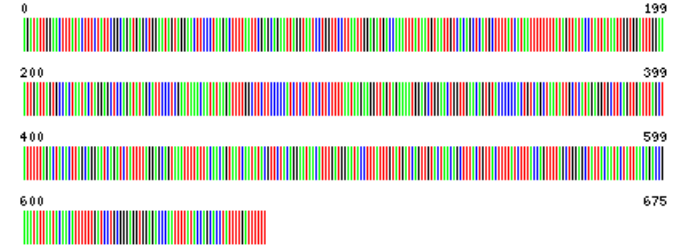
**Cuadro 3. Caracteres moleculares registrados para adultos de *Paranomala hoepfneri*. Muestra el número de *voucher* para la especie, trazas, secuencias y código de barras asignado por BOLD Systems.**

### *Paranomala hoepfneri* V1

CAGTTGATTTAGCTATTTTAGACTACACTTAGC

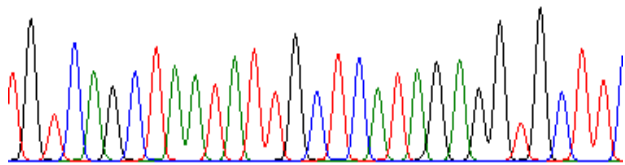


AGATATTGGAACCTTATACTTTCTATTTCGGCAGATGAGCTGGA  
 ATAGTAGGAACCTCCCTAAGACTTTTAATTCGAGCAGAATTAG  
 GTAATCCTGGTTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTA  
 ATTGTCACAGCTCATGCTTTTATCATAATTTTTTTATAGTTATA  
 CCTATTATAATTGGTGGATTTGGAAATGATTAGTGCCACTAAT  
 ACTAGGAGCTCCAGATATAGCATTCCCTCGAATAACAATATA  
 AGATTTTGGCTTCTTCCCCATCTCTTACTCTTCTTTAATAAG  
 AAGTTAGTAGAAAATGGAGCTGGAACCTGGTTGAACAGTGTA  
 CCCCCACTGTCAGCTAATATTGCTCATAGAGGTGCTTCAGTT  
 GATTTAGCTATTTTAGACTACACTTAGCAGGAATCAGATCTAT  
 TTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATCAATATACGTT  
 CTACAGGAATAACATTTGATGGAATACCTTTATTTGTATGATCA  
 GTTGTACTAACAGCTTTACTGTTACTTTTATCTTTACCAGTTTTA  
 GCTGGAGCTATTACAATACTATTAACAGACCGAAATATTAATAC  
 AACATTTTTGATCCTGCGGGAGGTGGAGACCCAATTTTATAC  
 CAGCACCTATTTGATTTTTT

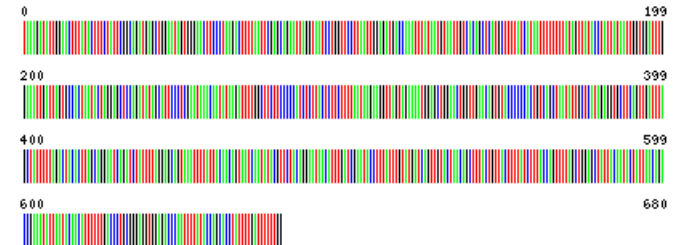


### *Paranomala hoepfneri* V2

FGTCAGCTAATATTGCTCATAGAGGTGCTT

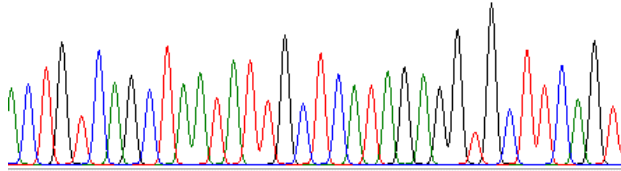


TAAAGATATTGGAACCTTATACTTTCTATTTCGGCAGATGAGCTG  
 GAATAGTGGGAACCTCCCTAAGACTTTTAATTCGAGCAGAATT  
 AGGTAATCCTGGTTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATG  
 TAATTGTCACAGCTCATGCTTTTATCATAATTTTTTTATAGTTA  
 TACCTATTATAATTGGTGGATTTGGAAATGATTAGTGCCACTA  
 ATACTAGGAGCTCCAGATATAGCATTCCCTCGAATAACAATA  
 TAAGATTTTGGCTTCTTCCCCATCTCTTACTCTTCTTTAATAA  
 GAAGTTAGTAGAAAATGGAGCTGGAACCTGGTTGAACAGTGT  
 ACCCCCCACTGTCAGCTAATATTGCTCATAGAGGTGCTTCAGT  
 TGATTTAGCTATTTTAGACTACACTTAGCAGGAATCAGATCTA  
 TTTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATCAATATACGTT  
 TCTACAGGAATAACATTTGATCGAATACCTTTATTTGTATGATC  
 AGTTGTACTAACAGCTTTACTGTTACTTTTATCTTTACCAGTTTT  
 AGCTGGAGCTATTACAATACTATTAACAGACCGAAATATTAATA  
 CAACATTTTTGACCCTGCGGGAGGTGGAGACCCAATTTTATA  
 CCAGCACCTATTTGATTTTTGG

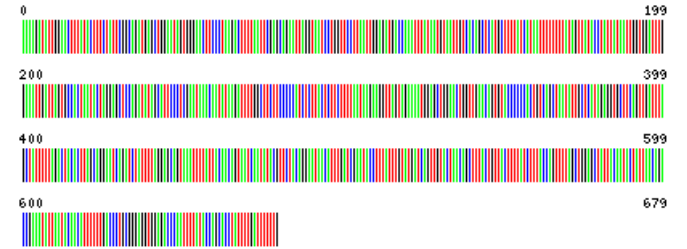


## *Paranomala hoepfneri* V3

A C T G T C A G C T A A T A T T G C T C A T A G A G G T G C T T C A G T

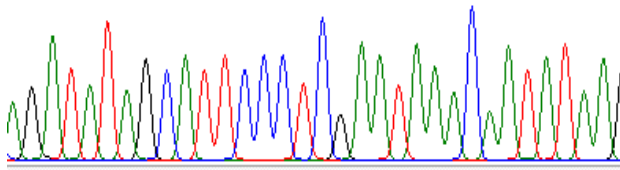


AAAAGATATTGGAACCTTTACTTTCTATTTCGGCAGATGAGCTG  
GAATAGTGGGAACCTCCCTAAGACTTTTAATTCGAGCAGAATT  
AGGTAATCCTGGTTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATG  
TAATTGTCACAGCTCATGCTTTTATCATAATTTTTTTATAGTTA  
TACCTATTATAATTGGTGGATTTGGAAAATTGATTAGTGCCACTA  
ATACTAGGAGCTCCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAACAATA  
TAAGATTTTGGCTTCTTCCCCATCTCTTACTCTTCTTTAATAA  
GAAGGTTAGTAGAAAATGGAGCTGGAACCTGGTTGAACAGTGT  
ACCCCCACTGTCAGCTAATATTGCTCATAGAGGTGCTTCAGT  
TGATTTAGCTATTTTTAGACTACACTTAGCAGGAATCAGATCTA  
TTTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATCAATATACGT  
TCTACAGGAATAACATTTGATCGAATACCTTTATTTGTATGATC  
AGTTGACTAACAGCTTTACTGTTACTTTTATCTTTACCAGTTT  
AGCTGGAGCTATTACAATACTATTAACAGACCGAAATATTAATA  
CAACATTTTTGACCCTGCGGGAGGTGGAGACCCAATTTTATA  
CCAGCACCTATTTTGATTTTTT

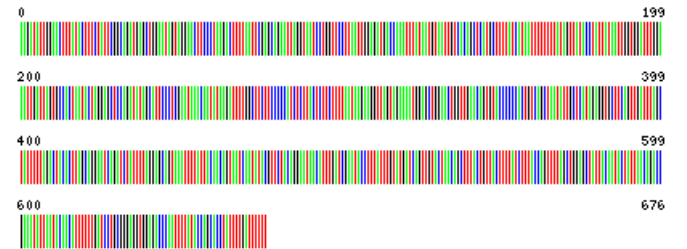


## *Paranomala hoepfneri* V4

A G A T A T A G C A T T C C C T C G A A T A A A C A A T A T A A C



AAGATATTGGAACCTTTACTTTCTATTTCGGCAGATGAGCTGG  
AATAGTAGGAACTCCCTAAGACTTTTAATTCGAGCAGAATTA  
GGTAATCCTGGTTCCTTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGT  
AATTGTCACAGCTCATGCTTTTATCATAATTTTTTTATAGTTAT  
ACCTATTATAATTGGTGGATTTGGAAAATTGATTAGTGCCACTAA  
TACTAGGAGCTCCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAACAATAT  
AAGATTTTGGCTTCTTCCCCATCTCTTACTCTTCTTTAATAA  
GAAGGTTAGTAGAAAATGGAGCTGGAACCTGGTTGAACAGTGT  
ACCCCCACTGTCAGCTAATATTGCTCATAGAGGTGCTTCAGT  
TGATTTAGCTATTTTTAGACTACACTTAGCAGGAATCAGATCTA  
TTTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAACAGTAATCAATATACGT  
TCTACAGGAATAACATTTGATCGAATACCTTTATTTGTATGATC  
AGTTGACTAACAGCTTTACTGTTACTTTTATCTTTACCAGTTT  
AGCTGGAGCTATTACAATACTATTAACAGACCGAAATATTAATA  
CAACATTTTTGATCCTGCGGGAGGTGGAGACCCAATTTTATA  
CCAGCACCTATTTTGATTTTTT

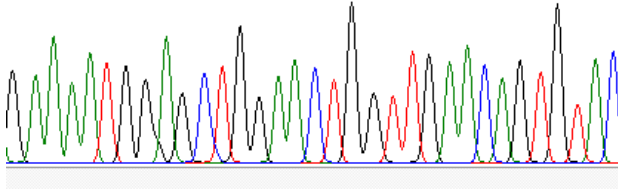


---

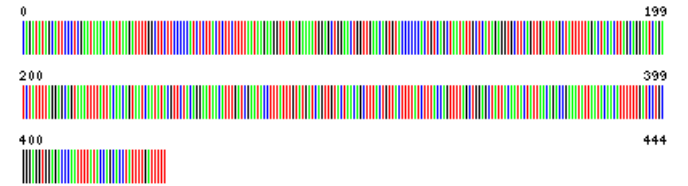
## *Paranomala hoepfneri* V5

---

G AAAATGGAG CTGGAACTGG TTGAACAGTG TAC



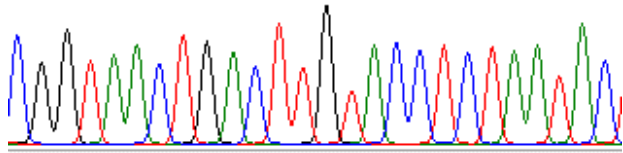
CAGATATAGCATTCCCTCGAATAAACAATATAAGATTTTGGCTT  
CTTCCCCATCTCTTACTCTTCTTTTAATAAGAAGGTTAGTAGA  
AAATGGAGCTGGAACCTGGTTGAACAGTGTACCCCCACTGTC  
AGCTAATATTGCTCATAGAGGTGCTTCAGTTGATTTAGCTATTT  
TTAGACTACACTTAGCAGGAATCAGATCTATTTTAGGAGCAGT  
AAATTTTATTACAACAGTAATCAATATACGTTCTACAGGAATAA  
CATTTGATCGAATACCTTTATTTGTATGATCAGTTGTAATAACA  
GCTTTACTGTTACTTTTATCTTTACCAGTTTTAGCTGGAGCTAT  
TACAATACTATTAACAGACCGAAATATTAATACAACATTTTTTG  
ATCCTGCGGGAGGTGGAGACCCAATTTTATACCAGCACCTATT  
TTGATTTTT



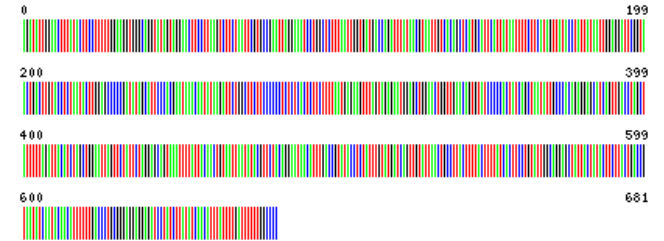
**Cuadro 4. Caracteres moleculares registrados para adultos de *Paranomala semicincta*. Muestra el número de *voucher* para la especie, trazas, secuencias y código de barras asignado por BOLD Systems.**

### *Paranomala semicincta* V1

CGG TAACTGACTTGTACCTCTAATAC

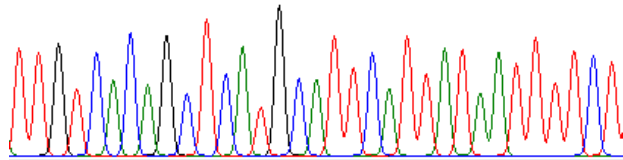


AGATATTGGAACCTTATACTTCCTTTTTGGAAGGTGGGCAGGT  
 ATAGTAGGAACCTCCTTAAGTCTTCTAATTCGTGCCGAATTAG  
 GAAATCCTGGCTCTTAATTGGTGATGACCAGATTATAACGT  
 AATTGTCACAGCTCATGCATTCATTATAATTTTCTCATAGTTAT  
 ACCTATTATAATTGGAGGATTCGGTAACTGACTTGTACCTCTAA  
 TACTTGGAGCCCCGATATAGCATTCCCACGAATAACAATAT  
 AAGATTCTGGCTTCTCCCCCTCTCTCACTCTTCTTTAATGA  
 GAAGTTTAGTAGAGAATGGAGCTGGAAGTGGTTGAACAGTGT  
 ATCCCCACTATCAGCTAATATTGCCACAGAGGAGCATCAGT  
 TGACCTAGCTATTTTAGATTACATCTAGCTGGAATTAGTTCTA  
 TTCTAGGAGCAGTAAATTTATTACAACGTAAATTAATATACGT  
 TCTACAGGAATAACATTTGACCGTATACCTCTATTTGTATGATC  
 AGTTGTATTAACAGCTTACTTTTACTTTTATCACTTCCTGTATT  
 GGCAGGAGCTATTACTATACTTCTTACTGACCGTAAATATCAATA  
 CAACATTTTTTGACCCTGCGGGAGGAGGATCCTATCTTATA  
 TCAACATTTTTGATTTTTGGCCCC

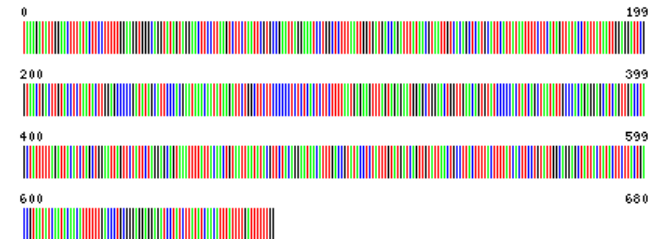


### *Paranomala semicincta* V2

TTGT CACAGCTCATGCAATTCATTATAAATTTCT

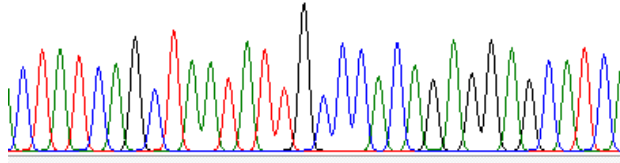


TAAAGATATTGGAACCTTATACTTCCTTTTTGGAAGGTGGGCA  
 GGTATAGTAGGAACCTCCTTAAGTCTTCTAATTCGTGCCGAAT  
 TAGGAAATCCTGGCTCTTAATTGGTGATGACCAGATTATAA  
 CGTAATTGTCACAGCTCATGCATTCATTATAATTTTCTCATAG  
 TTATACCTATTATAATTGGAGGATTCGGTAACTGACTTGTACCT  
 CTAATACTTGGAGCCCCGATATAGCATTCCCACGAATAAACA  
 ATATAAGATTCTGGCTTCTCCCCCTCTCTCACTCTTCTTTTA  
 ATGAGAAGTTTAGTAGAGAATGGAGCTGGAAGTGGTTGAACA  
 GTGTATCCCCACTATCAGCTAATATTGCCACAGAGGAGCAT  
 CAGTTGACCTAGCTATTTTAGATTACATCTAGCTGGAATTAGT  
 TCTATTCTAGGAGCAGTAAATTTATTACAACGTAAATTAATATA  
 CGTTCTACAGGAATAACATTTGACCGTATACCTCTATTTGTATG  
 ATCAGTTGTATTAACAGCTTACTTTTACTTTTATCACTTCCTGT  
 ATTGGCAGGAGCTATTACTATACTTCTTACTGACCGTAAATATCA  
 ATACAACATTTTTTGACCCTGCGGGAGGAGGATCCTATCTT  
 ATATCAACATTTTTGATTTTTGG

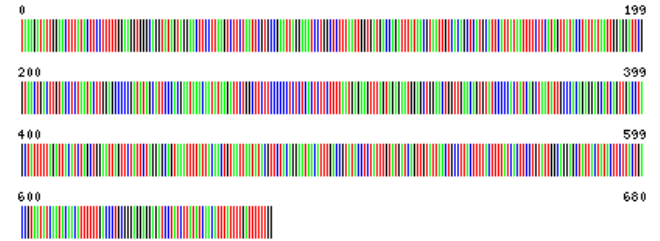


### *Paranomala semicineta* V3

.CTATCAGCTAATATTGCCACAGAGGAGCATCA

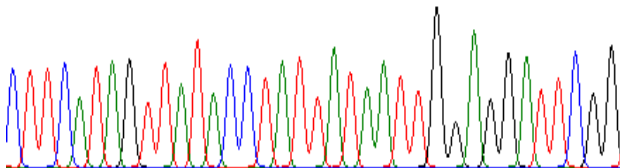


TAAAGATATTGGAACCTTATACTTCCTTTTTGGAAGGTGGCA  
GGTATAGTAGGAACCTCCTAAGTCTTCTAATTGGTGCCGAAT  
TAGGAAATCCTGGCTCTTAATTGGTGATGACCAGATTTATAA  
CGTAATTGTCACAGCTCATGCATTCATTATAATTTCTTCATAG  
TTATACCTATTATAAATTGGAGGATTCGGTAACTGACTTGTACCT  
CTAATACTTGGAGCCCCGATATAGCATTCCCACGAATAAACA  
ATATAAGATTCTGGCTTCTTCCCCCTCTCTCACTCTTCTTTTA  
ATGAGAAGTTTAGTAGAGAATGGAGCTGGAAGTGGTTGAACA  
GTGTATCCCCCACTATCAGCTAATATTGCCACAGAGGAGCAT  
CAGTTGACCTAGCTATTTTTAGATTACATCTAGCTGGAATTAGT  
TCTATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAAGTGAATTAATATA  
CGTTCTACAGGAATAACATTTGACCGTATACCTCTATTTGTATG  
ATCAGTTGTATTAAGTGCCTTACTTTTACTTTTATCACTTCCTGT  
ATTGGCAGGAGCTATTACTATACTTCTTACTGACCGTAATATCA  
ATACAACATTTTTGACCCTGCGGGAGGAGGAGATCCTATCTT  
ATATCAACATTTATTTTGATTTTTGG

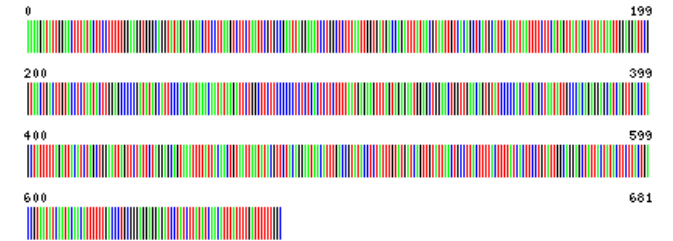


### *Paranomala semicineta* V4

CTTCATAGTTATACCTATTATAATTGGAGGATTCGG

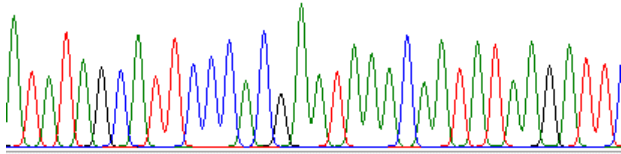


AAAAGATATTGGAACCTTATACTTCCTTTTTGGAAGGTGGCA  
GGTATAGTAGGAACCTCCTAAGTCTTCTAATTGGTGCCGAAT  
TAGGAAATCCTGGCTCTTAATTGGTGATGACCAGATTTATAA  
CGTAATTGTCACAGCTCATGCATTCATTATAATTTCTTCATAG  
TTATACCTATTATAAATTGGAGGATTCGGTAACTGACTTGTACCT  
CTAATACTTGGAGCCCCGATATAGCATTCCCACGAATAAACA  
ATATAAGATTCTGGCTTCTTCCCCCTCTCTCACTCTTCTTTTA  
ATGAGAAGTTTAGTAGAGAATGGAGCTGGAAGTGGTTGAACA  
GTGTATCCCCCACTATCAGCTAATATTGCCACAGAGGAGCAT  
CAGTTGACCTAGCTATTTTTAGATTACATCTAGCTGGAATTAGT  
TCTATTCTAGGAGCAGTAAATTTTATTACAAGTGAATTAATATA  
CGTTCTACAGGAATAACATTTGACCGTATACCTCTATTTGTATG  
ATCAGTTGTATTAAGTGCCTTACTTTTACTTTTATCACTTCCTGT  
ATTGGCAGGAGCTATTACTATACTTCTTACTGACCGTAATATCA  
ATACAACATTTTTGACCCTGCGGGAGGAGGAGATCCTATCTT  
ATATCAACATTTATTTTGATTTTTGGC

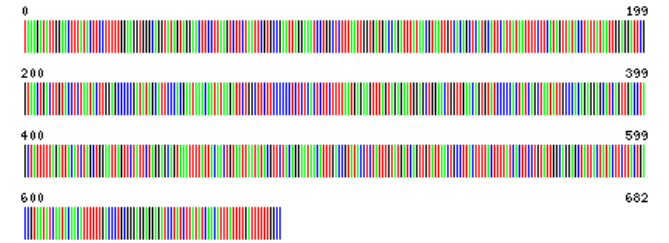


## *Paranomala semicineta* V5

ATATAGCATTCCACGAATAACAATATAAGATT

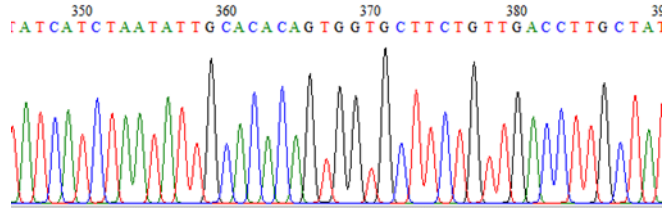


TAAAGATATTGGAACCTTATACTTCCTTTTTGGAAGGTGGGCA  
GGTATAGTAGGAACCTCCTTAAGTCTTCTAATTGGTGCCGAAT  
TAGGAAATCCTGGCTCTTAATTGGTGATGACCAGATTTATAA  
CGTAATTGTCACAGCTCATGCATTCATTATAATTTCTTCATAG  
TTATACCTATTATAATTGGAGGATTCGGTAACTGACTTGTACCT  
CTAATACTTGGAGCCCCGATATAGCATTCCCACGAATAAACA  
ATATAAGATTCTGGCTTCTTCCCCCTCTCACTCTTCTTTTA  
ATGAGAAGTTTAGTAGAGAATGGAGCTGGAAGTGGTTGAACA  
GTGTATCCCCACTATCAGCTAATATTGCCACAGAGGAGCAT  
CAGTTGACCTAGCTATTTTTAGATTACATCTAGCTGGAATTAGT  
TCTATTCTAGGAGCAGTAAATTTATTACAAGTGAATTAATATA  
CGTTCTACAGGAATAACATTTGACCGTATACCTCTATTTGTATG  
ATCAGTTGTATTAAGTGCCTTACTTTTACTTTTATCACTTCCTGT  
ATTGGCAGGAGCTATTAATACTTCTTACTGACCGTAATATCA  
ATACAACATTTTTGACCCTGCGGGAGGAGGAGATCCTATCTT  
ATATCAACATTTATTTGATTTTTGGCC

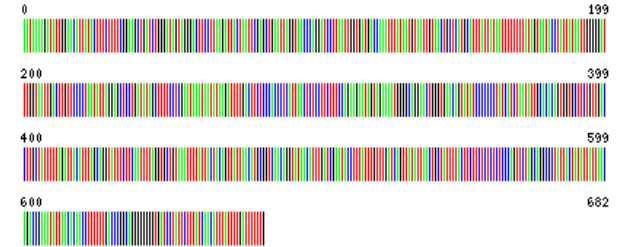


**Cuadro 5. Caracteres moleculares registrados para adultos de *Cyclocephala barrerai*. Muestra el número de *voucher* para la especie, trazas, secuencias y código de barras asignado por BOLD Systems.**

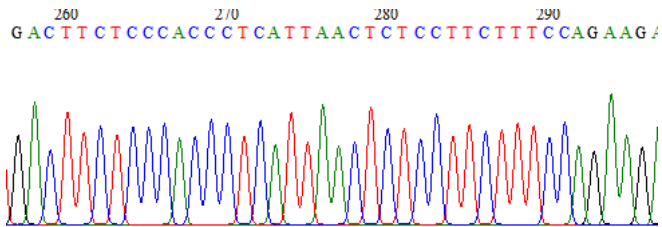
### *Cyclocephala barrerai* V1



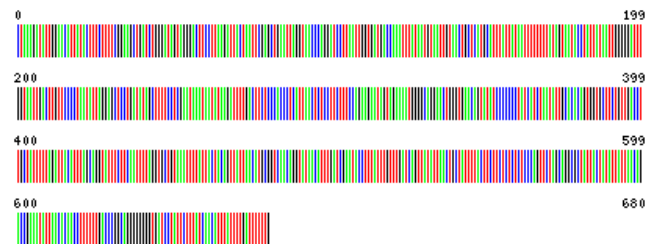
AATAAAGATATTGGAACATTATACTTTCTTTTCGGAAGCTGAT  
 CTGGGATAGTAGGGACTTCCTTAAGATTACTAATTCGAGCTGA  
 ATTAGGTAACCCAGGATCCTTAATTGGTGATGACCAAATTTATA  
 ATGTAATTGTAAGTGCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAG  
 TAATACCTATTATAAATGGGGGATTTGGTAATTGACTTGTTCCC  
 CTAATATTAAGGAGCTCCTGATATAGCTTTTCTCGAATAAATA  
 TATAAGATTTTGACTTCTCCACCCTCATTAACTCTCCTTCTTT  
 CCAGAAGAATAGTAGAAAATGGGGCAGGAAGTGGGTGAACAG  
 TATATCCCCCCTATCATCTAATATTGCACACAGTGGTGCTTCT  
 GTTGACCTTGCTATTTTTAGATTACATTTAGCAGGTATTTCTTC  
 AATTTAGGTGCTGTAAATTTTATTACTACAGTTATTAACATGC  
 GGTCAACAGGTATAACATTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGA  
 TCAGTTATATTAAGTGCATTTTACTTCTCTCTCTCCAGTT  
 CTAGCAGGCGCTATTACTATATTATTAACAGACCGAAATATTA  
 CACAACCTTTTTTGACCCGGCAGGGGGGGTGTATCTATTCT  
 TTATCAACATTTATTTGATTTTTTG



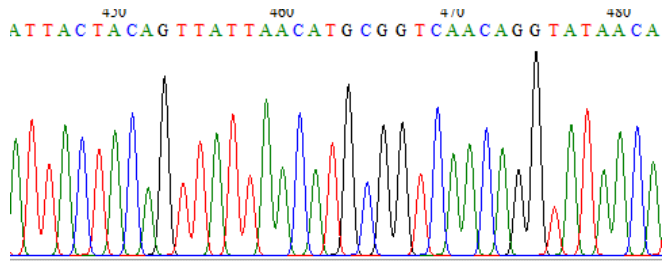
### *Cyclocephala barrerai* V2



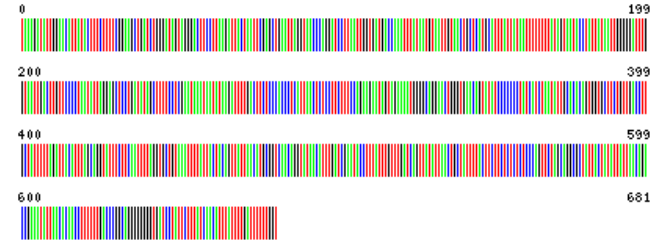
CTAAAGATATTGGAACATTATACTTTCTTTTCGGAAGCTGATCT  
 GGGATAGTAGGGACTTCCTTAAGATTACTAATTCGAGCTGAAT  
 TAGGTAACCCAGGATCCTTAATTGGTGATGACCAAATTTATAAT  
 GTAATTGTAAGTGCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAGTA  
 ATACCTATTATAAATGGGGGATTTGGTAATTGACTTGTTCCCCT  
 AATATTAGGAGCTCCTGATATAGCTTTTCTCGAATAAATAATA  
 TAAGATTTTGACTTCTCCACCCTCATTAACTCTCCTTCTTTCC  
 AGAAGAATAGTAGAAAATGGGGCAGGAAGTGGGTGAACAGTA  
 TATCCCCCCTATCATCTAATATTGCACACAGTGGTGCTTCTG  
 TTGACCTTGCTATTTTTAGATTACATTTAGCAGGTATTTCTTCA  
 ATTTTAGGTGCTGTAAATTTTATTACTACAGTTATTAACATGCG  
 GTCAACAGGTATAACATTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGA  
 CAGTTATATTAAGTGCATTTTACTTCTCTCTCTCCAGTT  
 CTAGCAGGCGCTATTACTATATTATTAACAGACCGAAATATTA  
 CACAACCTTTTTTGACCCGGCAGGGGGGGTGTATCTATTCT  
 TTATCAACATTTATTTGATTTTTTG



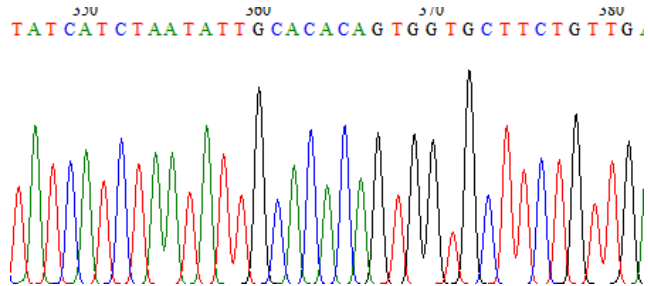
## Cyclocephala barrerai V3



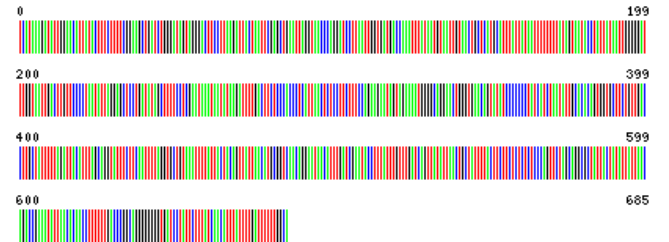
TAAAGATATTGGAACATTATACTTTCTTTTCGGAAGCTGATCTG  
GGATAGTAGGGACTTCCTTAAGATTACTAATTCGAGCTGAATT  
AGGTAACCCAGGATCCTTAATTGGTGATGACCAAATTTATAAT  
GTAATTGTAAGTCTCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAGTA  
ATACCTATTATAATTGGGGGATTTGGTAATTGACTTGTCCCT  
AATATTAGGAGCTCCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATAATA  
TAAGATTTTGACTTCTCCACCCTCATTAACTCCTTCTTTCC  
AGAAGAATAGTAGAAAATGGGGCAGGAAGTGGTGAACAGTA  
TATCCCCCCTATCATCTAATATTGCACACAGTGGTGCTTCTG  
TTGACCTTGCTATTTTTAGATTACATTTAGCAGGTATTTCTTCA  
ATTTTAGGTGCTGTAAATTTTACTACAGTTATTAACATGCG  
GTCAACAGGTATAACATTTGATCGAATACCTTTATTTGTTGAT  
CAGTTATTAACAGTCTATTTACTTCTTCTCTCTCCAGTT  
CTAGCAGGCGCTATTACTATATTATTAACAGACCGAAATATTA  
CACAACTTTTTGACCCGGCAGGGGGGGTATCCTATTCT  
TTATCAACATTTATTTGATTTTTGGT



## Cyclocephala barrerai V4

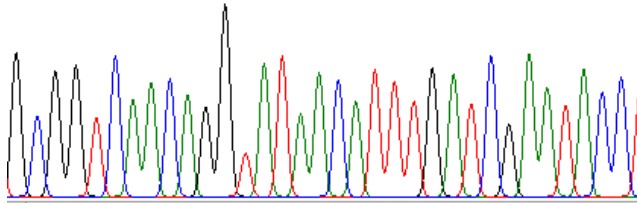


TCATAAGATATTGGAACATTATACTTTCTTTTCGGAAGCTGAT  
CTGGGATAGTAGGGACTTCCTTAAGATTACTAATTCGAGCTGA  
ATTAGGTAACCCAGGATCCTTAATTGGTGATGACCAAATTTATA  
ATGTAATTGTAAGTCTCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAG  
TAATACCTATTATAATTGGGGGATTTGGTAATTGACTTGTCC  
CTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAATA  
TATAAGATTTGACTTCTCCACCCTCATTAACTCCTTCTTT  
CCAGAAGAATAGTAGAAAATGGGGCAGGAAGTGGTGAACAG  
TATATCCCCCCTATCATCTAATATTGCACACAGTGGTGCTTCT  
GTTGACCTTGCTATTTTTAGATTACATTTAGCAGGTATTTCTT  
AATTTAGGTGCTGTAAATTTTACTACAGTTATTAACATGC  
GGTCAACAGGAATAACATTTGATCGAATACCTTTATTTGTTGA  
TCAGTTATTAACAGTCTATTTACTTCTTCTCTCTCCAGTT  
CTAGCAGGCGCTATTACTATATTATTAACAGACCGAAATATTA  
CACAACTTTTTGACCCGGCAGGGGGGGTATCCTATTCT  
TTATCAACATTTATTTGATTTTTGGCA

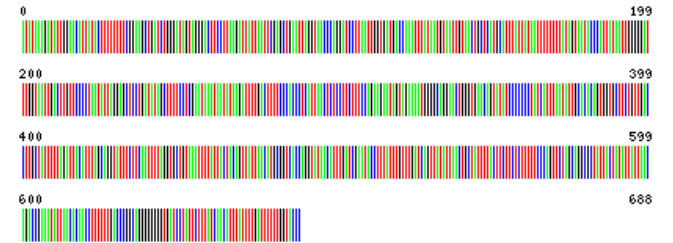


## *Cyclocephala barrerai* V5

G C G G T C A A C A G G T A T A A C A T T T G A T C G A A T A C C T



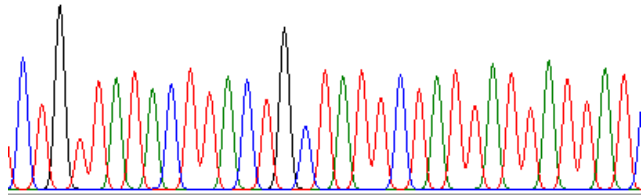
ATATAAAGATATTGGAACATTATACTTTTTTTTCGGAAGCTGAT  
CTGGGATAGTAGGGACTTCCTTAAGATTATTAATTCGAGCTGA  
ATTAGGTAACCCAGGATCCTTAATTGGTGATGACCAAATTTATA  
ATGTAATTGTAAGTGCATGCATTTATTATAATTTTTTTATAG  
TAATACCCATTATAATTGGGGGATTTGGTAATTGACTTGTTCCC  
CTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCTTTTTCTCGAATAAATA  
TATAAGATTTTGACTTTTCCACCCCTCATTAACTCTCCTCTTT  
CCAGAAGAATAGTAGAAAATGGGGCAGGAAGTGGTGAAACAG  
TATATCCCCCCTATCATTAAATATTGCACACAGTGGTGCTTCT  
GTTGACCTTGCTATTTTTAGATTACATTTAGCAGGTATTTCTTC  
AATTTTAGGTGCTGTAAATTTTATTACTACAGTTATTAACATGC  
GGTCACCAGGTATAACATTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGA  
TCAGTTATTAAGTCTATTTACTTCTTCTTTTTCCAGTT  
CTAGCAGGCGCTATTACTATATTATTAACAGACCGAAATATTA  
CACAACTTTTTTGACCCGGCAGGGGGGGTATCCTATTCT  
TTATCAACATTTATTTGATTTTTTGGTACCC



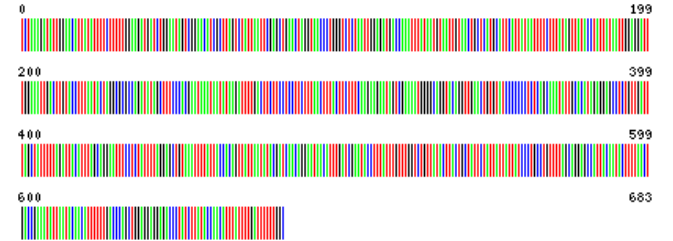
**Cuadro 6. Caracteres moleculares registrados para adultos de *Cyclocephala lunulata*. Muestra el número de voucher para la especie, trazas, secuencias y código de barras asignado por BOLD Systems.**

### *Cyclocephala lunulata* V1

CTGTTATACTTACTGCTAATCTAATTATTAT

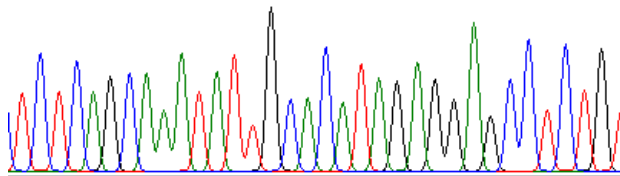


TCTAAAGATATTGGAACATTATATTTCTTTTTGGAAGATGATC  
 TGGAATAGTCGGAACATCGCTTAGTCTATTAATTCGAGCTGAA  
 CTAGGTAACCCCTGGGTCTCTAATTGGAGATGACCAAATTTATA  
 ATGTAATTGTAACGTCTCATGCATTCATTATAATTTCTTTATAG  
 TTATACCTATTATAATTTGGAGGATTTGGAAATTGACTTGACCT  
 TTAATACTAGGCGGCCAGATATAGCTTTCCCACGAATAAATA  
 ATATAAGATTTTGACTTCTCCTCCTTTCTTAACTTACTTCTTT  
 CAAGAAGAATAGTCGAAAATGGGGCAGGTACAGGTTGAACTG  
 TGTATCCCCCTCTCAGCAAATATTGCACATAGAGGAGCCTC  
 TGTTGATTTAGCTATTTTAGATTACATTTAGCAGGAATTCCT  
 CTATTTTAGGAGCTGTAATTTTATTACCACAGTTATTAATATAC  
 ATCAACAGGAATAACATTTGATCGAATACCTTTATTTGTTGG  
 TCTGTTATACTTACTGCTATTCTATTATTATTATCCCTGCCTGTT  
 TTAGCAGGAGCCATTACAATACTTTAACTGACCGAAATATTA  
 TACAACATTTTTGACCCAGCTGGAGGAGGAGACCCTATCTTA  
 TACCAACATTTATTTGATTTTTGGC

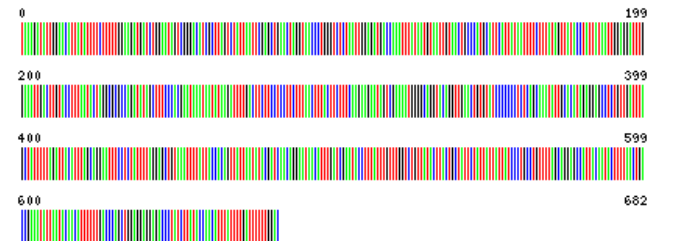


### *Cyclocephala lunulata* V2

TCTCAGCAAATATTCACATAGAGGAGCCTCTGI

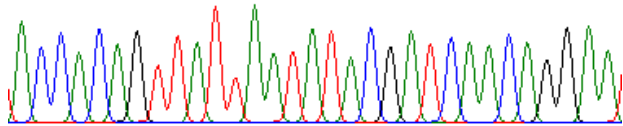


TAAAGATATTGGAACATTATATTTCTTTTTGGAAGATGATCTG  
 GAATAGTCGGGACATCGCTTAGTCTATTAATTCGAGCTGAACT  
 AGGTAACCCCTGGGTCTCTAATTGGAGATGACCAAATTTATAAT  
 GTAATTGTAACGTCCCATGCATTCATTATAATTTCTTTATAGTT  
 ATACCTATTATAATTGGAGGATTTGAAATTGACTTGACCTTT  
 AATACTAGGCGGCCAGATATAGCTTTCCCACGAATAAATAAT  
 ATAAGATTTTGACTTCTCCTCCTTTCTTAACTTACTTCTTTCA  
 AGAAGAATAGTCGAAAATGGGGCAGGTACAGGTTGAACTGTG  
 TATCCCCCTCTCAGCAAATATTGCACATAGAGGAGCCTCTG  
 TTGATTTAGCTATTTTAGATTACATTTAGCAGGAATTCCTCTA  
 TTTTAGGAGCTGTAATTTTATTACCACAGTTATTAATATACGA  
 TCAACAGGAATAACATTTGATCGAATACCTTTATTTGTTGGTC  
 GTTATACTTACTGCTATTCTATTATTATTATCCCTGCCTGTTT  
 AGCAGGAGCCATTACAATACTTTAACTGACCGAAATATTAATA  
 CAACATTTTTGACCCAGCTGGAGGAGGAGACCCTATCTTATA  
 CCAACATTTATTTGATTTTTGGAC

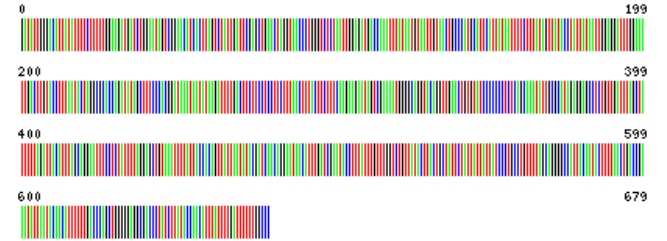


## Cyclocephala lunulata V3

ACCACAGTTATTAATATACGATCAACAGGAA

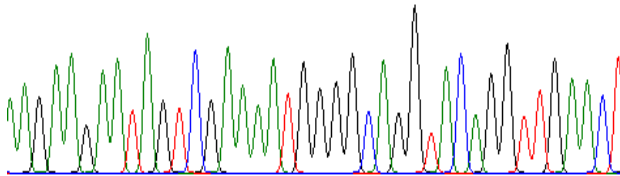


GATATTGGGACATTATATTTTCTTTTTGGAAGATGATCTGGAAT  
AGTCGGAACATCACTTAGTCTATTGATTGAGCTGAACTAGGT  
AACCCCTGGGTCTCTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATGTAAT  
TGAACTGCCATGCATTCAATTATAATTTTCTTTATAGTTATACC  
TATTATAATTGGAGGATTTGAAATTGACTTGACCTTTAATAC  
TAGGCGCACCAGATATAGCTTTCCACGGATAAATAATATAAG  
ATTTTGACTTCTTCTCCTTCTTTAACTTTACTTCTTTCAAGAAG  
AATAGTCGAAAATGGGGCAGGTACAGGTTGAACTGTGTATCC  
CCCCCTCTCAGCAAATATTGCGCATAGAGGAGCCTCTGTTGAT  
TTAGCTATTTTTAGATTACATTTAGCAGGAATTTCTCTATTTTA  
GGAGCTGTAAATTTTATTACCACAGTTATTAATATACGATCAAC  
AGGAATAACATTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGGTCTGTTA  
TACTTACTGCTATTCTATTATTATTATCCCTGCCTGTTTAGCA  
GGGGCCATTACAATACTTTTAACTGACCGAAATATTAACAAC  
ATTTTTGACCCAGCTGGGGGAGGCGACCCCTATCTTATACCAA  
CATTATTTTGATTTTTTGGCCC

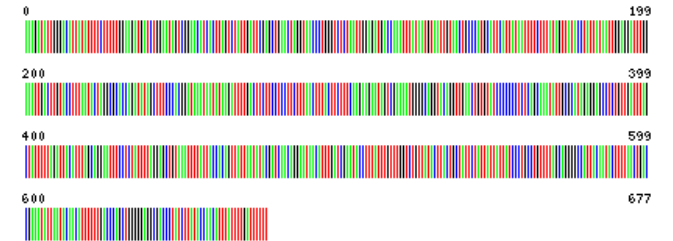


## Cyclocephala lunulata V4

AGAAGAATAGTCGAAAATGGGGCAGGTACAGGTTGAACT

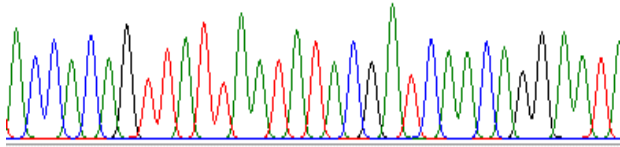


AAAGATATTGGGACATTATATTTTCTTTTTGGAAGATGATCTGG  
AATAGTCGGAACATCACTTAGTCTATTGATTGAGCTGAACTA  
GGTAACCCTGGGTCTCTAATTGGAGATGACCAAATTTATAATG  
TAATTGAACTGCCATGCATTCAATTATAATTTTCTTTATAGTTA  
TACCTATTATAATTGGAGGATTTGAAATTGACTTGACCTTTA  
ATACTAGGCGCACCAGATATAGCTTTCCACGGATAAATAATA  
TAAGATTTTGACTTCTTCTCCTTCTTTAACTTTACTTCTTTCAA  
GAAGAATAGTCGAAAATGGGGCAGGTACAGGTTGAACTGTGT  
ATCCCCCTCTCAGCAAATATTGCGCATAGAGGAGCCTCTGT  
TGATTTAGCTATTTTTAGATTACATTTAGCAGGAATTTCTCTAT  
TTTAGGAGCTGTAAATTTTATTACCACAGTTATTAATATACGAT  
CAACAGGAATAACATTTGATCGAATACCTTTATTTGTTTGGTCT  
GTTTACTTACTGCTATTCTATTATTATTATCCCTGCCTGTTTA  
GCAGGGGCCATTACAATACTTTTAACTGACCGAAATATTAATA  
CAACATTTTGGACCCAGCTGGGGGAGGCGACCCCTATCTTATA  
CCAACATTTATTTTGATTTTTT

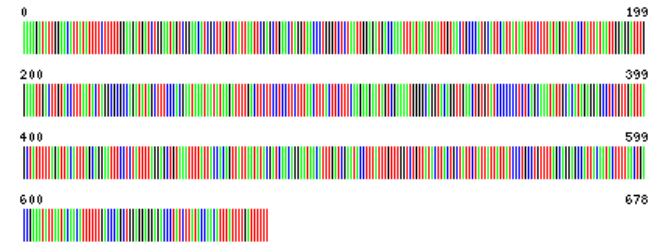


## *Cyclocephala lunulata* V5

ACCACAGTTATTAATATACGATCAACAGGAAT!



```
AAAAGATATTGGAACATTATATTTCTTTTTGGAAGATGATCTG
GAATAGTCGGAACATCGCTTAGTCTATTAATTCGAGCTGAACT
AGGTAACCTGGGTCTCTAATTGGAGATGACCAAATTTATAAT
GTAATTGTAAGTCCCATGCATTATTATAATTTCTTTATAGTT
ATACCTATTATAATTGGAGGATTTGAAATTGACTTGACCTTT
AATACTAGGCGCGCCAGATATAGCTTTCCACGAATAAATAAT
ATAAGATTTTGACTTCTTCCTCCTTCTTAACCTTACTTCTTTCA
AGAAGAATAGTCGAAAATGGGGCAGGTACAGGTTGAACTGTG
TATCCCCCCTCTCAGCAAATATTGCACATAGAGGAGCCTCTG
TTGATTTAGCTATTTTTAGATTACATTTAGCAGGAATTTCTCTA
TTTTAGGAGCTGAAATTTTATTACCACAGTTATTAATATACGA
TCAACAGGAATAACATTTGATCGAATACCTTTATTTGTTGGTC
TGTTATACTTACTGCTATTCTATTATTATTATCCCTGCCTGTTT
AGCAGGAGCCATTACAATACTTTTAACTGACCGAAATATTAATA
CAACATTTTTGACCCAGCTGGAGGAGGAGACCCTATCTTATA
CCAACATTTATTTGATTTTTT
```



#### 8.4.- Análisis de secuencias del gen MT-COI

Las secuencias registradas se utilizaron para estimar distancias por pares, observándose para individuos de la misma especie una distancia de 0.00 como es el caso de *P. semicincta* y de 0.005 para *C. barrerai* y *C. lunulata*. En el caso de *P. hoepfneri*, se presentó una distancia de 0.001. La distancia entre especies de *Cyclocephala* fue de 0.13 a 0.20 (*C. parallela*, *C. barrerai* y *C. lunulata*), mientras que para las especies de *Paranomala* (o equivalente) se estimó una distancia de 0.15 a 0.156 (*A. innuba*, *P. semicincta* y *P. hoepfneri*). Las distancias entre géneros de la subfamilia Dynastinae fue de 0.23 a 0.28, mientras que las distancias entre géneros de la subfamilia Rutelinae fueron de 0.19 a 0.26 (Cuadro 7).

El grupo externo seleccionado para este análisis fue *Diplotaxis* sp., perteneciente a la subfamilia Melolonthinae, presentó las distancias con los valores más altos con un intervalo de 0.41 a 0.47 con individuos de la subfamilia Dynastinae, mientras que para los individuos de la subfamilia Rutelinae, las distancias fueron de 0.35 a 0.39.

**Cuadro 7.- Distancias genéticas por pares de las secuencias registradas en BOLD Systems y especies externas.** Se muestran las distancias por pares entre las secuencias de las especies estudiadas y las secuencias externas.

	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>1.-<i>Diplotaxis</i> sp.</b>								
<b>2.-<i>Anomala innuba</i></b>	0.36							
<b>3.-<i>Cyclocephala parallela</i></b>	0.41	0.28						
<b>4.-<i>Cyclocephala barrerai</i></b>	0.42	0.26	0.13	0.005				
<b>5.-<i>Cyclocephala lunulata</i></b>	0.38	0.26	0.18	0.20	0.005			
<b>6.-<i>Paranomala semicincta</i></b>	0.35	0.15	0.29	0.28	0.224	0		
<b>7.-<i>Paranomala hoepfneri</i></b>	0.37	0.15	0.24	0.27	0.206	0.156	0.001	
<b>8.-<i>Strigoderma</i> sp.</b>	0.39	0.23	0.25	0.27	0.26	0.21	0.19	
<b>9.-<i>Euetheola humilis</i></b>	0.47	0.27	0.27	0.28	0.23	0.30	0.27	0.32

Asimismo, el dendograma construido con las secuencias del gen MT-COI de las diferentes especies seleccionadas muestra dos agrupaciones evidentes: un grupo para los individuos pertenecientes a la subfamilia Rutelinae y otro para los individuos pertenecientes a la subfamilia Dynastinae. Las agrupaciones obtenidas para ejemplares de *Paranomala* se separan como grupos monofiléticos, uno para los individuos del género *Paranomala* y otro para el género *Strigoderma*. Los individuos reconocidos como *P. semicincta* y los de *P. hoepfneri* se agrupan con un valor de Bootstrap de 100. En el caso de este grupo, se relaciona con un valor de Bootstrap de 48 con una especie del mismo género *A. innuba*. El género *Strigoderma* perteneciente a la subfamilia Rutelinae se encuentra relacionado al género *Paranomala* con un valor de Bootstrap de 77.

En segundo lugar, puede observarse la similitud en el grupo donde se encuentran las especies de *Cyclocephala* relacionadas de forma estrecha y estas a su vez, con *E. humilis* que pertenece a la misma subfamilia, con un Bootstrap del 88. También dentro de *Cyclocephala* se separan tres especies, agrupándose los vouchers de *C. barrerai* y los vouchers de *C. lunulata*, con un valor de Bootstrap de 100, mientras que *C. paralela* se agrupa como una especie cercana a *C. barrerai* con un valor de Bootstrap de 100. Por último, el grupo externo se separa de los grupos de Dynastinae y Rutelinae, lo cual es consistente con la clasificación natural de este grupo de coleópteros, ya que pertenece a una subfamilia diferente (Figura 10).

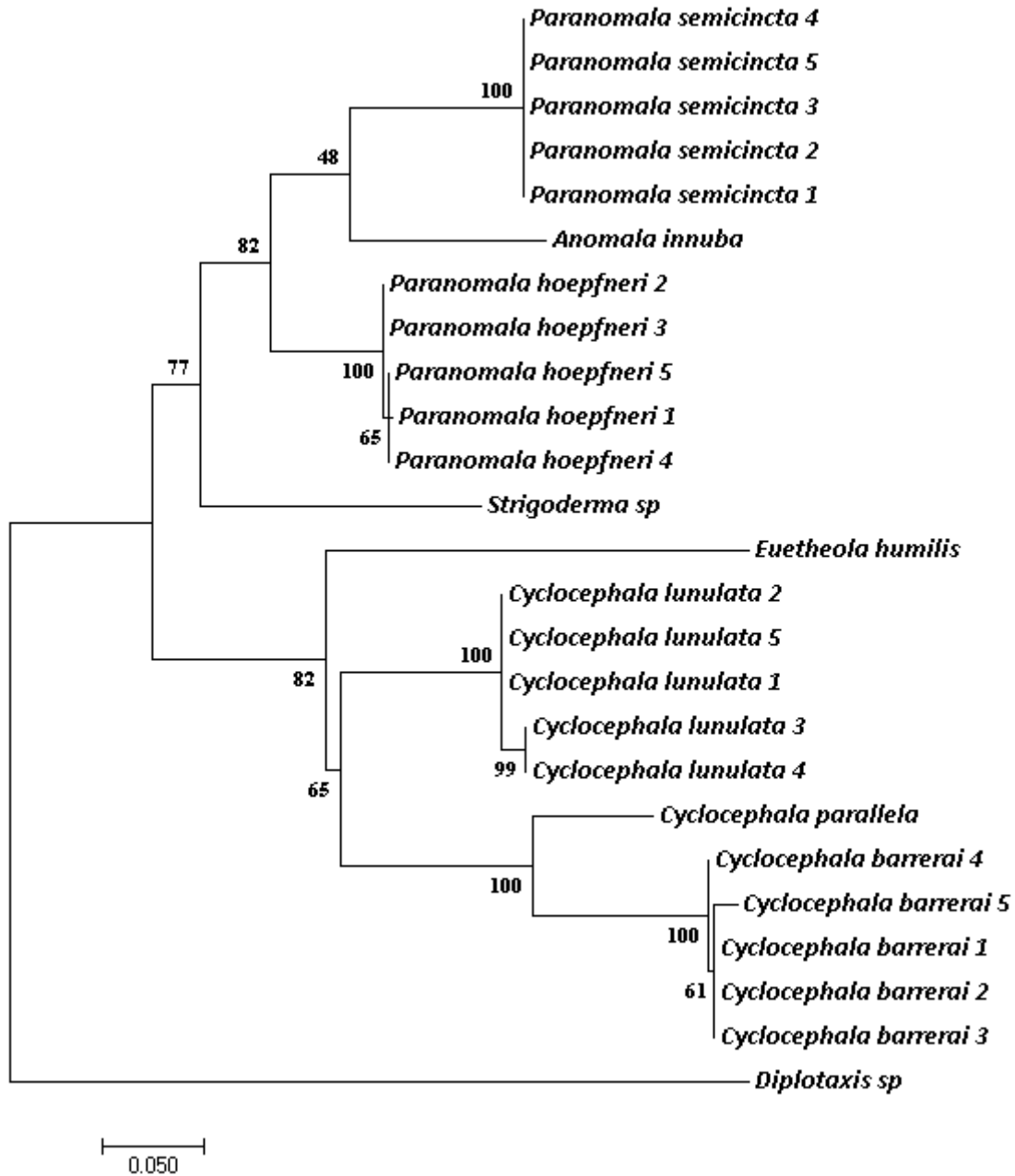


Figura 10.- Dendograma construido a partir de las secuencias parciales del gen MT-COI de los adultos empleados como modelo de estudio, junto con las de otros taxa de Melolonthidae ya registradas con anterioridad. Las secuencias parciales del gen MT-COI fueron alineadas con el programa ClustalW y analizadas por Máxima Verosimilitud. Modelo general reversible en el tiempo en distribución gamma con sitios invariantes (G + I) y un soporte de ramas mediante un análisis de Bootstrap con 1000 remuestreos Modelo general reversible en el tiempo en distribución gamma con sitios invariantes (G + I). Usando el programa Mega 7 (Kumar *et al.*, 2017).

## 9.- Discusión

Debido a la relevancia económica de varios integrantes de la familia Melolonthidae, la identificación y delimitación de especies a partir de caracteres morfológicos ha resultado fundamental, siendo la taxonomía morfológica la principal forma de clasificación de todas las especies y el método por excelencia para el establecimiento de las relaciones filogenéticas (Morón, 1997; Aragón *et al.*, 2001; Morón-Ríos y Morón, 2001; Reyes-Novelo y Morón, 2005; Aragón-García *et al.*, 2008; Cherman y Morón, 2014; Morón *et al.*, 2014; Hernández-Cruz *et al.*, 2014). A pesar de ello, la tendencia en la taxonomía es llevar a cabo las determinaciones de manera integrativa, mediante la correlación de diversas líneas de evidencias que implican el empleo de datos morfológicos, moleculares, biogeográficos y ecológicos. Por tal razón, en el presente trabajo se propuso la identificación de adultos recolectados en CU, BUAP por taxonomía integrativa, en un intento de sinergizar el uso de caracteres morfológicos con caracteres moleculares.

Con respecto a la identificación por taxonomía morfológica de las especies revisadas en el presente trabajo, se realizó con claves dicotómicas para su clasificación y la descripción detallada de caracteres morfológicos externos basada en estudios de Aragón *et al.* (2001), Reyes-Novelo y Morón (2005) y Ramírez-Ponce y Morón (2009). También se consideró la opinión del Dr. Aragón (com. pers.). Cabe señalar que, a pesar de este avance, a la fecha no se han publicado claves taxonómicas en las cuales se muestren esquemas o imágenes de las estructuras diagnósticas de machos de *P. hoepfneri*, *P. semicincta* y *C. barrerae*, lo cual representa un aporte sustancial por parte de este estudio.

De manera consistente con las claves de identificación morfológica, tanto los especímenes recolectados como los *vouchers* utilizados para obtener las secuencias del gen MT-COI presentaron todos los rasgos distintivos externos de la familia Melolonthidae como la condición Pleurostictii, una maza antenal formada de 5 a 7 lamelas y los mesoepímeros ocultos bajo los élitros. Los especímenes de la subfamilia Rutelinae exhibieron los rasgos específicos como el borde exterior de

las mandíbulas expuesto a los lados del cípeo y las dos uñas de cada par de tarsos con diferente longitud, forma y grosor, mientras que los especímenes de la subfamilia Dynastinae mostraron las uñas tarsales sencillas de igual longitud y grosor y patrones de manchas en los élitros y pronoto. Es sabido que la genitalia de los machos son las estructuras más utilizadas en la taxonomía morfológica y sistemática de insectos (López-Guerrero, 1999). Sin embargo, para los adultos de *Paranomala* y *Cyclocephala* revisados, la morfología del edeago y del *spiculum gastrale* aún no cuenta con información detallada (del *spiculum* sólo hay un registro para machos de *Macrodactylus mexicanus* Burmeister, atribuible a Benítez-Herrera, 2014). Por lo tanto, en este trabajo se realizó una primera descripción de estas estructuras con valor taxonómico.

También por primera vez se reportó el empleo de caracteres moleculares para representantes de *Paranomala* y de *Cyclocephala* distribuidas en territorio mexicano, a partir de secuencias parciales del gen MT-COI. En el caso particular de *C. lunulata* ya se contaba con un registro de secuencia parcial en BOLD Systems, aunque este no se encuentra de manera pública para ser consultado y tomado como referencia. El análisis de similitud de secuencias homólogas ortólogas del gen MT-COI corroboró que los especímenes identificados por morfología pertenecen al orden Coleoptera, superfamilia Scarabaeoidea y familia Melolonthidae. Debido a la carencia de registros previos de secuencias del gen MT-COI, diez especímenes fueron identificados como parte de la subfamilia Rutelinae sin concretarse el género y la especie. Los otros diez individuos fueron identificados como miembros de la subfamilia Dynastinae y del género *Cyclocephala* sin definir la especie. No obstante, la identificación morfológica validó la clasificación hasta género y especie; por lo tanto, el registro de las secuencias del gen MT-COI en la base de datos BOLD Systems se realizó por primera vez para los adultos de *P. hoepfneri*, *P. semicincta*, *C. barrerai* y *C. lunulata*. Derivado del registro de las secuencias del gen MT-COI, la base de datos BOLD Systems otorgó un número BIN identificador para cada especie indicando que el registro cuenta con imagen representativa del código de barras, fotografías

del espécimen, datos de recolecta, información del hábitat y trazas de las secuencias de ADN.

En concordancia con nuestro trabajo, el uso del código de barras de ADN como herramienta para la identificación de especímenes se muestra en diversas investigaciones realizadas en países como Alemania, Canadá, India, Japón, Corea, Madagascar y Australia en trabajos reportados por Monaghan *et al.* (2005), Pons *et al.* (2006), Cho *et al.*, (2013), Oba *et al.* (2015) y Hendrich *et al.* (2015). En estas investigaciones el código de barras del gen MT-COI permitió la identificación de un gran número de especímenes con la capacidad de diferenciar claramente entre especies. Asimismo, Muraji *et al.* (2008) utilizando como marcador molecular el gen MT-COI distinguieron especies aisladas geográficamente de las islas de Miyako-jima, Irabu-jima, Ishigaki-jima, y Iriomote-jima en Japón. Aún más, el código de barras de ADN permitió delimitar aquellas especies que presentaban problemas mediante la identificación morfológica, como es el caso del trabajo realizado por Seidel (2016), en el cual se distinguió gracias a esta herramienta a *E. nana* como nueva especie.

En México, esta herramienta molecular también se ha empleado para la delimitación e identificación de una especie del género *Chrysina*, la cual presentó diferencias morfológicas y variaciones en la secuencia de ADN del gen MT-COI que las distinguieron para ser considerada como una nueva especie (Pérez-Flores *et al.*, 2016). El código de barras de ADN también ha sido utilizado en el trabajo reportado por Zaragoza-Ortega *et al.* (2017) para la identificación de especies en estudios de ecología química. En dicho trabajo, se midió la respuesta de los escarabajos a un atrayente sexual permitiendo establecer la cercanía entre *Ph. brevidens* y *Ph. lenis* en Tlaltizapán, Morelos, mediante el uso del gen MT-COI.

Además, el análisis de distancias genéticas por pares de los adultos de *Paranomala* y *Cyclocephala* de nuestro trabajo reveló la relación existente entre los *vouchers* de las especies estudiadas en este trabajo, y la distancia con respecto a especies del mismo género o entre diferentes subfamilias de

Melolonthidae. Con respecto a los *vouchers*, se encontró una distancia de 0.00, 0.001 y 0.005, siendo valores muy bajos que indican que los cinco *vouchers* de cada especie son muy parecidos entre ellos y, por lo tanto, que pertenecen a la misma especie. Asimismo, la distancia genética entre diferentes géneros y subfamilias aumentó de 0.18 hasta 0.36, indicando la separación entre especies de *Paranomala* y *Cyclocephala*. Además, se muestra la separación entre géneros de las subfamilias Rutelinae y Dynastinae. Los resultados encontrados en las distancias genéticas son consistentes con la correcta delimitación de las especies, tal como el trabajo reportado por Pérez-Flores *et al.* (2016), en el cual los resultados de las distancias genéticas permitió delimitar e identificar una nueva especie. Asimismo, el análisis utilizado en ambos trabajos para calcular distancias por pares fue el modelo Kimura 2-parametros; este método permite distinguir entre especies a partir de la variación presente en las secuencias obtenidas, tal como lo reportado por White *et al.* (2014) al realizar una comparación con los diversos tipos de métodos para obtener distancias genéticas. El dendograma obtenido del análisis de las secuencias del gen MT-COI por Máxima Verosimilitud permitió distinguir entre grupos y generar una propuesta de delimitación de especies. El árbol permitió agrupar a todos los *vouchers* pertenecientes a la misma especie, con un valor de Bootstrap >100. Al mismo tiempo, unió a las especies pertenecientes al mismo género y separó a las dos diferentes subfamilias. En el caso del grupo externo, este se separó como un grupo independiente de ambas subfamilias, consistente con la clasificación de la familia Melolonthidae por caracteres morfológicos (Cherman y Morón, 2014). Este método es utilizado en la construcción de dendogramas para la delimitación de especies como en el caso de adultos de *Phyllophaga* (Zaragoza-Ortega *et al.*, 2017) y de *Eudicella* (incluido anteriormente en la su subfamilia Cetoniinae) (Seidel, 2016).

La taxonomía integrativa proporciona una fuente de información complementaria que permite la identificación y delimitación de especies de manera rápida y confiable, ya que supera las dificultades impuestas por el uso de un solo tipo de datos y sustenta la identificación con ambos tipos de información. Por lo tanto, la identificación de especies en el presente trabajo es el primer paso para conocer y comprender las relaciones filogenéticas y evolutivas de especies mexicanas de Melolonthidae y al mismo tiempo, proporciona información importante para futuros estudios en áreas como ecología y biología de la conservación.

## 10. Conclusiones

- Se propuso la identificación de dos especies de *Paranomala* y dos especies de *Cyclocephala* con base en caracteres morfológicos diagnósticos y se describió detalladamente el carácter que recientemente se ha propuesto para la identificación de Melolonthidae (*spiculum gastrale*), permitiendo considerarlos como *P. hoepfneri*, *P. semicincta*, *C. barrerai* y *C. lunulata*.
- Se obtuvo el código de barras de ADN del gen MT-COI de aproximadamente 676 a 688 pb, agrupados en cinco *vouchers* por especie.
- La distancia genética por pares entre *vouchers* de la misma especie fue de 0.00 a 0.006, indicando la pertenencia a ese nivel taxonómico. Para diferentes géneros de Rutelinae y Dynastinae, la distancia genética fue de 0.23 a 0.28, mostrando la cercanía entre géneros de la misma subfamilia, incluyendo a *Paranomala* y *Cyclocephala*.
- El análisis de las secuencias parciales del gen MT-COI de los coleópteros adultos estudiados agrupó y separó a nivel de familia, subfamilia, género y especie, en consistencia con la clasificación tradicional de Melolonthidae.

## 11.- Literatura citada

- Alcázar-Ruiz, J. A., A. Morón-Ríos. y M. A. Morón (2003). Fauna de Coleoptera Melolonthidae de Villa las Rosas, Chiapas, México. *Acta Zoológica Mexicana*, 88: 59-86.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller., E. W. Myers. and D. J. Lipman (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215 (3): 403-410.
- Aragón, A., M. A. Morón., A. M. Tapia R. y R. Rojas G. (2001). Fauna de Coleoptera Melolonthidae en el rancho La Joya, Atlixco, Puebla, México. *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*, 83: 143-164.
- Aragón, A., C. D. Nochebuena-Trujillo, M. A. Morón y J. F. López-Olguín (2008). Uso de trampas de luz fluorescente para el manejo de la gallina ciega (Coleoptera: Melolonthidae) en maíz (*Zea mays* L.). *Agrociencia*, 42(2): 217-223.
- Benítez-Herrera, L. N. (2014). Anatomía el aparato reproductor de *Macroductylus mexicanus* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae) y la relación con aspectos básicos de su comunicación química sexual (Tesis de licenciatura). Escuela de Biología. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.
- Cameron, S. (2014). How to sequence and annotate insect mitochondrial genomes for systematic and comparative genomics research. *Systematic Entomology*, 39: 400–411.
- Cherman, M. A. y M. A. Morón (2014). Validación de la familia Melolonthidae Leach, 1819 (Coleoptera: Scarabaeoidea). *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*, 30(1): 201-220.
- Cho, S. Y., K. I. Suh., and Y. J. Bae (2013). DNA barcode library and its efficacy for identifying food-associated insect pests in Korea. *Entomological Research*, 43: 253–261.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85: 407-415.
- Delgado, L. y J. Márquez (2006). Estado del conocimiento y conservación de los Coleópteros Scarabaeoidea (Insecta) del estado de Hidalgo, México. *Acta Zoológica Mexicana (n.s.)* 22(2): 57-108
- Estrada, H.R.M. (2013). Etiquetas para colecciones entomológicas. *Bioma*. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad del Salvador. pp. 41
- Endrödi, S. 1966. Monographie der Dynastinae (Coleoptera: Lamellicornia) I. *Teil. Entomologische Abhandlungen – Staatliches Museum für Tierkunde Dresden* 33: 1–457
- Fernández, M. S., F. Brusa, M. C. Damborenea., P. M. Dellapé y F. M. Gallardo (2013). Introducción a la taxonomía: manual de ejercitaciones. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Editorial de la Universidad de Plata. pp. 6-17.
- Filippini, V., E. Micó and E. Galante (2016). Checklist and identification key of Anomalini (Coleoptera, Scarabaeidae, Rutelinae) of Costa Rica. *ZooKeys* 621: 63–136

- Fišer, P. Ž. and E. V. Buzan (2014). 20 years since the introduction of DNA barcoding: From theory to application. *Journal of Applied Genetics*, 55(1): 43-52.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz and R. Vrijenhoek (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294-299.
- Hall, T. A. (1997). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series No. 41*. pp. 95-98.
- Hebert P. D. N., S. Ratnasingham., E. V. Zakharov., A. C. Telfer., V. Levesque-Beaudin., M. A. Milton., S. Pedersen., P. Jannetta., and J. R. deWaard (2016). Counting animal species with DNA barcodes: Canadian insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 371: 20150333.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball. and J. R. deWaard (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270 (1512): 313–321.
- Hendrich. L., J. Moriniere., G. Haszprunar., P. D. N. Hebert., A. Hausmann., F. Kohler., and M. Balke (2015). A comprehensive DNA barcode database for Central European beetles with a focus on Germany: adding more than 3500 identified species to BOLD. *Molecular Ecology Resources*, 15: 795–818.
- Hernández-Cruz, J., M. Á. Morón, J. Ruiz-Vega, J. A. Sánchez-García, L. Martínez-Martínez y R. Pérez-Pacheco (2014). Bionomía de las especies de *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae) en Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México. *Acta Zoológica Mexicana*, 30(1): 144-160.
- Instituto Nacional de Estadística y Biogeografía (INEGI) (2010). Compendio de información geográfica municipal Puebla, Puebla. Clave Geoestadística 21114.
- IUCN 2017. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2017-3. <<http://www.iucnredlist.org>>. Downloaded on 05 December 2017.
- Jalali. S.K., R. Ojha., and T. Venkatesan (2015). DNA Barcoding for identification of agriculturally important insects. *New Horizons in Insect Science: Towards Sustainable Pest Management*. pp. 13-23 DOI 10.1007/978-81-322-2089-3-2.
- Jameson, M. L. (2006). Division of entomology. Nebraska, USA. *University of Nebraska State Museum*  
<http://www.museum.unl.edu/research/entomology/index.html>
- Kress, W. J., C. García-Robledo, M. Uriarte and D. L. Erickson (2015). DNA barcodes for Ecology, Evolution and Conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 30(1): 25-35.
- Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura (2017). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7): 1870-1874.
- López-Guerrero, Y. (1999). Morphological comparison of the male genitalia of *Eurysternus Dalman* and *Sisyphus Latreille* (Coleoptera, Scarabaeidae, Scarabaeinae). *The Coleopterists Bulletin*, 53 (3): 201-207.

- Lugo-García, G. A., M. Á. Morón, A. Aragón, L. Ortega., A. Reyes -Olivas y B. H. Sánchez (2013). Especies nocturnas de Scarabaeoidea (Coleoptera: Polyphaga) en el norte de Sinaloa, México. *Revista Colombiana de Entomología*, 39 (1): 95-104.
- Madidi, N. P. (2011). Division of entomology. Nebraska, USA. *University of Nebraska State Museum*  
<http://www.museum.unl.edu/research/entomology/index.html>
- Márquez, L. J. (2005). Técnicas de colecta y preservación de insectos. *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa*, 1(37): 385 – 408.
- Martens, K., y H. Segers (2005). Taxonomy and systematics in biodiversity research. *Hydrobiologia*. 542:27–31.
- Matthew, R. M. (2006). Division of entomology. Nebraska, USA. *University of Nebraska State Museum*  
<http://www.museum.unl.edu/research/entomology/index.html>
- Mitchell, A. (2011). DNA barcoding is useful for taxonomy: a reply to Ebach. *Zootaxa*, 2772: 67–68.
- Monaghan, M. T., M. Balke, T. R. Gregory, and A. P. Vogler (2005). DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. *Phylosophical Transactions of the Royal Society B*, 360: 1925–1933.
- Moreno, S. M. (2005). De la taxonomía tradicional a las filogenias moleculares. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (sección Biología.)*, 100(1-4): 45-65.
- Morón, M. Á. y J. E. Valenzuela-González. (1993) Estimación de la biodiversidad de insectos en México; análisis de un caso. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, 44: 303-312.
- Morón, M. Á., B. C. Ratcliffe. y C. Deloya (1997). Atlas de escarabajos de México. Coleoptera Lamellicornia, Familia Melolonthidae. Segunda parte. Instituto de Ecología, A. C. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. K005. México D. F.
- Morón, M. A. 2006. Revision of the *Phyllophaga* (*Phytalus*) species groups *obsoleta* and *pallida* (Coleoptera: Melolonthidae: Melolonthinae). *Folia Entomologica de México*, 45 (Supl. 1): 1-104
- Morón, M. Á., G. Nogueira, C. V. Roja-Gómez y R. Arce-Pérez (2014). Biodiversidad de Melolonthidae. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. Supl. 85: S298-S302.
- Morón-Ríos, A. y M. Á. Morón (2001). La fauna de Coleoptera Melolonthidae de la Reserva de la Biósfera “El triunfo”, Chiapas, México. *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.), 84: 1-25.
- Muraji, M., Y. Hirai, T. Akino, S. Wakamura, and N. Arakaki. (2008). Genetic divergence among populations of the white grub beetle, *Dasylepida ishigakiensis* (Coleoptera: Scarabaeidae), distributed in the southern part of the Ryukyu Islands of Japan, detected from mitochondrial DNA sequences. *Applied Entomology Zoology*, 43 (2): 287–292.

- Nagoshi, R. N., Brambila, J. and Meagher, R. L. (2011). Use of DNA barcodes to identify invasive armyworm *Spodoptera* species in Florida. *Journal of Insect Science*, 11: 154.
- Oba, Y., H. Ôhira, Y. Murase, A. Moriyama and Y. Kumazawa (2015). DNA barcoding of Japanese click beetles (Coleoptera: Elateridae). *PLoS ONE*, 10 (1): e0116612.
- Padial, J. M., A. Miralles, I. De la Riva and M. Vences. (2010). The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, 7: 16.
- Panawala, L. (2017). Difference between taxonomy and Systematics. Sydney, Australia. PEDIAA, explore. Recuperado de <http://pediaa.com/difference-between-taxonomy-and-systematics/>
- Pante, E., C. Schoelincx and N. Puillandre (2014). From integrative taxonomy to species description: one step beyond. *Systematic Biology*, 64(1): 152–160.
- Paz, A., M. González. y A. J. Crawford (2011). Códigos de barras de la vida: Introducción y perspectiva. *Acta Biológica Colombiana*, 16: 161-175.
- Pérez-Flores, O., F. Villagomez and O. R. Galindo (2016). A new species of *Chrysina* Kirby (Coleoptera: Scarabaeidae: Rutelini) from Mexico based on morphological and molecular data. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4(1): 606-610.
- Pires, A. C. and L. Marinoni. (2010). DNA barcoding and traditional taxonomy unified through Integrative Taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies. *Biota Neotropica*, 10(2): 339-346.
- Pons, J., T. G. Barraclough, J. Gomez-Zurita, A. Cardoso, D. P. Duran, S. Hazell, S. Kamoun, W. D. Sumlin, and A. P. Vogle (2006). Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Society of Systematic Biologists*, 55(4): 595-609.
- Ramírez-Ponce, A. y M. Á. Morón (2009). Relaciones filogenéticas del género *Anomala* (Coleoptera: Melolonthidae: Rutelinae). *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 80: 357-394.
- Reitter, E. (1908). Fauna Germanica. Die Käfer des Deutschen Reiches. I. & II. Band. Farbendrucktafeln von Dr. K.G. Lutz. K.G. Lutz' Verlag, Stuttgart.
- Rentaría, A. M. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. *Ecología molecular*, 541-566.
- Reyes-Novelo, E. y M. Á. Morón (2005). Fauna de Coleoptera Melolonthidae y Passalidae de Tzucacab y Conkal, Yucatán, México. *Acta Zoológica Mexicana*, 21(2): 15-49.
- Romero-López, A. A., M. Á. Morón, A. Aragón y F. J. Villalobos (2010). La “gallina ciega” (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae) vista como un “ingeniero del suelo”. *Southwestern Entomologist*, 35(3): 331-343.
- Schlick-Steiner, B. C., F. M. Steiner, B. Seifert, C. Stauffer, E. Christian, and R. H. Crozier (2010). Integrative Taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annual Review of Entomology*, 55: 421–38.
- Seidel, M. (2016). Morphology and DNA barcoding reveal a new species of *Eudicella* from East Africa (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae). *Zootaxa*, 4137 (4): 535–544.

- SEMARNAT. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2010) Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Diario Oficial de la Federación (DOF). Marzo, 2018.
- Stechauner-Rohringer, R. y L. C. Pardo-Locarno (2010). Redescrición de inmaduros, ciclo de vida, distribución e importancia agrícola de *Cyclocephala lunulata* Burmeister (Coleoptera: Melolonthidae: Dynastinae) en Colombia. *Boletín Científico Museo de Historia Natural*, 14 (1): 203–220.
- White, B. P., E. M. Pilgrim, L. M. Boykin, E. D. Stein, and R. D. Mazor (2014). Comparison of four species-delimitation methods applied to a DNA barcode data set of insect larvae for use in routine bioassessment. *Molecular Approaches In Freshwater Ecology*, 33(1):338–348.
- Zaragoza-Ortega, M., O. M. Segura-León, J. Hernández-Cruz, J. Valdez-Carrasco and S. Sánchez-Soto (2017). The response of *Phyllophaga brevidens* and *Phyllophaga lenis* (Coleoptera: Scarabaeidae) to methyl 2-(methylthio) benzoate and light. *Florida Entomologist*, 100(3): 546-550.