



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Obtención del código de barras de ADN del gen MT-COI  
de *Macroductylus mexicanus* y *Macroductylus nigripes*  
(Coleoptera: Melolonthidae)**

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADO (A) EN BIOLOGÍA

**PRESENTA:**

**ALBA GABRIELA GONZÁLEZ MARTÍNEZ**

**DIRECTORA: MARÍA ROSETE ENRÍQUEZ**

**CO-DIRECTOR: ANGEL ALONSO ROMERO LÓPEZ**



ABRIL 2018

## **Agradecimientos**

A mis padres Armando González Barbosa y Alba Martínez Rodríguez, porque ellos son la motivación de mi vida, por mostrarme el camino de la superación y siempre apoyarme.

A mi hermano Francisco Armando González Martínez por su apoyo durante la carrera y por enseñarme a que trabajando y esforzándote puedes cumplir tus metas y crecer tanto en el ámbito personal y laboral.

A mi directora de tesis María Rosete Enríquez por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo, así como también por su tiempo dedicado.

A mi co- director de tesis Angel Alonso Romero López por su ayuda, dedicación y asesoramiento.

A los revisores por su valiosa colaboración para mejorar el escrito.

# Índice

<b>ABREVIATURAS GENERALES</b> .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE CUADROS .....	viii
<b>RESUMEN</b> .....	ix
<b>1. Introducción</b> .....	10
<b>2. Antecedentes</b> .....	11
<b>2.1 Aspectos generales de sistemática y taxonomía</b> .....	11
2.1.1 Taxonomía morfológica .....	13
2.1.2 Taxonomía molecular .....	13
2.1.3 Taxonomía integrativa .....	14
<b>2.2 Código de barras de ADN</b> .....	15
2.2.1 Propiedades del código de barras .....	19
2.2.2 Código de barras en insectos .....	21
<b>2.3 Generalidades de la familia Melolonthidae</b> .....	23
2.3.1 Clasificación .....	23
2.3.2. Caracteres morfológicos y distribución .....	25
<b>2.4 Generalidades del género <i>Macrodactylus</i></b> .....	27
2.4.1 Descripción morfológica a nivel genérico .....	27
2.4.2 Descripción morfológica y hábitos de adultos y larvas de .....	28
<i>Macrodactylus mexicanus</i> y <i>Macrodactylus nigripes</i> .....	28
<b>3. Justificación</b> .....	33
<b>4. Hipótesis</b> .....	34
<b>5. Objetivos</b> .....	34
<b>5.1 Objetivo general</b> .....	34
<b>5.2 Objetivos particulares</b> .....	34
5.2.1 Identificar adultos de <i>M. mexicanus</i> y <i>M. nigripes</i> mediante la revisión de caracteres morfológicos externos e internos. ....	34
5.2.2 Obtener la secuencia parcial del gen MT-COI a partir de muestras de ADN genómico de adultos de <i>M. mexicanus</i> y <i>M. nigripes</i> . ....	34
5.2.3. Determinar el porcentaje de similitud entre secuencias parciales del gen MT- COI por medio de herramientas bioinformáticas. ....	34
<b>6. Material y métodos</b> .....	35

<b>6.1 Recolecta de adultos .....</b>	<b>35</b>
<b>6.2 Identificación con caracteres morfológicos a través de claves dicotómicas ...</b>	<b>35</b>
<b>6.3 Identificación por taxonomía molecular con la obtención del código de barras de ADN del gen MT-COI.....</b>	<b>36</b>
6.3.1 Purificación del DNA .....	36
6.3.2 Amplificación del gen MT-COI por PCR punto final con iniciadores universales	37
6.3.3 Secuenciación y análisis bioinformáticos .....	38
6.3.4 Análisis de secuencias .....	38
<b>7. Resultados.....</b>	<b>39</b>
<b>7.1 Identificación por taxonomía morfológica.....</b>	<b>39</b>
7.1.1 Montaje de especímenes .....	43
<b>7.2 Identificación por taxonomía molecular .....</b>	<b>45</b>
<b>7.2.2 Obtención del código de barras del gen MT-COI.....</b>	<b>46</b>
7.2.3 Registro en base de datos de códigos de barras .....	49
7.2.4 Análisis de secuencias homólogas del gen MT-COI .....	52
<b>8. Discusión .....</b>	<b>54</b>
<b>9. Conclusiones .....</b>	<b>58</b>
<b>10. Literatura citada .....</b>	<b>59</b>

## ABREVIATURAS GENERALES

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**AGIMP:** Proyecto General de Insectos de importancia agrícola en la India

**ARN:** ácido ribonucleico

**ARNr:** ácido ribonucleico ribosomal

**ARNt:** ácido ribonucleico de transferencia

**BOLD:** The Barcode of Life Data Systems

**BLAST:** Basic Local Alignment Search Tool

**BLASTN:** Nucleotide- Nucleotide BLAST

**CAT:** catálogos

**CBOL:** The Consortium for the Barcode of Life

**COI:** citocromo oxidasa 1

**dNTPs:** mezcla de cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato

**EF-1 $\alpha$ :** factor de elongación alpha 1

**ITS2:** región espaciadora interna transcrita 2

**MT-COI:** gen mitocondrial citocromo oxidasa 1

**matK:** gen de la mutarasa

**PCGs:** genes codificadores de proteínas

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PMI:** intervalo *post mortem*

**rbcl:** gen del cloroplasto que codifica para RuBisCO

**tufA2:** factor de elongación Tu

**h:** horas

**min:** minutos

**s:** segundos

**ml:** mililitros

**$\mu$ l:** microlitros

**rpm:** revoluciones por minuto

**nm:** nanómetros

**v:** volts

**pb:** pares de bases

Figura 2.

**ATP6:** adenosin trifosfato subunidad 6

**ATP8:** adenosin trifosfato subunidad 8

**cob:** citocromo oxidasa b

**cox1-3:** citocromo oxidasa c subunidad 1-3

**CR:** región de control

**nad1-6:** NADH deshidrogenasa subunidad 1-6

**nad4L:** NADH deshidrogenasa subunidad 4L

**rrnS:** subunidades de ARN ribosomal pequeñas

**rrnL:** subunidades de ARN ribosomal grandes

Figura 13.

**V1-3:** Voucher 1-3

Cuadro 2.

**MmV1-3:** *Macrodactylus mexicanus* voucher 1-3

Cuadro 3

**MnV1-3:** *Macrodactylus nigripes* voucher 1-3

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema general del mecanismo para obtener un código de barras de la vida
- Figura 2.** Genoma mitocondrial de insecto
- Figura 3.** Adultos de algunas de las primeras especies de Melolonthidae
- Figura 4.** Ilustración de la maza antenal de *Phyllophaga lissopyge*
- Figura 5.** Ilustración de la condición pleurosticti
- Figura 6.** Ilustración morfológica de *Macroductylus mexicanus*
- Figura 7.** Ilustración morfológica de las estructuras genitales del macho y hembra de *Macroductylus mexicanus*
- Figura 8.** Ilustración morfológica de *Macroductylus nigripes*
- Figura 9.** Ilustración morfológica de las estructuras genitales del macho y hembra de *Macroductylus nigripes*
- Figura 10.** Imagen representativa de un macho de *Macroductylus mexicanus*.
- Figura 11.** Imagen representativa de un macho de *Macroductylus nigripes*
- Figura 12.** Montaje de *Macroductylus mexicanus* y *Macroductylus nigripes*
- Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de PCR punto final del gen MT-COI con iniciadores universales
- Figura 14.** Registro de datos en BoldSystems para *Macroductylus mexicanus*
- Figura 15.** Registro de datos en BoldSystems para *Macroductylus nigripes*
- Figura 16.** Árbol de similitud de secuencias parciales del gen MT-COI de *Macroductylus mexicanus* y *Macroductylus nigripes*

## LISTA DE CUADROS

**Cuadro 1.** Descripción morfológica de los caracteres de mayor importancia de *Macrodactylus mexicanus* y *Macrodactylus nigripes* (\*) en comparación a los caracteres encontrados en los especímenes analizados

**Cuadro 2.** Electroferogramas, secuencia en formato fasta y código de barras del gen MT-COI de los vouchers de *Macrodactylus mexicanus*

**Cuadro 3.** Electroferogramas, secuencia en formato fasta y código de barras del gen MT-COI de los vouchers de *Macrodactylus nigripes*

**Cuadro 4.** Rango de similitud de secuencias del gen MT-COI con otras especies de *Macrodactylus*

## RESUMEN

*Macroductylus mexicanus* Burmeister, 1855 y *Macroductylus nigripes* Bates, 1887 (Coleoptera: Melolonthidae) son escarabajos comúnmente conocidos como “frailecillos” o “taches” considerados de importancia económica en México. Para la instauración de programas de manejo de estos y otros integrantes del grupo se han llevado a cabo estudios sobre su biología, ecología y taxonomía. Tradicionalmente, la identificación taxonómica de estos coleópteros se basa en la revisión de caracteres morfológicos, lo cual se ha traducido en un avance significativo en lo que a la clasificación de la familia Melolonthidae se refiere. No obstante, es indudable que este enfoque requiere de herramientas que permitan la confirmación de identidades a nivel de especie con un mayor nivel de precisión, como la denominada “taxonomía integrativa”. Por tal razón, en el presente trabajo se obtuvo el código de barras de ADN del gen MT-COI de *M. nigripes* y *M. mexicanus* y se complementó la información de las claves dicotómicas basadas en caracteres morfológicos empleadas cotidianamente para la identificación de estos insectos. Las muestras de ADN se obtuvieron del protórax de adultos de cada especie y la amplificación por PCR del gen MT-COI se efectuó utilizando iniciadores universales. Las secuencias obtenidas fueron ensambladas, editadas y registradas en la base de datos internacional Bold Systems. El análisis del código de barras de ADN de *M. nigripes* y *M. mexicanus* reveló una identidad del 92% entre ellos y un 95% al 89% con otras especies del mismo género.

## 1. Introducción

Los coleópteros integran el orden de insectos más encontrado en la naturaleza, con cerca de 400,000 especies descritas (Zhang, 2011). Todas ellas están agrupadas en 165 familias a nivel mundial (Lawrence *et al.*, 1995) y para Latinoamérica se conocen 129 familias, 6,704 géneros y 72,479 especies (Solís, 1999); estas poseen una enorme diversidad morfológica y ecológica, además de ofrecer numerosos servicios a los ecosistemas terrestres y acuáticos (Köhler *et al.*, 1998). Varios integrantes de este grupo de insectos son especialmente benéficos, ya que tienen un papel importante en la polinización, contribuyen a la eliminación de la materia orgánica en descomposición, se comportan como verdaderos abonadores del suelo y contribuyen a mantener el equilibrio ecológico de las especies (Morón, 2001; Romero-López *et al.*, 2010). Otros, sobre todo en estado larvario, son grandes depredadores y se encargan de eliminar la superpoblación de otras especies (Germain *et al.*, 2013; Jordal *et al.*, 2014). Sin embargo, ciertos coleópteros son plagas en la agricultura y la silvicultura, causando grandes pérdidas económicas (Morón *et al.*, 1993; Morón, 2014). Debido a que existe un gran número de especies que ofrecen distintos servicios ecológicos, es necesaria la identificación certera de estos organismos para asegurar su correcta clasificación y estudio de su biología. En México, utilizando la taxonomía tradicional basada en caracteres morfológicos, se han reconocido 114 familias (Lawrence *et al.*, 1995) y se estima la existencia de más de 35,500 especies de coleópteros (Morón *et al.*, 1993). Al respecto, los investigadores especializados en estudios con taxonomía morfológica han determinado exitosamente cuáles son las características relevantes para identificar con gran seguridad a los miembros de este grupo megadiverso. En particular, las claves elaboradas para coleópteros se enfocan en la revisión de las estructuras genitales (Morón, 1998; 2014; Morón *et al.*, 1997), lo cual, a pesar de su indudable valía, resultan insuficientes para garantizar la identidad de los individuos al 100%, ya que las genitalias, al menos las masculinas, están sometidas a procesos de rápida divergencia (Zunino, 2012). No obstante, existen otras limitaciones en la identificación de especies mediante la taxonomía tradicional, como es la plasticidad fenotípica, variabilidad genética,

diferencias ontogénicas, especies crípticas y dimorfismo sexual (Hebert *et al.*, 2003c).

Como una alternativa para resolver estos problemas, se propuso un sistema completamente basado en el ADN para la identificación de las especies (Hebert *et al.*, 2003). Este sistema, conocido como código de barras de ADN, es una herramienta que permite la identificación de especies mediante el uso de la región corta estandarizada del gen mitocondrial que codifica para la subunidad COI. Esta propuesta del código de barras de ADN no pretende sustituir a la taxonomía morfológica, ya que en la actualidad la identificación de especies se realiza empleando de manera integrada ambas estrategias, tanto la fundamentada en caracteres morfológicos como la de caracteres moleculares (Hebert *et al.*, 2005; Schlick-Steiner *et al.*, 2010).

Actualmente, *Macroductylus mexicanus* (Burmeister) y *Macroductylus nigripes* (Bates), integrantes de la familia Melolonthidae (Cherman y Morón, 2014), solo han sido diagnosticadas mediante caracteres morfológicos. Por esta razón, el presente trabajo pretende obtener el código de barras de ADN del gen mitocondrial COI de estas especies distribuidas en México, con lo cual se contribuirá con su diagnóstico con un mayor nivel de precisión y eficiencia.

## **2. Antecedentes**

### **2.1 Aspectos generales de sistemática y taxonomía**

Con los avances tecnológicos y la incorporación de datos de diversas fuentes (morfológicos, anatómicos, bioquímicos, moleculares, fisiológicos, genéticos, etológicos y ecológicos), se logró que para el siglo XX se buscaran nuevas explicaciones evolutivas a la existencia de grupos mediante la Sistemática. La Sistemática es el estudio de la diversidad biológica y de las relaciones filogenéticas entre los organismos (Nieto-Nafría, 1999). Básicamente, permite el análisis comparativo de los caracteres (homólogos, positivos, preferentemente constantes), evaluación (subjetiva) de la cantidad de semejanza entre unos y otros

organismos y, sobre esa base, elaboración de las filogenias y los agrupamientos. La incorporación de los caracteres moleculares, fisiológicos, ecológicos, etc., han proporcionado información adicional para la identificación y relación de diferentes especies (Moreno-Sanz, 2005). La taxonomía, por su parte, se encarga de la clasificación ordenada y jerárquica de los seres vivos, utilizando caracteres morfológicos, embriológicos, bioquímicos, genéticos, etc (Langguth, 2005). Sin embargo, históricamente ha existido una confusión entre los términos sistemática y taxonomía. Actualmente la sistemática incluye los aspectos descriptivos de la taxonomía, así como la inferencia filogenética morfológica (Wiens, 2000) y molecular (Avice, 1994; Hillis et al., 1996) aunque algunos autores prefieren reservar el término de taxonomía para cuestiones teóricas, referidas a los principios y procedimientos clasificatorios, y emplear el nombre de Sistemática para un campo del conocimiento más amplio (Moorone, 2000).

La descripción y la identificación de las especies son fundamentales para las ciencias biológicas, ya que con ellas se establecen las bases para la construcción del árbol de la vida. Además, facilitan la disponibilidad de los datos básicos para los estudios de conservación y ecología brindando a los seres humanos la posibilidad de aprovechar los recursos subutilizados que ofrece la biodiversidad (Wilson, 2004). A pesar de los más de 300 años de trabajo desarrollado por miles de científicos para conocer la variedad de la vida en el planeta, seguimos lejos de alcanzar una idea precisa de su dimensión. En la actualidad, se han descrito alrededor de 1 millón 740 mil especies en el mundo (WCU, 2010); sin embargo, las estimaciones de la riqueza total de especies, descubiertas y por descubrir, van desde los 7 hasta los 100 millones, lo que muestra nuestro profundo desconocimiento sobre la riqueza natural (Chapman, 2009). Por esta razón, se han buscado alternativas que ayuden a la taxonomía tradicional a identificar esta gran diversidad de especies.

### 2.1.1 Taxonomía morfológica

La necesidad intelectual y práctica de agrupar, ordenar y clasificar en “grandes especies” o grupos biológicos mayores llevó a Aristóteles y a sus discípulos, Teofrasto entre ellos, a comprometerse con un amplio programa comparativo de estudios morfológicos de plantas y animales que, sin duda, deben reconocerse como los iniciadores de la historia natural en la época clásica (Iturbe y Lazcano, 2007). Desde la antigüedad hasta finales del siglo XX y principios del XXI, la mayor parte del conocimiento del árbol de la vida, tanto a nivel de taxones superiores como inferiores, se ha basado principalmente en estudios filogenéticos de datos morfológicos (siendo algunas veces con evidencia y otras con meras observaciones) (Wiens, 2000). La mayoría de las especies se han descrito principalmente en función de su morfología, en este caso, forma, tamaño y color. Como una ventaja principal, los caracteres morfológicos a menudo sirven para asignar individuos a las especies de manera inmediata mediante inspección visual y son aplicables a especímenes vivos, preservados y fósiles. Las desventajas de emplear este tipo de caracteres son: (1) siempre hay un componente subjetivo cuando se definen e interpretan los estados de los caracteres, (2) la demostración de un estado requiere grandes tamaños de muestra (Wiens y Servedio, 2000) y (3) las estructuras morfológicas son difíciles de estudiar, por ejemplo, como sucede en las procariotas (Cohan, 2006). Sin embargo, la morfología continúa siendo crucial en la taxonomía, ya que la mayoría de las especies son descritas e identificadas con base en los datos morfológicos.

### 2.1.2 Taxonomía molecular

Tuvo sus inicios a principios de 1990, utilizando el aparato moderno, avanzado y diversificado de la biología molecular para ayudar a las investigaciones taxonómicas a revelar la existencia de especies crípticas, a favorecer la correcta identificación de especies en estados inmaduros de los especímenes y la clarificación de problemas de sinonimia. También, la taxonomía molecular ha contribuido en gran medida a nuestro conocimiento sobre las relaciones filogenéticas y evolutivas de las especies, así como los procesos de especiación

resolviendo cuándo, dónde y qué líneas ancestrales evolucionaron (Tautz *et al.*, 2003; Hebert *et al.*, 2003). Las nuevas herramientas de la biología molecular han ayudado en el estudio de la Sistemática y la taxonomía de los animales, que ha pasado de estar basado en el análisis del fenotipo a tomar como referencia al genotipo. La biología molecular es todavía una ciencia muy joven y se fundamenta en los nuevos métodos extraordinariamente poderosos de la tecnología del ADN recombinante, la cual está influyendo en todas las disciplinas biológicas, incluyendo la taxonomía (Purty y Chatterjee, 2016).

Hay dos aspectos de la biología molecular que lo convierten en un método taxonómico poderoso: uno es la gran cantidad de datos que está potencialmente disponible a partir del análisis comparativo de secuencias de proteínas o ADN y la otra es la tasa relativamente constante de acumulación de cambios de una sola base en el ADN, lo que le permite actuar como un reloj molecular (Brown *et al.*, 1979). No obstante, existen ciertas limitaciones como el uso de un solo marcador genético (Elias *et al.*, 2007), la incorporación de genes de una población genéticamente distinta o introgresión (Liu *et al.*, 2010), o presencia de pseudogenes (Rubinoff, 2006). Más aún, los sistemáticos moleculares necesitan de la morfología para determinar las especies que ellos están muestreando (Hillis y Wiens 2000).

### 2.1.3 Taxonomía integrativa

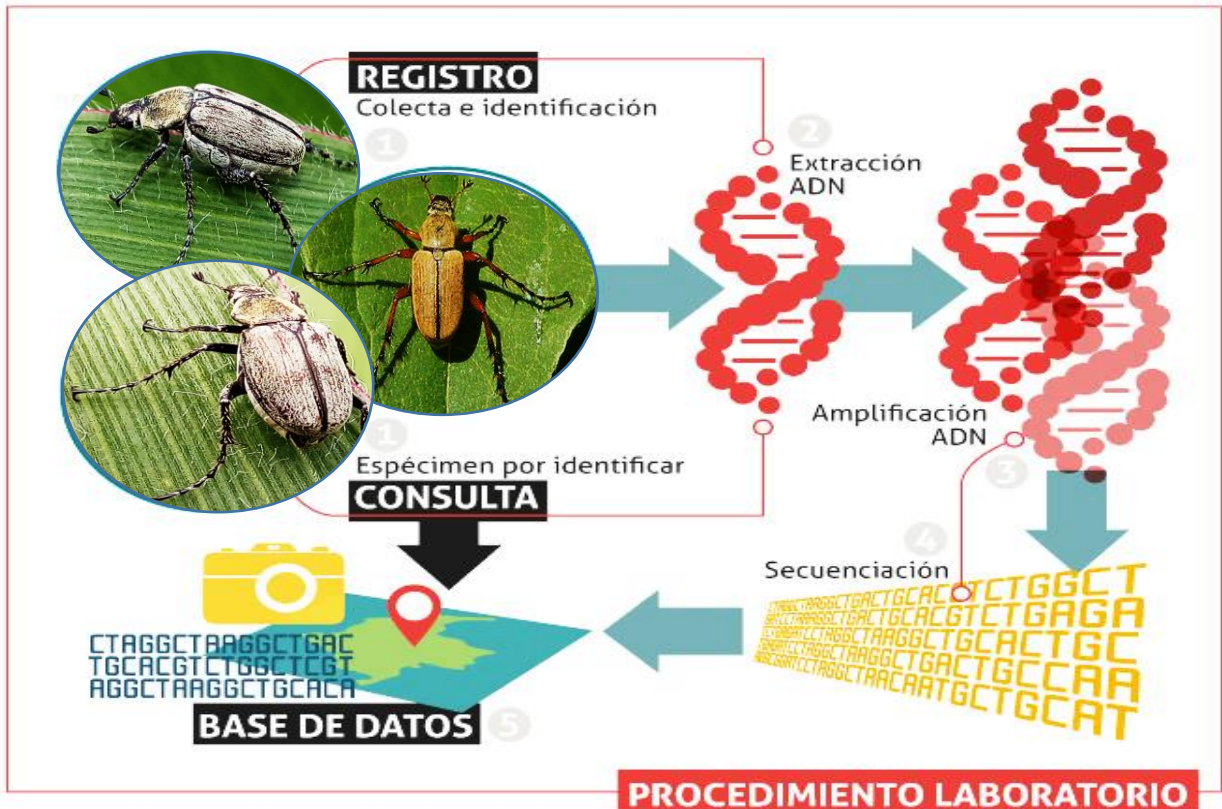
Desde la nomenclatura de Linneo en 1758, los taxonomistas han estado describiendo y nombrando miles de especies cada año, actualmente alrededor de 15,000-20,000 entre los animales solamente (Polaszek *et al.*, 2005), números que aumentan rápidamente para muchos grupos de organismos debido a la incorporación de nuevas herramientas para el descubrimiento y la exploración de áreas poco conocidas del planeta (Agapow *et al.*, 2004; Köhler *et al.*, 2005; Padiál *et al.*, 2006). Actualmente la taxonomía integra técnicas morfológicas, ecológicas, genéticas, etológicas y moleculares, lo cual ha permitido que la identificación de las especies sea más rápida, eficiente y confiable, formando lo que se conoce como "Taxonomía integrativa" (Hebert *et al.*, 2003). La taxonomía integradora se

introdujo formalmente en 2005 como un marco integral para delimitar y describir taxones integrando información de diferentes tipos de datos y metodologías (Dayrat, 2005; Will *et al.*, 2005). Los taxones propuestos a partir de datos integrados son hipótesis mejor definidas y mejor apoyadas para el desarrollo de otros estudios. Las especies mal definidas conducen a respuestas incorrectas en cualquier disciplina, lo que pone de relieve la importancia de esa propuesta. Schlick-Steiner *et al.*, (2010) mencionan que la taxonomía integrativa no reemplaza a la taxonomía tradicional, sino que utiliza la complementariedad entre disciplinas para así determinar con mayor exactitud una especie o subespecie.

## **2.2 Código de barras de ADN**

Tradicionalmente, los organismos han sido identificados mediante el uso de caracteres morfológicos. Sin embargo, existen algunas limitaciones en el empleo únicamente de características morfológicas para la clasificación de las especies crípticas, con plasticidad fenotípica o que presentan estados diferentes en el desarrollo. Por lo tanto, como una estrategia para resolver gran parte de estos problemas surgió la propuesta del código de barras de ADN. Esta herramienta molecular sirve con un doble propósito, ya sea como un nuevo método de identificación para los taxónomos experimentados y como un dispositivo innovador para los no expertos (Hebert y Gregory, 2005). Un código de barras de ADN, en su definición más simple, es una o más secuencias de genes cortos tomadas de una parte estandarizada del genoma utilizado para identificar especies (Gernandt *et al.*, 2011). El uso de tales secuencias cortas de ADN para la identificación biológica fue propuesto con el objetivo final de una identificación rápida y fiable a nivel de especie a través de todas las formas de vida, incluyendo animales, plantas y microorganismos (Hebert *et al.*, 2003). Como se mencionó anteriormente, el código de barras genético es una herramienta que ayuda a resolver algunos problemas en la taxonomía morfológica. Con el número de especies nombradas en aumento, las herramientas moleculares se han convertido en un pilar del análisis taxonómico moderno. Sólo una pequeña cantidad de tejido

se necesita para la 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 (Floyd *et al.*, 2002; Hebert *et al.*, 2003a; Savolainen *et al.*, 2005). En la figura 1 se esquematiza el mecanismo para obtener el código de barras de la vida, siendo el primer paso la colecta e identificación de los especímenes; posteriormente, se extrae el ADN y se lleva a cabo una PCR para amplificar un fragmento del gen y efectuar la secuenciación. La información obtenida de la secuenciación se registra en la base de datos The Barcode of Life Data (BOLD) Systems para obtener el código de barras representativo de dichas secuencias. En el código de barras de ADN se plantea que la caracterización de los organismos se puede hacer de manera similar a la identificación de los productos comerciales, usando el sistema internacional de códigos de barras. Este sistema se basa en la representación de un patrón único de líneas verticales paralelas con diferente grosor y espaciado. El conjunto de esta agrupación de líneas y espacios contiene una determinada información para identificar al producto de manera única e inequívoca. De esta manera, los códigos de barras han favorecido la rápida identificación de artículos para saber sus características generales, así como para ordenarlos e inventariarlos.



**Figura 1. Esquema general del mecanismo para obtener un código de barras de la vida.** (1) El primer paso es la colecta e identificación de especímenes; la extracción de ADN se lleva a cabo con una porción de tejido (2); se realiza una PCR para la amplificación de un fragmento del gen (3). Las muestras se secuencian (4) y finalmente la información obtenida de la secuenciación se registra en una base de datos. Tomado y modificado de iBOLColombia.

Los códigos de barras de ADN para la clasificación de organismos tendrían este mismo principio, pero en lugar de usar líneas de diferente grosor se emplean secuencias de ADN donde cada base nitrogenada es representada por una línea vertical de un solo color. Por lo tanto, un código de barras de ADN se verá con líneas verticales de color verde para la adenina, rojo para la timina, amarillo guanina y azul para la citosina (Ebach, 2011). El código de barras de ADN es una herramienta del área de la biología molecular que permite discernir la especie a la cual pertenece cualquier organismo, ya que representa un sistema de clasificación reproducible y fiable para la taxonomía integrativa (Herbert, 2003). Para obtener un código de barras de ADN se utilizan genes marcadores; dentro de los genes más comúnmente empleados están los genes MT-COI, matK, rbcL y tufA2. El

primero de estos genes se utiliza para la identificación y clasificación de organismos el reino animal; de hecho, usando una secuencia estandarizada de 650 nucleótidos del gen MT-COI se han podido identificar 167 944 diferentes especies de animales. El gen mitocondrial MT-COI es un excelente marcador ya que posee una tasa de evolución entre cinco y diez veces más rápida que la de genes nucleares. El gen citocromo C oxidasa I es prácticamente del mismo tamaño en todos los animales y se ha planteado que un fragmento de 650 nucleótidos de dicho gen presenta suficiente variación para permitirnos discernir entre dos especies cercanamente emparentadas (Tsukihara, 1996). Una vez que surgió la idea del código de barras del ADN, se constituyó un consorcio internacional, el Consortium for the Barcode of Life (CBOL), con participantes de museos de historia natural, herbarios, organizaciones de biodiversidad, etc. El objetivo principal de esta sociedad era la creación de una base de datos con el código de barras de ADN de todas las especies identificadas morfológicamente. Además, contenía otras informaciones como nombre científico, fotografías, número de catálogo, lugar de procedencia y otros datos de interés (Schindel, 2005). Sin embargo, los códigos de barras tienen tanto ventajas como desventajas. Entre las ventajas es que la identificación se puede realizar con solo tener un pequeño fragmento de tejido, ya sea restos de hojas, semillas, sangre, plumas etc., o bien al tener una gran cantidad de organismos, la identificación será más rápida. En contraste, también existen algunas limitaciones como: 1) con un solo gen es muy difícil identificar especies híbridas; para ello sería necesario el análisis de múltiples genes independientes de origen mitocondrial y nuclear (Barber *et al.*, 2006); 2) la presencia de pseudogenes del gen MT-COI (copias inactivas), que han sido transferidas al genoma nuclear y que muestran usualmente un gran número de sustituciones y/o deleciones complicando las identificaciones (Bensasson *et al.*, 2001; Ballard *et al.*, 2004) y 3) el uso de uno o varios genes provenientes de un genoma haploide puede afectar la identificación correcta de una especie (Elias *et al.*, 2007). Debido a esto, el código de barras no puede sustituir por completo a los análisis taxonómicos. Es muy importante que la

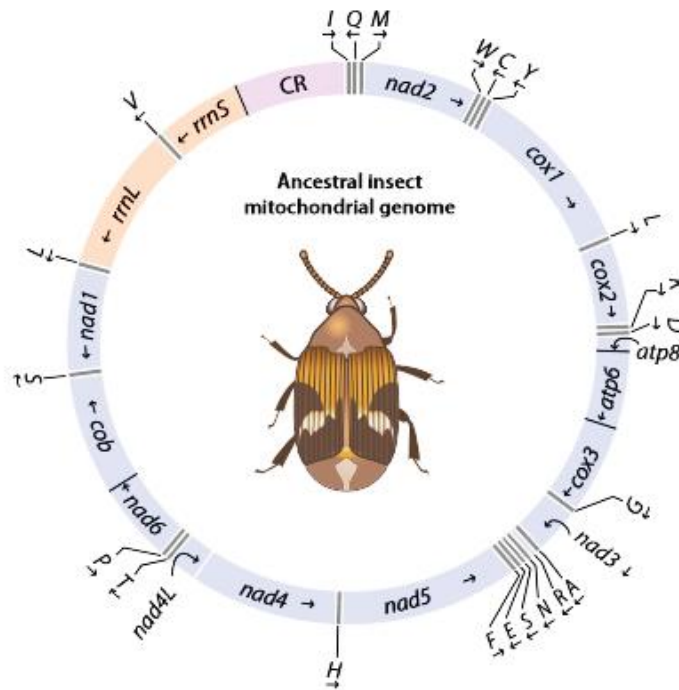
taxonomía molecular sea muy afín a la taxonomía morfológica para así tener una identificación más confiable y precisa (Erickson *et al.*, 2012).

### 2.2.1 Propiedades del código de barras

La idea detrás de los códigos de barras de ADN es encontrar un solo segmento de ADN que es útil para la identificación de todos los taxones. Los investigadores todavía están tratando de encontrar un único segmento de ADN. No obstante, las propiedades deseadas de los códigos de barras de ADN están claramente definidos:

- El fragmento de ADN debe ser casi idéntico en ejemplares 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).
- El marcador debe ser robusto y tener sitios conservados que le permitan amplificarse y secuenciarse fácilmente.

Sin embargo, en el genoma mitocondrial se han encontrado algunos genes que cumplen estos requisitos. Por ejemplo, el genoma mitocondrial de insecto (Figura 2) que es una molécula circular compacta, típicamente de 15-18 kb de tamaño se codifican 37 genes: 13 PCGs codifican subunidades de cuatro de los cinco complejos de cadena de transporte de electrones, 2 genes de ARN ribosomal (ARNr) y 22 genes de ARN de transferencia (ARNt) que participan en la traducción de los PCGs (Boore, 1999).



**Figura 2. Genoma mitocondrial de un insecto.** Los genes de ARN de transferencia están indicados por las abreviaturas de IUPAC-IUB de una sola letra para su aminoácido correspondiente. Tomada de Cameron (2014).

De todos estos genes, un fragmento del gen mitocondrial (650 pb) que codifica para la subunidad I del citocromo C oxidasa fue el primero en ser empleado para el código de barras y con gran aceptación en la comunidad científica debido a su falta de intrones y su exposición limitada a recombinación (Hebert *et al.*, 2003; Hajibabaei *et al.*, 2006; Triantafyllidis *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2008). Las pruebas efectuadas hasta el momento en diferentes grupos de investigación demuestran que el fragmento del gen MT-COI puede ser útil y suficiente para proveer un código de cuatro letras e innumerables combinaciones y así lograr la identificación de aproximadamente un 99% de las especies (Bertolani *et al.*, 2011). No hay una razón convincente para enfocar el análisis en un gen específico, pero el gen MT-COI tiene dos importantes ventajas. En primer lugar, los cebadores universales de este gen son muy robustos, ya que habilitan la recuperación de su extremo 5' de la mayoría de sus representantes (Folmer *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1997). En segundo lugar, posee un mayor rango de señal filogenética que cualquier otro gen

mitocondrial. Sus nucleótidos en tercera posición muestran una alta incidencia de sustituciones de bases, que conduce a una tasa de evolución molecular que es aproximadamente tres veces mayor que la de 12S o 16S rADN. De hecho, la evolución de este gen es lo suficientemente rápida para permitir que la discriminación no sólo de especies muy afines, sino también de grupos filogeográficos dentro de una sola especie (Cox *et al.*, 2001).

La característica más importante de los códigos de barras de ADN es que son estándares y los datos son de acceso libre. Aunque el éxito de los códigos de barras de ADN no ha sido igual en todos los grupos taxonómicos, en general las campañas actuales han sido exitosas en la generación de grandes cantidades de datos y en la caracterización de la biodiversidad. Además, de la identificación de especímenes, la generación de cantidades masivas de datos genéticos estandarizados tiene el potencial de revolucionar los estudios ecológicos y evolutivos de fauna y flora, sobre todo en comunidades con una alta riqueza. Con o sin códigos de barras, el nuevo siglo está convirtiéndose en el siglo de la genética, la genómica y la meta-genómica (Paz *et al.*, 2011).

### 2.2.2 Código de barras en insectos

Los insectos son el grupo más diverso del planeta, con 1,004,898 especies formalmente descritas (Adler y Footitt, 2009). Actualmente se incluyen catálogos (CAT) de siete grupos de insectos, entre ellos los más diversos son los coleópteros, las mariposas y las polillas (lepidópteros) (Brusca y Brusca, 2002). La identificación de insectos ha sido una tarea monumental donde se requiere la disponibilidad de una gran cantidad de especialistas y de recursos económicos. Para catalogar la gran cantidad de especies, a los naturalistas se les ocurrió la idea de clasificar a los seres vivos sobre la base de la taxonomía. Después de 250 años de Darwin y Linnaeus, un nuevo método llamado código de barras de ADN, una herramienta de taxonomía basada en ADN se usa para identificar especies conocidas y desconocidas (Novotny *et al.*, 2002). El código de barras de ADN es muy útil en múltiples disciplinas como agricultura, medicina forense, ecología, etc. (Meier *et al.*, 2006; Valentini *et al.*, 2008).

Un aspecto positivo del código de barras es que facilita la asociación de los distintos estados de desarrollo ontogenético de la misma especie. En insectos holometábolos, el hallazgo de huevos, larvas y pupas disociados de los ejemplares adultos difícilmente permite una adecuada identificación (Armstrong y Ball, 2005). Una de las primeras aplicaciones con un enfoque basado en el ADN para la identificación involucró especies de moscas importantes para la ciencia forense. Los integrantes de Calliphoridae y Sarcophagidae ponen huevos en los cadáveres poco después de la muerte. Debido a que cada especie tiene un marco de tiempo para el desarrollo de huevo a adulto, la etapa de la vida particular asociada con un cadáver puede proporcionar evidencia clave para determinar el momento de la muerte (intervalo PMI) (Smith, 1986; Catts y Haskell, 1990). Sin embargo, debido a que diferentes especies de moscas tienen diferentes tasas de desarrollo, las identificaciones precisas de especies son necesarias para hacer una estimación precisa del PMI. Debido a que solo los adultos se pueden identificar de manera confiable a nivel de especie, los gusanos tenían que ser recolectados y criados hasta llegar a estado adulto, lo que constituye un retraso significativo en el proceso (Nelson *et al.*, 2007). Los entomólogos forenses se dieron cuenta rápidamente del potencial de los métodos basados en el ADN para distinguir especies de cualquier etapa de la vida y de material preservado muerto. Como resultado, ahora existe una extensa literatura que detalla cómo las secuencias de ADN (principalmente COI) pueden discriminar con precisión las especies de moscas de importancia forense (Sperling *et al.*, 1994; Malgorn y Coquoz, 1999; Vincent *et al.*, 2000; Wallman y Donnellan, 2001; Wells y Sperling, 2001; Wells *et al.*, 2001; Solano *et al.*, 2013).

Algunos de los trabajos donde el código de barras para insectos fue de gran utilidad, lo encontramos en la investigación de Jalali y colaboradores (2006) quienes colectaron cuarenta y dos insectos de varios ecosistemas de la India. Los especímenes fueron identificados morfológicamente, clasificados y distribuidos en familias, géneros y especies en una filogenia. Además, los códigos de barras del gen MT-COI se utilizaron para diferenciar una especie de otra en un árbol filogenético en el que se obtuvieron dos clados: el primer grupo que consistió en

lepidópteros, dípteros, hemípteros y coleópteros, mientras que otro grupo mostró una relación entre insectos himenópteros. Todas las secuencias del gen MT-COI están disponibles en BOLD Systems ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)) en la sección de Proyecto General de Insectos de importancia agrícola en la India (AGIMP). Otro trabajo es el de Foley *et al.* (2007), quienes construyeron una filogenia molecular del complejo de especies australianas *Anopheles annulipes* Walker basado en cuatro loci diferentes tanto nucleares como mitocondriales (COI, ITS2 y EF-1 $\alpha$ ). A pesar de utilizar un fragmento más corto de COI (258 pb) que la región del código de barras estándar (658 pb), se encontró en este estudio que 11 de las 17 especies hermanas (65%) tenían secuencias únicas de COI y los autores concluyeron que "el código de barras del ADN es prometedor para el diagnóstico de especies dentro del complejo *annulipes* y quizás para otros anofelinos". Un estudio reciente de integrantes de *Belvosia* (Diptera: Tachinidae) del noroeste de Costa Rica, se examinó su diversidad al criar especímenes de orugas capturadas en el medio silvestre, registrando su morfología y las secuencias del gen MT-COI (Smith *et al.*, 2006). Con las secuencias de ADN no solo se pudieron diferenciar 17 especies conocidas del género, sino que también se elevó el número de especies a 32 al revelar que 3 especies que se creía eran hospedadores generales, en realidad eran complejos de especies crípticas altamente específicas del huésped.

Todos estos estudios muestran el poder del código de barras del ADN como herramienta para identificación inequívoca de especies. No obstante, la propuesta del código de barras no pretende, ni podría, sustituir la taxonomía morfológica (Schindel y Miller, 2005). Por lo tanto, su enfoque actual está principalmente orientado a facilitar el diagnóstico de especies.

## **2.3 Generalidades de la familia Melolonthidae**

### **2.3.1 Clasificación**

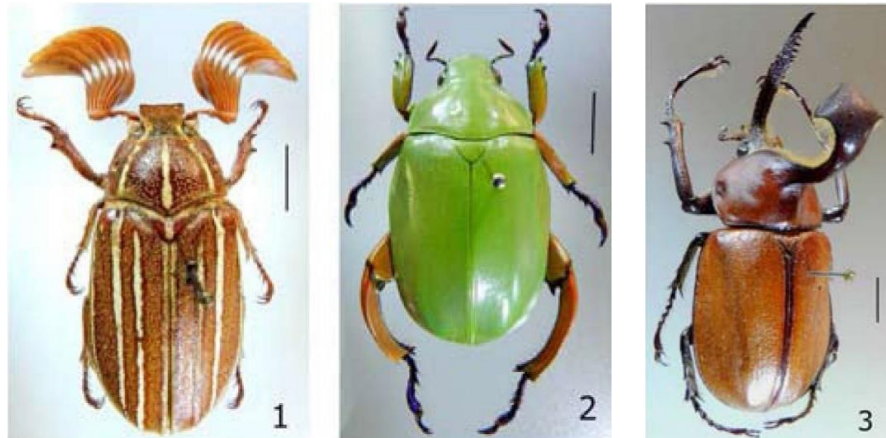
La familia Melolonthidae Leach, 1819 fue definida por Endrödi en 1966 como un grupo cosmopolita compuesto principalmente por las subfamilias Melolonthinae, Dynastinae, Rutelinae y Cetoniinae, formadas por taxones con hábitos fitófagos o

fitosaprófagos, a diferencia de otros grupos de Scarabaeoidea. A nivel mundial, históricamente se han manejado varias clasificaciones supragenéricas para los Coleoptera Lamellicornia o Scarabaeoidea, aunque prevalecen tres criterios o tendencias. Una utilizada por Balthasar (1963) quien considera la existencia de 18 familias, entre las que se cuentan los grupos fitófagos Melolonthidae, Rutelidae, Dynastidae y Cetoniidae. Otra propuesta es la de Lawrence y Newton (1995) que consideran válidas la mayoría de las familias de "Laparosticti" (*sensu* Balthasar 1963), pero las subfamilias de Melolonthidae (*sensu* Endrödi 1966) las incluyen en la familia Scarabaeidae como el conjunto de grupos de especies fitófagas (Pleurosticti) diferente a los grupos coprófagos (Scarabaeinae y Aphodiinae). Por último, está la propuesta de Endrödi que consideró cinco familias (Trogidae, Passalidae, Lucanidae, Melolonthidae y Scarabaeidae), donde los grupos fitófagos quedan incluidos como subfamilias de Melolonthidae (Melolonthinae, Rutelinae, Dynastinae, Cetoniinae). Esta es utilizada ampliamente por especialistas de América Latina (Morón, 1997), en especial los dedicados al control de escarabajos plaga (Cherman y Morón, 2014).

Bates (1887) propuso la división del grupo Scarabaeoidea en subtribus, con base en la estructura de la lígula y el mentón. En la subtribu caracterizada por la fusión de la lígula y el mentón, Bates (1887) incorporó las Familias Chasmatopteridae, Melolonthidae, Rutelidae, Dynastidae, Cetoniidae y Trichiidae, grupos equivalentes a los que Erichson (1848) consideró dentro de la línea Pleurosticti, debido a la ubicación de sus estigmas respiratorios en los extremos laterales de los esternitos. Este grupo dio lugar a la serie Scarabaeidae-Pleurosticti de Janssens (1949) y la propuesta de Endrödi (1996) para reconocer a este conjunto de grupos como una familia diferente, denominada Melolonthidae, hermana de los Scarabaeidae-Laparosticti o Scarabaeidae (*sensu stricto*) (Morón *et al.*, 1997).

El sistema de clasificación de Endrödi (1966) fue adoptado por Morón (1976, 1984, 1997) y promovido entre los estudiantes, técnicos e investigadores de América Latina, sobre todo entre los interesados en el estudio de los escarabajos asociados con los cultivos agrícolas (Cherman y Morón, 2014). La clasificación aceptada recientemente considera que Melolonthidae está integrada por las

subfamilias Melolonthinae, Dynastinae y Rutelinae (Figura 3), mientras que la subfamilia Cetoniinae es considerado como un grupo monofilético y por lo tanto, es ahora considerado a nivel de familia (Cetoniidae) (Cherman y Morón, 2014).



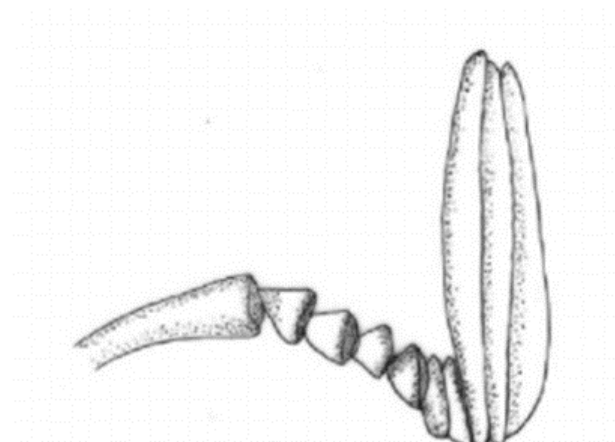
**Figura 3. Adultos de algunas de las primeras especies de Melolonthidae.** 1) *Melolontha petiti* Guérin-Meneville, 1830 “Mexique” (Melolonthinae). 2) *Scarabaeus macropus* Francillon, 1795 “San Luis Potosi” (Rutelinae). 3) *Golofa pizarro* Hope 1837 “Mexico” (Dynastinae). Escalas=1cm. Tomada y modificada de Morón et al., 2014.

### 2.3.2. Caracteres morfológicos y distribución

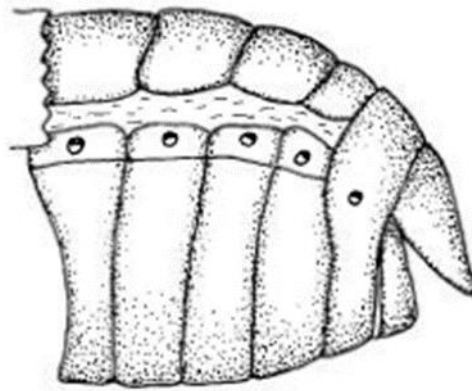
Hasta principios de 2012, se cuenta con registros para 1 179 especies de Coleoptera Melolonthidae en todas las entidades federativas de México. Esta cifra corresponde a un 6% de las especies de Melolonthidae citadas en el mundo, incluidas en las subfamilias Melolonthinae, Rutelinae y Dynastinae (Cherman y Morón, 2014).

Los integrantes adultos de la familia Melolonthidae varían en tamaño entre los 3 y 170 mm. Son escarabajos con forma ovalada o alargada, a veces con aspecto robusto y en otros casos esbelto. Sus patas normalmente son largas y finas (Morón, 1986). Su coloración abarca desde el negro, pardo oscuro, pardo rojizo, castaño amarillento, brillantes u opacos y con frecuentes las especies con patrones de colores contrastantes, verde, azul, rojo con negro o con blanco,

textura aterciopelado o escamosa. Presentan un escapo antenal mucho más corto que el flagelo y la maza antenal está constituida por tres a siete artejos alargados y aplanados, cuya superficie generalmente tiene un aspecto brillante y sedas dispersas (Figura 4). Los estigmas respiratorios de los últimos tres segmentos abdominales están colocados sobre la porción lateral de los esternitos, condición denominada Pleurosticti y en la mayoría de las especies estos estigmas son visibles cuando los élitros están en posición de reposo (Figura 5). Los tres pares de patas presentan cinco artejos tarsales, y las uñas tarsales se encuentran bien desarrolladas. El labro y las mandíbulas parcialmente expuestas u ocultas bajo el clípeo. Mandíbulas esclerosadas. Es frecuente un acentuado dimorfismo sexual, que es aparente sobre todo en la presencia de proyecciones cefálicas o protorácicas en forma de cuernos y en la hipertrofia de las patas protorácicas o metatorácicas (Morón *et al.*, 1997). Es posible encontrarlas en casi todo tipo de ecosistemas, entre el nivel del mar y los 3000 m de altitud. Los adultos tienen hábitos crepusculares o nocturnos, aunque algunas especies, como las del género *Macroductylus*, se encuentran activas durante las horas más soleadas del día (Arce-Pérez y Morón, 2000). El ciclo de vida puede durar entre 1 y 3 años (Morón, 1986).



**Figura 4. Ilustración de la maza antenal de *Phyllophaga Lissopyge*.** Maza antenal con tres artejos. Tomada de Vallejo y Wolff (2013).



**Figura 5. Ilustración de la condición Pleurosticti.** Estigmas visibles cuando los élitros están en posición de reposo. Tomado de Baraud (1992).

## **2.4 Generalidades del género *Macrodactylus***

El género *Macrodactylus* está formado por 112 especies distribuidas desde el centro sur de Argentina y Chile hasta el sureste de Canadá (Arce-Pérez y Morón, 2005). Existen 27 especies de *Macrodactylus* distribuidas en México; la mayoría de ellas son consideradas como plagas agrícolas. Las larvas son rizófagas estrictas y son llamadas “gallinas ciegas” y los adultos, conocidos comúnmente como “frailecillos”, dañan de manera importante hojas, yemas, flores y frutos de una gran cantidad de especies cultivadas (Caselín-Castro *et al.*, 2003).

### **2.4.1 Descripción morfológica a nivel genérico**

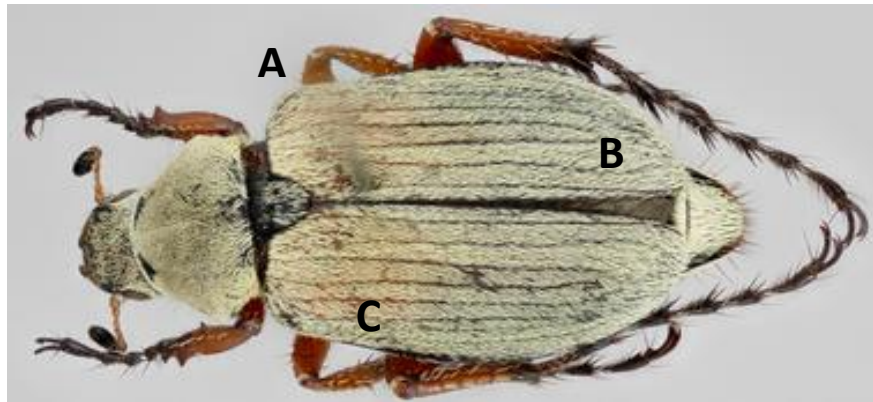
Los adultos de este género presentan una cabeza oblonga, alargada u ovalada con el clípeo trapezoidal truncado, apicalmente recto, cóncavo o levantado; los últimos artejos de los palpos labiales y maxilares son oblongos y sumamente punteados; las antenas con nueve artejos, los del pedúnculo ovalados, estrechos en la base y ampliándose hacia el ápice, el sexto pequeño, comprimido y asimétrico; los tres artejos distales son laminares y forman una maza oblonga, generalmente con sedas en la superficie. Mesonoto con el escutelo triangular alargado, con su ápice redondeado; élitros largos, anchos cubriendo cinco

esternitos abdominales. Patas largas y delgadas; mesotibias con dos espolones largos; región tarsal con cinco artejos largos, estrechos en la base y amplios en el ápice, los cuales presentan anillos de sedas blanquecinas o sólo sedas cortas como espinas dispersas; el quinto artejo con dos uñas largas recurvadas y bífidas en la punta. El integumento corporal generalmente pardo oscuro o negro, con tonalidades rojizo-amarillentas; las antenas en su mayoría con el pedúnculo amarillo-rojizo y la maza negra, pero algunos las tienen de un solo color. En la mayoría de las especies, la coloración dorsal es diferente a la coloración ventral, siendo oscuros ventralmente y coloridos en su parte dorsal (Arce-Pérez y Morón, 2000).

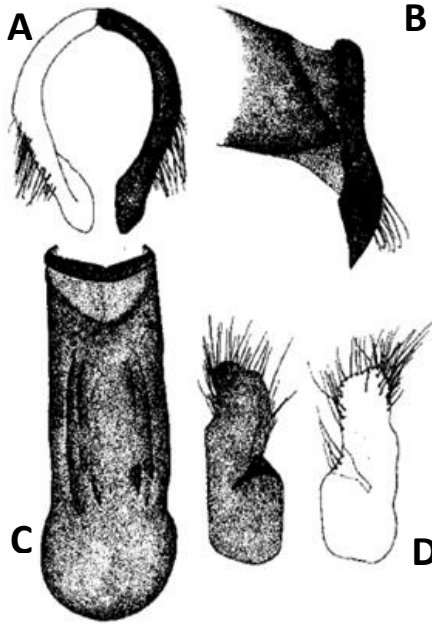
#### 2.4.2 Descripción morfológica y hábitos de adultos y larvas de *Macrodactylus mexicanus* y *Macrodactylus nigripes*

Dentro de las principales características morfológicas de los adultos de *Macrodactylus mexicanus* Burmeister, pueden destacarse Cabeza negra, cubierta de vestidura exceptuando la región occipital y el tercio apical del cílopeo, artejos antenales pardo-rojizos; piezas bucales negras. Pronoto negro con vestidura setífera amarilla o grisácea recumbente. Meso y metatibias rojizas con los ápices oscuros; élitros con el integumento del disco rojizo ceniciento, oscureciendo hacia los márgenes progresivamente desde su mitad posterior hacia los ápices, cubiertos por densa vestidura setífera gris o amarilla que permite ver claramente seis estrías libres de sedas. (Figura 6). Genital masculino rojizo oscuro con sus parámetros circulares y redondeados e hileras de sedas algo gruesas y poco acumuladas cerca del ápice, sus ápices lanceolados y redondeados en la punta; hembras similares a los machos, pero más cortas y robustas. Placas genitales largas, ovales, con su tercio apical externo ligeramente emarginado y su región media interna cóncava, ápice redondeado asimétrico, toda la región anterior interna y un quinto de la exterior con numerosos puntos profundos de donde salen sedas largas principalmente en el ángulo

exterior (Figura 7) (Arce-Pérez y Morón 2000). El clípeo es trapezoidal aplanado, corto, tan ancho como largo, con los bordes laterales curvados y el ápice claramente sinuado (Carrillo, 1960). Están activos durante mayo, junio, julio, agosto y septiembre, en ambientes templados, fríos o semi-cálidos moderadamente húmedos, situados entre los 100 y 2650 m de altitud, aunque es más común en alturas superiores a los 1000 m (Arce-Pérez y Morón, 2000).



**Figura 6. Adulto hembra de *Macroductylus mexicanus*.** A) Meso y metatibias rojizas, B) Élitros no uniformemente coloreados y con seis estrías desnudas, C) Base de los élitros pardo-rojizo o grisácea. Tomada de Royals (1969).



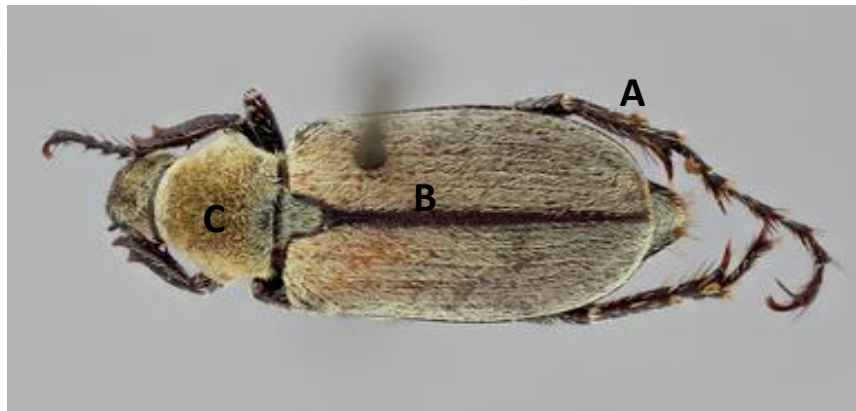
**Figura 7. Ilustración que muestra las estructuras genitales del macho (A,B,C) y hembra (D) de *Macroductylus mexicanus*. A) Parámetros vista frontal, B) Vista lateral, C) Falobase vista dorsal, D) Placas genitales vista dorsal. Tomada de Arce-Pérez y Morón (2000).**

Se alimentan de estructuras reproductivas del maíz, alfalfa, frijol y manzano; viven de 3 a 6 semanas y con frecuencia se les considera como una plaga. Las hembras depositan sus huevos en el suelo, en grupos de 5 a 30, a una profundidad de 15-30 cm; éstos son de forma esférica u oval y color blanco-opaco, con aspecto de pequeñas perlas (Carrillo, 1960).

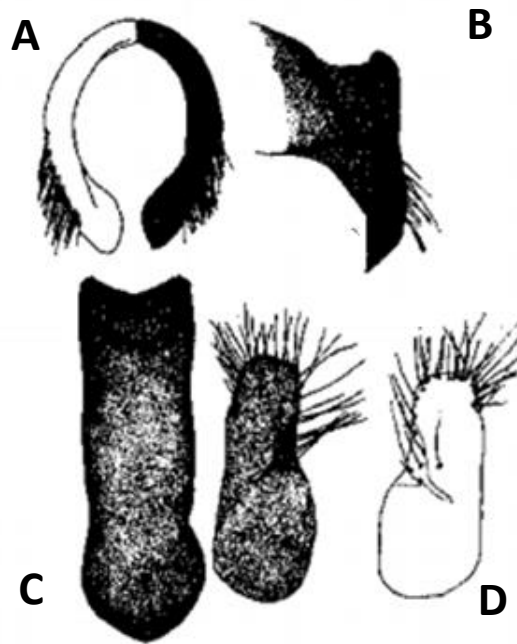
En el caso de las larvas de esta especie, estas se desarrollan en el suelo consumiendo humus y raíces. Cuando recién emergen son blancas y brillantes; la cabeza es grande en proporción al tamaño del cuerpo; este último es delgado, casi cilíndrico y con infinidad de pubescencias alrededor. Los tres pares de patas torácicas bien desarrolladas y con sedas erectos. Superficie craneal con 3 sedas dorsoepicranianas, 1-2 sedas epicranianas y 7 sedas para-oculares en cada lado. Labrum casi simétrico, redondeado a los lados, con 5 sedas posteriores, 2 sedas centrales y 5 sedas laterales en cada lado; epifaringe con hilera transversal de 4-5 heli y cada palidia con 5-6 pali. Además, el labio anal inferior se encuentra

profundamente hendido en la línea media; ranura anal en forma de “Y” (Aragón *et al.*, 2010).

Con respecto a los adultos de *Macroductylus nigripes* Bates, estos presentan cabeza negra con el clipeo corto, robusto y sumamente punteado, funículo antenal amarillo con la maza negra. Piezas bucales pardas oscuras. Patas negras o pardo oscuro (ocasionalmente los fémures y tibias con tonalidades amarillentas o rojizas) y los tarsos con anillos de sedas blanquecinas; integumento del pronoto negro brillante y de los élitros negro o pardo oscuro brillante; superficie dorsal con densa vestidura larga, gris o verdosa- amarilla en algunos casos se puede ver cuatro estrías no bien definidas. (Figura 8).



**Figura 8. Adulto macho de *Macroductylus nigripes*.** A) Patas negras o pardo oscuro, B) Integumento del pronoto negro brillante y de los élitros negro o pardo oscuro brillante, C) Superficie dorsal con densa vestidura larga, gris o amarilla. Tomada de Royals (1956).



**Figura 9. Ilustración que muestra las estructuras genitales de macho (A, B, C) y hembra (D) de *Macroductylus nigripes*.** A) Parámetros vista frontal, B) Vista lateral, C) Falobase vista dorsal, D) Placas genitales vista dorsal. Tomada de Arce-Pérez y Morón (2000).

Genital masculino oscuro con los parámetros circulares, ápice lanceolado corto y redondeado; hembras similares a los machos, pero con su pronoto densamente cubierto por vestidura poco erecta en el disco y recumbente en los márgenes y siempre de color más intenso que el resto del cuerpo. Placas genitales largas y ovals con sus márgenes externos rectos y su ápice truncado algo redondeado; entre su mitad anterior interna y un quinto externo existen puntos profundos donde se insertan numerosas sedas largas y esbeltas (Figura 9) (Arce-Pérez y Morón 2000). El cípeo es corto, robusto y sumamente punteado; los palpos labiales tienen tres artejos robustos, siendo el primer artejo labial rodeado por sedas largas y grisáceas. El pronoto es hexagonal, mientras que los mesonotos con el escutelo son triangulares con su punta redondeada y los élitros son largos, cubriendo cinco esternitos (Caselín-Castro *et al.*, 2003). Los integrantes de esta especie se encuentran en ambientes templados a fríos, húmedos o subhúmedos, situados entre los 1000 y 2500 m de altitud. Son capaces de consumir el follaje, el polen y la savia de cultivos importantes como el maíz y el haba (Caselín-Castro *et al.*,

2003). Los machos y las hembras se encuentran comúnmente en un gran número de hojas, flores y frutas de maíz, manzana y en arboles de melocotón y en especies de *Senecio* y *Baccharis* (Asteraceae) (Arce-Pérez y Morón, 2000).

Con respecto a las larvas, estas presentan: superficie craneal con 4-5 sedas dorsoepicranianas, una seda epicranial y 6 sedas para-oculares en cada lado. Labrum casi simétrico, redondeado a los lados, con 5 setas posteriores, 2 setas centrales y 4 sedas laterales en cada lado. Los segmentos dorsales del abdomen I-VI presentan pocas hileras de sedas largas y muchas sedas espinosas; los segmentos VII-X sin setas espinosas, pero cada una con 30 sedas largas, cortas y esbeltas, mientras que cada uno de los segmentos ventrales I-VIII presentan 9 sedas largas y el segmento IX con 6 sedas esbeltas (Aragón *et al.*, 2010).

Las larvas de *M. mexicanus* son similares a las de *M. nigripes* por el número de sedas frontales y por el tamaño de los espiráculos abdominales, pero la presencia de 6-7 heli en la epifaringe y 6-8 pali en cada palidia, sirve para separar a las de *M. nigripes*.

### **3. Justificación**

Dentro de los animales, la clase Insecta es la más abundante con aproximadamente 890,000 hasta más de 1,000,000 de especies alrededor del mundo (Brusca y Brusca, 2002). Toda esta diversidad se encuentra representada por el orden Coleoptera, el cual abarca el 40% de la diversidad de especies de insectos (Costa, 2000). Debido a esta gran diversidad de especies, es muy laborioso conocer, identificar y catalogar a las especies de coleópteros. No obstante, es necesario realizar la identificación de manera rápida, confiable y precisa para ordenar el conocimiento sobre la biología de cualquier especie de insectos. Al respecto, en la actualidad para la identificación certera de coleópteros se requiere de herramientas taxonómicas morfológicas y moleculares, las cuales no han sido aprovechadas adecuadamente para la identificación y clasificación de la mayoría de los grupos. Tal es el caso de los coleópteros Melolonthidae y en particular, de *M. mexicanus* y *M. nigripes*, para los cuales ya se tienen las claves

dicotómicas tradicionales, pero aún no se cuenta con el código de barras de ADN como herramienta molecular para su identificación. Además, se sabe que tanto los adultos como los estados inmaduros de estas especies pueden llegar a causar pérdidas económicas para los agricultores, consecuentemente es fundamental determinar con precisión su identidad taxonómica para favorecer el establecimiento de estrategias para su manejo.

Por lo tanto, en el presente trabajo de tesis se pretende obtener el código de barras de ADN del gen MT-COI de ambas especies, para proporcionar la evidencia molecular que contribuya a una identificación integral de estos insectos, junto con los caracteres morfológicos tradicionales.

#### **4. Hipótesis**

El código de barras de ADN del gen MT-COI de *M. mexicanus* y *M. nigripes* brinda información taxonómica similar que al emplear caracteres morfológicos tradicionales.

#### **5. Objetivos**

##### **5.1 Objetivo general**

Obtener el código de barras de ADN del gen MT-COI de *M. mexicanus* y *M. nigripes*.

##### **5.2 Objetivos particulares**

5.2.1 Identificar adultos de *M. mexicanus* y *M. nigripes* mediante la revisión de caracteres morfológicos externos e internos.

5.2.2 Obtener la secuencia parcial del gen MT-COI a partir de muestras de ADN genómico de adultos de *M. mexicanus* y *M. nigripes*.

5.2.3. Determinar el porcentaje de similitud entre secuencias parciales del gen MT-COI por medio de herramientas bioinformáticas.

## **6. Material y métodos**

### **6.1 Recolecta de adultos**

Los adultos de *M. mexicanus* y *M. nigripes* se capturaron manualmente en una plantación de *Pseudotsuga macrolepis* (Pinaceae) establecida en los terrenos del Rancho “Los Castaños”, Manzanillo, Municipio de Las Vigas de Ramírez, Veracruz (19°38'18.6"N, 97°07'40.7"W). Todas las capturas tuvieron efecto entre las 11:00 y las 13:00 hrs, lapso en que los adultos de ambas especies llevan a cabo su actividad alimentaria y sexual. Los individuos recolectados se trasladaron al Laboratorio de Infoquímicos y Otros Productos Bióticos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, para su revisión y mantenimiento.

### **6.2 Identificación con caracteres morfológicos a través de claves dicotómicas**

Los adultos se agruparon con base en su apariencia corporal externa y sexo. Posteriormente, los especímenes se sometieron a una observación rigurosa utilizando un microscopio estereoscópico binocular VE-S4 Velab®. Para la identificación, se utilizaron las claves propuestas por Morón (1986), Morón *et al.* (1997), Arce-Pérez y Morón (2000) y Delvare *et al.* (2002) y los ejemplares estudiados se utilizaron para establecer un montaje de especímenes representativos. Tres parejas de cada especie fueron sacrificadas en una cámara letal. Posteriormente, cada espécimen fue montado utilizando alfileres entomológicos del número “2”. El alfiler se colocó en la parte superior del élitro derecho y se acomodó el primer par de extremidades hacia adelante. El segundo y tercer par de extremidades se recogieron para colocarlas junto al cuerpo para evitar rupturas durante el manejo de los ejemplares. Además, la antena derecha se expuso mientras que la izquierda se mantuvo oculta. Para el caso de los machos, se extrajo el edeago y el *spiculum gastrale*, los cuales se han propuesto como estructuras relevantes para la identificación de machos de *M. mexicanus* (Benítez-Herrera, 2014). Ambas estructuras se limpiaron y fueron colocadas sobre

pequeños triángulos de cartulina, siendo fijadas con solución de montaje. Cada estructura se colocó junto al ejemplar correspondiente. Para las hembras, se extrajeron las placas anales para que quedaran expuestas y visibles.

Para cada individuo, se elaboraron dos tipos de etiquetas (2.5 X 1.5 cm) con datos referente a su recolecta e identificación. En la primera etiqueta se colocó la información precisa sobre el sitio de recolecta: país, estado, municipio, coordenadas geográficas, fecha de recolecta y recolector. En la segunda etiqueta se anotaron todos los datos de clasificación que incluyen el orden, la familia y el nombre científico del espécimen, seguido por el nombre del determinador. Los dos tipos de etiquetas se ubicaron debajo del ejemplar, dejando una distancia considerable; primero se colocó la etiqueta de localidad y después la etiqueta de determinación.

## **6.3 Identificación por taxonomía molecular con la obtención del código de barras de ADN del gen MT-COI**

### **6.3.1 Purificación del DNA**

La purificación del ADN genómico de tres adultos de *M. mexicanus* y tres de *M. nigripes* se llevó a cabo utilizando el kit comercial DNeasy blood & tissue. Primeramente, se diseccionó la región del protórax para congelarlo durante 1.5 h en hielo seco aproximadamente a -40°C. Más tarde, se realizó una trituración de la sección corporal en un mortero congelado manteniendo las condiciones de bajas temperaturas. El polvo resultante se transfirió a un microtubo estéril de 1.5 ml y se continuó con las instrucciones del kit comercial para obtener el ADN total mediante la adición de 180 µl del amortiguador ATL y 20 µl de proteinasa K. A continuación, las muestras se incubaron a 56°C hasta que el tejido estuvo completamente lisado; ocasionalmente se ayudó a la lisis mediante una agitación mecánica. Más tarde, se agregaron 200 µl de amortiguador AL y se mezclaron mediante agitación en un vórtex. Las muestras se incubaron nuevamente a 56°C por 10 min. Después, se agregaron 200 µl de etanol (100%) y se transfirió toda la mezcla a

una columna con membrana de silica para acoplar el ADN. Las columnas se sometieron a una centrifugación de 8,000 rpm durante 1 min. El sobrenadante se desechó y la columna se lavó mediante la adición de 500 µl de amortiguador AW1, seguido de una centrifugación a 14,000 rpm. El sobrenadante se desechó e inmediatamente se agregaron 500 µl de amortiguador AW2 a la columna, seguido de una centrifugación durante 3 min a 14,000 rpm. La columna se transfirió a un microtubo estéril de 1.5 ml para la elución del ADN con agua estéril. La columna se incubó por 1 min a una temperatura de 15-25°C y se centrifugó por 1 min a 8,000 rpm. Las muestras de ADN purificado se conservaron en congelación a -20°C hasta su uso posterior.

Para la cuantificación de las muestras, se realizó una lectura de absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro nanodrop UV ND-1000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EEUU). De igual manera, para verificar la pureza del ADN, adicionalmente se realizó una lectura a 280 nm para obtener un índice derivado de la relación de absorbancia a 260 nm/280 nm, siendo 1.8 una relación perfecta de pureza para muestras de ADN.

### 6.3.2 Amplificación del gen MT-COI por PCR punto final con iniciadores universales

La amplificación del gen MT-COI se llevó a cabo mediante la PCR punto final, utilizando iniciadores universales. Las reacciones consistieron en 10 ng de ADN, amortiguador 1X, 200 µM de una mezcla de dNTPs, 1 µM de cada iniciador universal (sentido LCO1490 5'GGTCAACAAATCATAAAGAT ATTGG3' y anti-sentido HC02198 5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAA AATCA3') (Folmer *et al.*, 1994), 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1.25 Unidades de Taq polimerasa® Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA). El programa de ciclado que se utilizó constó de 1 ciclo de 3 min a 95°C, 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 40°C, 1.5 min 72°C y 1 ciclo de 7 min 72°C. La reacción de amplificación fue realizada en un termociclador Techne 412 thermocycler (Bibby Scientific, Staffordshire, UK) durante aproximadamente 3.5 h.

Para verificar el peso molecular de los amplicones, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.5 % en TAE1X, durante 1.5 h a 60v. Posteriormente, el gel fue visualizado en un transiluminador UV y el peso molecular del amplicón se determinó por comparación con las bandas del marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen, Carlsbad, CA).

### 6.3.3 Secuenciación y análisis bioinformáticos

Una vez verificada la eficiencia de PCR y el tamaño del amplicón, se procedió a la secuenciación de los amplicones utilizando el método de Sanger, la cual se llevó a cabo a través del servicio de Macrogen Inc. (Geumcheon-gu, Seoul República de Korea). Para el análisis bioinformático, los electroferogramas de las secuencias del gen MT-COI fueron visualizados en el programa Chromas de libre distribución (calidad de secuencia). Este análisis se realizó para ver la calidad de las secuencias obtenidas y valorar su empleo en los siguientes análisis. La edición de las secuencias (corte de los extremos que no tenían buena calidad) y ensamble (conting) de secuencias sentido y antisense, se efectuó con el programa BioEdit 7.2 (Hall, 1999). Los ensamblados fueron registrados en la base de datos BOLD Systems v4 (<http://www.boldsystems.org>) de acuerdo a los requisitos de registro de datos de los especímenes, secuencias, imágenes y trazas. Para determinar el porcentaje de similitud entre secuencias homólogas entre géneros de Melolonthidae, se elaboró un reporte taxonómico en la base de datos BOLD Systems v4 (<http://www.boldsystems.org>).

### 6.3.4 Análisis de secuencias

El porcentaje de similitud entre las secuencias parciales del gen MT-COI de *M. nigripes* y *M. mexicanus* fue determinado mediante un análisis con el algoritmo BLASTN (Altschul *et al.* 1990) distribuido por el National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para determinar el porcentaje de similitud entre las secuencias del gen MT-COI de las especies de *Macroductylus* con secuencias homólogas ortólogas de especies relacionadas, se

efectuó un reporte taxonómico en la base de datos BOLD Systems. Finalmente, las secuencias obtenidas fueron utilizadas para elaborar un cladograma, utilizando el programa Mega 7 (Kumar *et al.* 2016). Se llevó a cabo un análisis de Máxima Verosimilitud con un modelo general reversible en el tiempo, distribución gamma y sitios invariantes (G + I), y un soporte de ramas por el método de Bootstrap con 1000 remuestreos. Este 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 nuestros datos. En total se utilizaron 12 secuencias para realizar el cladograma, tomando en cuenta a *Macroductylus subspinosus* AAH0345, *Hoplia argéntea* AA18241, *Phyllophaga profunda* AAE4580 y *Phyllophaga rubiginosa* AAC3137 como especies pertenecientes a la subfamilia Melolonthinae y como grupo externo a *Cyclocephala longula* AAH6848y *Cyclocephala parallela* AAY5367 pertenecientes a la subfamilia Dynastinae (Cherman y Morón, 2014).

## **7. Resultados**

### **7.1 Identificación por taxonomía morfológica**

La identificación de los especímenes recolectados se realizó revisando exhaustivamente diversos caracteres morfológicos externos e internos.

Todos los adultos presentaron las características distintivas de Melolonthidae. En cada uno se observó la maza antenal brillante con sedas conspicuas y escasas, formada por tres a siete lamelas. También se encontraron estigmas abdominales colocados sobre los extremos laterales de los esternitos, de tal forma que se identificaron uno o tres pares de ellos ya que los élitros estuvieron plegados. Además, se apreciaron los caracteres más relevantes del género *Macroductylus* como la cabeza oblonga, alargada u ovalada, élitros largos y anchos cubriendo cinco esternitos abdominales y patas largas y delgadas, el integumento corporal pardo oscuro o negro, con tonalidades rojizo-amarillentas; en el caso de las

antenas, en su mayoría se observaron con el pedúnculo amarillo-rojizo y la maza negra, aunque algunos individuos las tuvieron de un solo color.

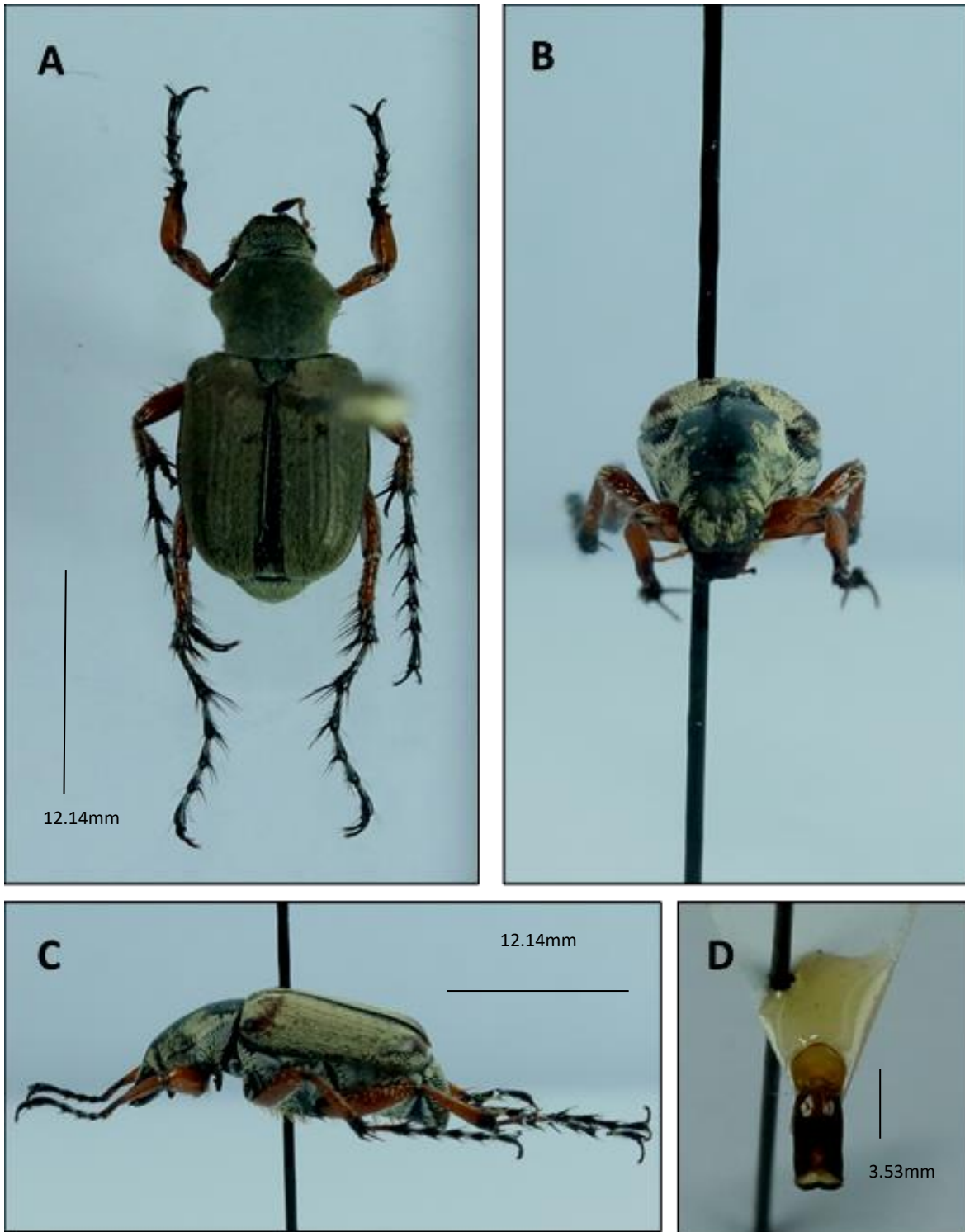
Para la identificación de adultos pertenecientes a *M. mexicanus* y *M. nigripes* se verificó la presencia de las características morfológicas externas e internas con mayor importancia taxonómica (Cuadro1). Referente a las características de *M. mexicanus* estas fueron: meso y metatibias rojizas con los ápices oscuros y élitros no uniformemente coloreados con seis estrías desnudas bien marcadas a lo largo de cada uno; base de los élitros frecuentemente de color pardo-rojizo o grisáceo con la mitad posterior con tonalidad oscura en forma variable, al igual que las partes laterales conforme se acercan al ápice; genital masculino rojizo con sus parámetros redondeados externamente e hileras de sedas algo gruesas y poco acumuladas cerca del ápice, además de ápices lanceolados y redondeados en la punta (Figura 10). En el caso de las hembras, se observó similitud a los machos, pero de menor longitud y robustas.

Con respecto a los adultos de *M. nigripes*, se determinó su identidad por la presencia de patas negras o pardo oscuro (ocasionalmente los fémures y tibias con tonalidades amarillentas o rojizas) y los tarsos con anillos de sedas blanquecinas, élitros negros a pardo oscuro brillante con superficie dorsal con densa vestidura larga, gris o amarilla y genital masculino oscuro con los parámetros redondeados externamente, mientras que los ápices lanceolados cortos y redondeados (Figura 11). Las hembras tuvieron características externas equivalentes a los machos, pero con un pronoto densamente cubierto por una vestidura poco erecta.

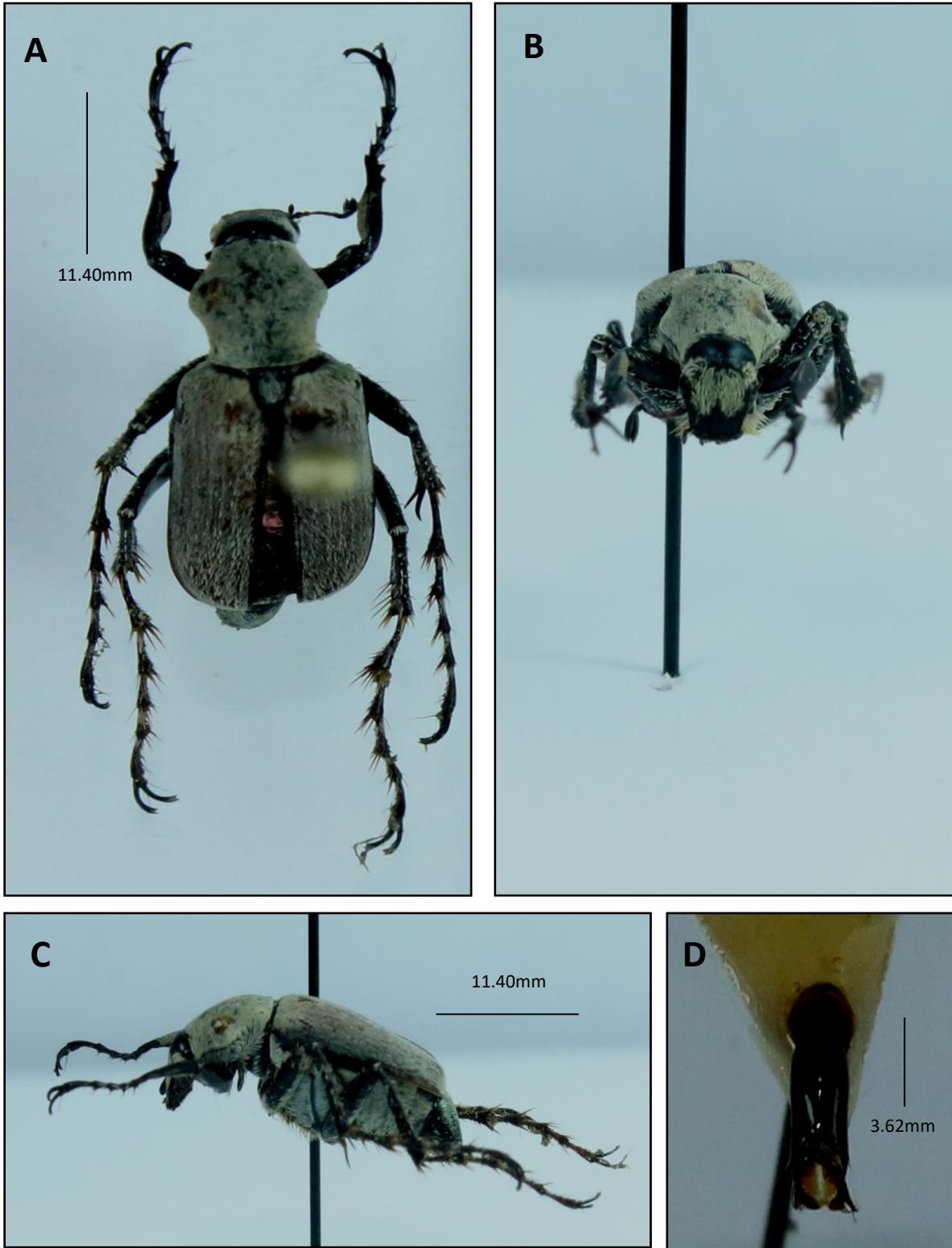
Tanto *M. mexicanus* y *M. nigripes* presentaron algunas diferencias en cuanto a las descripciones, demostrando que existen variaciones intraespecíficas.

**Cuadro1.** Descripción morfológica de los caracteres de mayor importancia de *Macroductylus mexicanus* y *Macroductylus nigripes* (\*) en comparación a los caracteres encontrados en los especímenes analizados.

Caracter	Color de las antenas	Color del pronoto y élitros	Vestidura	Color de meso y metatibias	Genital masculino	Forma de parámetros
<i>Macroductylus mexicanus</i> *	Artejos antenales pardo-rojizos	Pronoto negro y élitros con el integumento del disco rojizo ceniciento	Setífera gris o amarilla con 6 estrías libres de sedas	Rojizas con los ápices oscuros	rojiza oscura	Circulares y redondeado
<i>Macroductylus nigripes</i> *	Funículo antenal amarillo	Pronoto y élitros negro	Gris, amarilla-verdosa en algunos casos se puede ver 4 estrías no bien definidas	Negras con artejos tarsales negros	pardo oscuro	Circulares
<i>Macroductylus mexicanus</i> V1	pardo-rojizo	Pronoto negro y élitros no uniformemente coloreados	Gris con 6 estrías libres de sedas	Rojizas con los ápices oscuros	rojizo	Redondeados
<i>Macroductylus mexicanus</i> V2	pardo-rojizo	Pronoto negro y élitros no uniformemente coloreados	Gris con 6 estrías libres de sedas	Rojizas con los ápices oscuros	rojizo	Redondeados
<i>Macroductylus mexicanus</i> V3	pardo-rojizo	Pronoto negro y élitros no uniformemente coloreados	Gris con 6 estrías libres de sedas	Rojizas con los ápices oscuros	rojizo	Redondeados
<i>Macroductylus nigripes</i> V1	Negro	Élitros y pronoto negro	Vestidura larga y gris	Negras con artejos tarsales negros	pardo oscuro	Redondeados
<i>Macroductylus nigripes</i> V2	Negro	Élitros y pronoto negro	Vestidura larga y gris	Negras con artejos tarsales negros	pardo oscuro	Redondeados
<i>Macroductylus nigripes</i> V3	Negro	Élitros y pronoto negro	Vestidura larga y gris	Negras con artejos tarsales negros	pardo oscuro	Redondeados



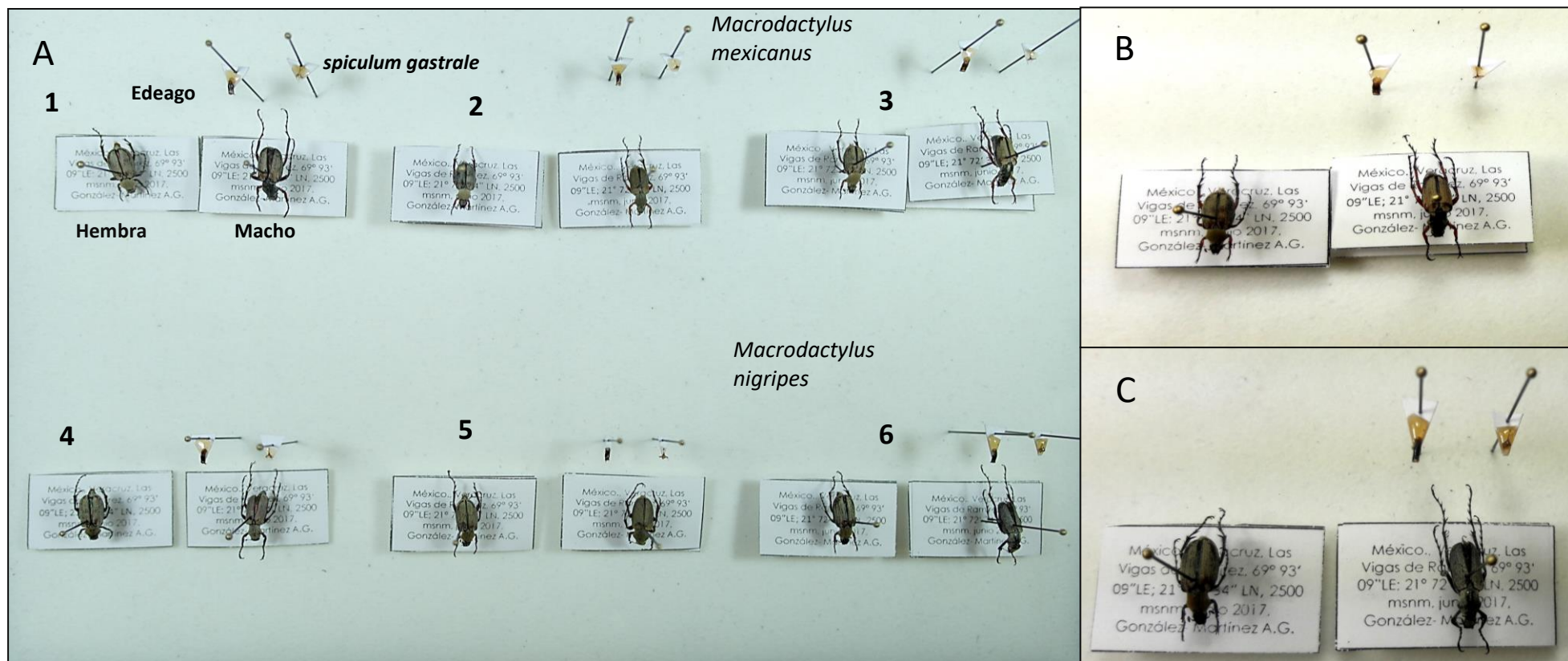
**Figura 10. Imagen representativa de un macho de *Macrodactylus mexicanus*. Se muestra los caracteres morfológicos más utilizados para la identificación a nivel de especie. A) Vista dorsal, B) Vista frontal, C) Vista laterales, D) Edeago vista dorsal.**



**Figura 11. Imagen representativa de un macho de *Macroductylus nigripes*. Se muestra los caracteres morfológicos más utilizados para la identificación a nivel de especie. A) Vista dorsal, B) Vista frontal, C) Vista laterales, D) Edeago vista dorsal.**

### 7.1.1 Montaje de especímenes

Con el objetivo de respaldar la información sobre la identificación por taxonomía morfológica de las especies bajo estudio, se estableció un montaje de doce especímenes de *M. mexicanus* y doce de *M. nigripes*. Para el montaje se tomaron en cuenta las características de una colección científica formal, tanto en el montaje de los adultos de ambos sexos como en las etiquetas de información. En la Figura 12 se observa en cada espécimen, la disposición de los tres pares de patas, la antena derecha visible, las estructuras genitales expuestas y las etiquetas de datos con la información de recolecta e identificación taxonómica.

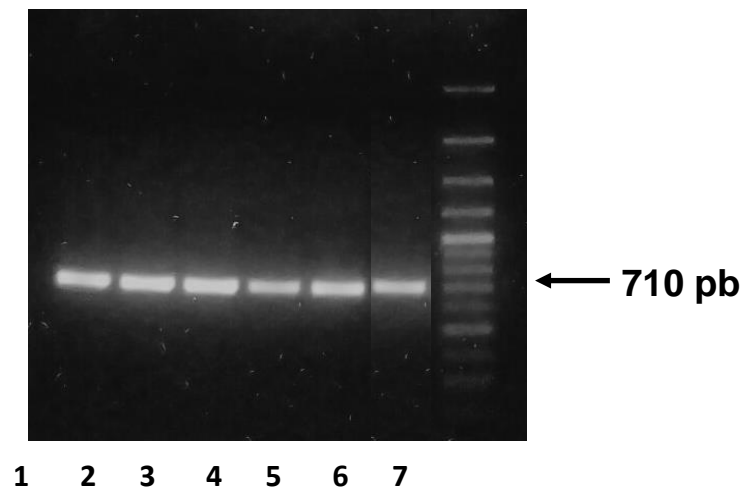


**Figura 12. Montaje de especímenes representativos basada en caracteres morfológicos de adultos de *Macroductylus mexicanus* y *Macroductylus nigripes*, recolectados para el presente estudio. A) Imagen de colección completa, B) Imagen de acercamiento para ver la hembra y el macho de *M. mexicanus*, así como de la etiqueta correspondiente. C) Imagen de acercamiento para ver con detalle la hembra y el macho de *M. nigripes*, así como la etiqueta correspondiente.**

## 7.2 Identificación por taxonomía molecular

### 7.2.1 Amplificación por PCR del gen MT-COI

Una vez que se efectuó una identificación rigurosa por caracteres morfológicos, se procedió a obtener el código de barras del gen MT-COI, el cual se emplea como marcador universal para la identificación de animales. Se realizó la purificación del ADN genómico para amplificar por PCR punto final una región estandarizada del gen MT-COI, utilizando iniciadores previamente reportados (Folmer *et al.* 1994). Se obtuvo un solo producto de amplificación con aproximadamente 710pb que corresponde al peso molecular esperado. Se observó la amplificación en todos los vouchers de *M. mexicanus* y *M. nigripes* con calidad adecuada para la secuenciación, debido a la intensidad y grosor de la banda de ADN amplificado (Figura 13).

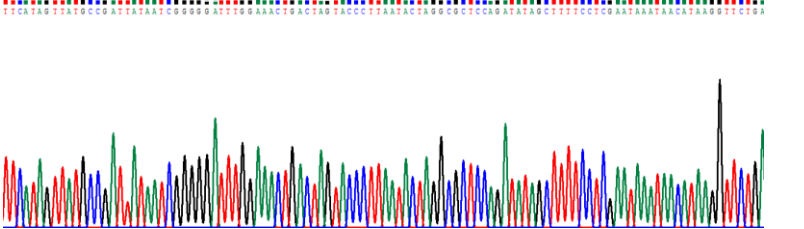
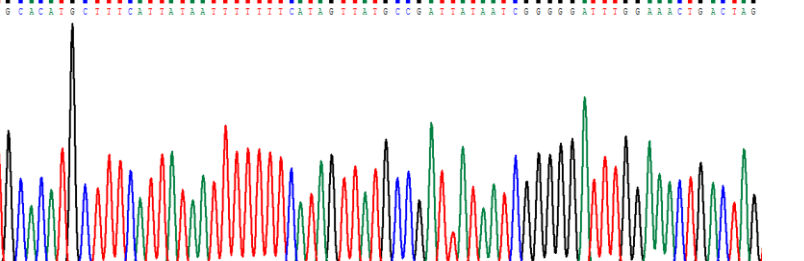
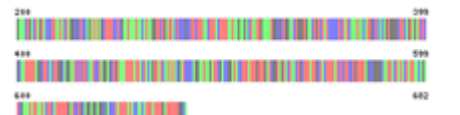
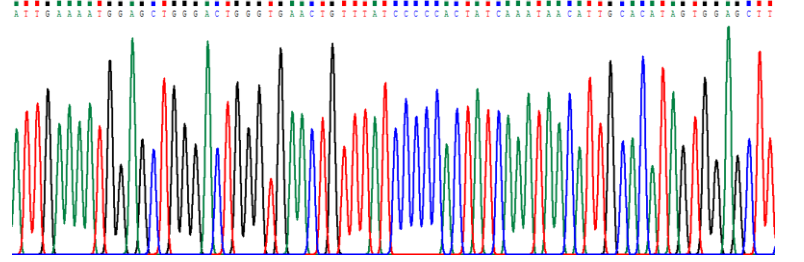
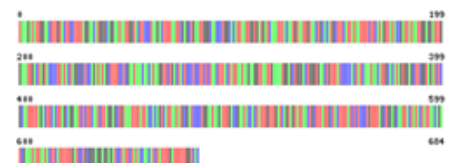


**Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación por PCR punto final del gen MT-COI con iniciadores universales para *Macroductylus mexicanus* y *Macroductylus nigripes*. Carril 1.- *M. nigripes* V1; Carril 2.- *M. nigripes* V2; Carril 3.- *M. nigripes* V3; Carril 4.- *M. mexicanus* V1; Carril 5.- *M. mexicanus* V2; Carril 6.- *M. mexicanus* V3. Carril 7.- Marcador de peso molecular.**

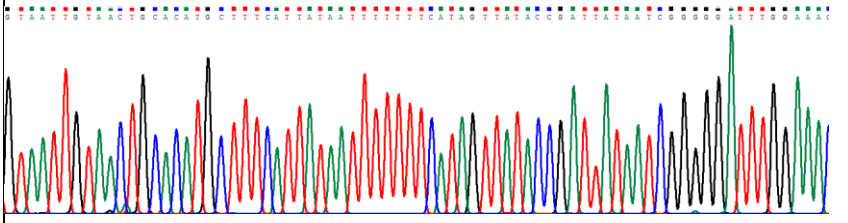
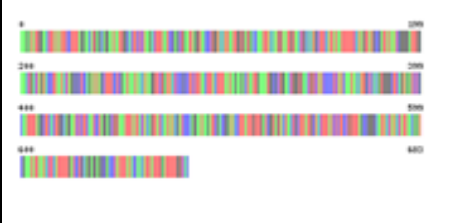
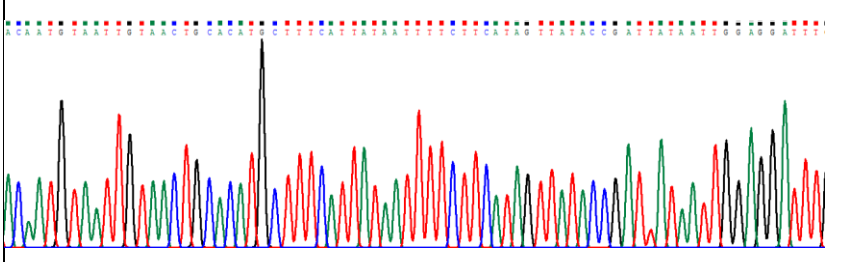
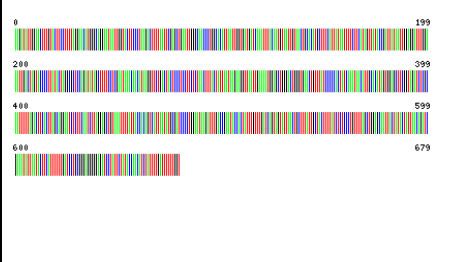
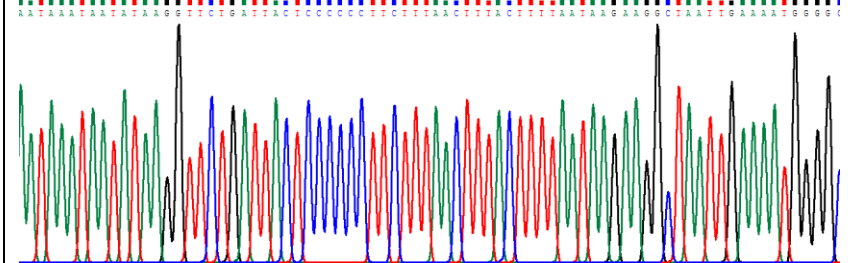
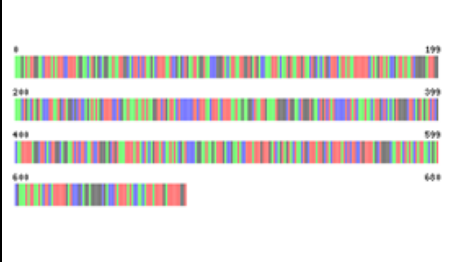
### **7.2.2 Obtención del código de barras del gen MT-COI**

Los amplicones de tres vouchers para *M. mexicanus* y *M. nigripes* fueron secuenciados por el método Dideoxi o Sanger. Los electroferogramas obtenidos muestran una calidad recomendada para las reacciones de secuenciación, ya que no se observó ruido en la base de línea y los picos de señal de cada nucleótido de la secuencia se observan definidos y sin interferencia o solapamientos. Con respecto a las secuencias finales, se obtuvieron por los ensamblajes derivados de la secuenciación en dirección sentido y antisentido con un rango de 650 a 685 pb. Finalmente, la ilustración representativa de código de barras del gen MT-COI fue obtenida por primera vez para estas especies mediante el registro en la base de datos BOLD Systems (Cuadros 2 y 3).

Cuadro 2. Electroferograma, secuencia en formato FASTA y código de barras de los vouchers de *Macroductylus mexicanus*.

Voucher	Electroferograma	Secuencia	Código de barras
MmV1		<p>&gt;ROSR003-17  MMV1 COI</p> <pre>TAAAGATATTGGAACCTTATATTTCTTTAGGAACATGAGCAG GAATAATTGGCAGCTTCTCTAAGACTTTTAAATCCGAGCTGAATTA GGTAACCCGGTACATTAATTGGTGATGACCAAATTTACAATGT AATGTAACTGCACATGCTTTTATTATAATTTTTTTCATAGTTAT GCCGATTATAATCGGGGGATTGGAACTGACTAGTACCCTTA ATACTAGGCGCTCCAGATATAGCTTTTCTCGAATAAATAACAT AAGGTTCTGATTACTCCCCTTCTTTAACTTTACTTTTAAATAAG AAGACTAATTGAAAATGGCGCTGGAACTGGGTGAACGTCTAT CCCCCTCTATCAAATAACATTTGCTCACAGTGGGGCTTCAGTAG ATCTCGCAATTTTTAGGCTTCAGTTGGCAGGAATCTCTCAATC CTAGGAGCTGTAATTTTATTACTACAGTTTCAATATACGATC CCACGGAATAAGATTCCGACCGGATACCCTTTATTGTTGATCG GTAGTACTAACTGCTTTATGCTACTTTTATCTCTCCTGTTTTA GCCGGGCAATTAATACTACTATTAACAGATCGAAATTTAATA CTTCAATTTTGTCTGCTGAGGAGGAGGACCCATTTTATA CCAACATTTATTTGATTTTTGGTCAC</pre>	
MmV2		<p>&gt;ROSR004-17  MMV2 COI</p> <pre>TAAAGATATTGGAACCTTATATTTCTTTAGGAACATGAGCAGG AATAATTGGCAGCTTCTCTAAGACTTTTAAATCCGAGCTGAATTAGG TAACCCGGTACATTAATTGGTGATGACCAAATTTACAATGTAAT TGTAAGTGCACATGCTTTTATTATAATTTTTTTCATAGTTATGCCG ATTATAATCGGGGGATTGGAACTGACTAGTACCCTTAATACTA GGCGCTCCAGATATAGCTTTTCTCGAATAAATAACATAAGGTTT TGATTACTCCCCTTCTTTAACTTTTACTTTTAAAGAAGACTAA TTGAAAATGGCGCTGGAACTGGGTGAACGTCTATCCCCTCTA TCAAATAACATTGCTCACAGTGGGGCTTCAGTAGATCTCGCAAT TTTTAGGCTTCACTGGCAGGAATCTCTCAATCTAGGAGCTGTA AATTTTATTACTACAGTTTCAATATACGATCCCCAGGAATAAGAT TCGACCGGATACCTTTATTGTTGATCGGTAGTACTAAGTCTTT ATTGCTACTTTTATCTCTCTGTTTTAGCCGGGGCAATTAATA CTATTACAGATCGAAATTTAATACTCATTTTTTGATCCTGACG GAGGAGGCGACCCATTTTATACCAACATTTATTTGATTTTTTGG CA</pre>	
MmV3		<p>&gt;ROSR006-17  MMV3 COI</p> <pre>TAAAGATATTGGAACCTTGTACTTCTTTAGGAACATGGGCAGG AATAATTGGTACTTCCCTAAGACTTTTAAATCGAGCTGAATTTGGG CAACCCGGCAGATTAATTGGTGATGACCAAATTTACAATGTAAT TGTAAGTGCACATGCTTTTATTATAATTTTTTTCATAGTTATACCG ATTATAATTGGAGATTGGAAATGACTAGTACCCTTATACTA GGCGCTCCAGATATAGCTTTTCTCGAATAAACAACATAAGGTT CTGACTACTCCCTTCTCTAATTTACTATTAAAGAAGGTT AATTGAAAATGGAGCTGGGACTGGGTGAACGTTTATCCCCA CTATCAAATAAGATTGCATAGTGGAGCTTCGGTAGATCTCCG AATTTTTAGACTTCACTTGCAGGAATCTCTCAATCTTAGGAGC TGTAATTTTATTACCAAGTCAATTAATGCGATCCCCTGGAAT AAGATTTGACCGAATACCACTATTTGTTGATCAGTATTAAC TGCTTTATGCTACTTTTATCTCTCCTGTTTTAGCTGGAGCAAT TACTATACTATTACAGATCGAAATTTAATACTCATTTTTTGAT CCTGCGGAGGAGGATCCTATTCTATACCAACATCTATTTTGT ATTTTTGGTCAC</pre>	

Cuadro 3. Electroferograma, secuencia en formato FASTA y código de barras de los vouchers de *Macroductylus nigripes*.

Voucher	Electroferograma	Secuencia	Código de barras
MnV1		<p>&gt;ROSR001-17  MNV1 COI</p> <pre>CATAAAGATATTGGAACCTTTATATTTCTTTTAGGAACATGAGCAGGAATA ATTGGCACTTCTAAGACTTTTAAATCCGAGCTGAATTAGGTAACCCCTGG TACATTAATTGGTGATGACCAAATTTACAATGTAATTGTAACCTGCACATGC TTTCATTATAATTTTTTTCATAGTTATACCGATTATAATCGGGGATTGGA AACTGACTAGTACCCCTAATCTAGGCGCTCCAGATATAGCTTTCTCCTCG AATAAATAACATAAGGTTCTGATTACTCCCGCTTCTTTAACTTTACTTTTA ATAAGAAGACTAATTGAAAATGGCGCTGGAACCTGGGTAACCTGCTATCC TCCTCTATCAAATAACATTGCTCATAGTGGGGCTCCAGTAGATCTCGCAA TTTTAGGCTTCACTGGCAGGAATCTCTTCAATCCTAGGAGCTGTAATTT TTACTACTACAGTTATCAATATACGATCCCAGGAATAAGATTTGACCCGGA TACCCTTATTGTTTGTATCGGTAGTACTAAGCTTTATTGCTACTTTTATC TCCTTCTGTTTTAGCCGGGCAATTAATACTATTAACAGATCGAAATAT TAATACTTCAATTTTGTATCCGAGGAGGGCGACCCTATTTATACCA ACATTTATTTGATTTTTTGGT</pre>	
MnV2		<p>&gt;ROSR002-17  MNV2 COI</p> <pre>AAGATATTGGAACCTTTGACTTCTTTTAGGAACATGGGCAGGAATAATT GGTACTTCCCTAAGACTTTTAAATCGAGCTGAATTGGCAACCCCTGGCAC ATTAATTTGGTGATGATCAAATTTACAATGTAATTGTAACCTGCACATGCTTT CATTATAATTTTTTTCATAGTTATACCGATTATAATGGAGGATTTGGAAAT TGACTAGTACCCCTTATACTAGGCGCTCCAGATATAGCTTTTCTCGAAT AAACAACATAAGGTTCTGACTACTCCCTCTTCTCTAATTTACTATTAAT AAGAAGGTTAATGAAAATGGAGCTGGGACTGGGTGAACCTGTTTATCCCC CACTATCAAATAACATTGCACATAGTGGAGCTTGGTGAATCTCGCAATT TTTAGACTTCACTTAGCAGGAATCTCTTCAATCTTAGGAGCTGTAATTTT ATTACCACAGTCAATTAATATGCGATCCCTCGAATAAGATTTGACCCGAA ACCACTTTTGTGATCAGTAGTAACTGCTTTTACTACTTTTATCT CTCCCTGTTTTAGCTGGAGCAATTAATACTATTAACAGATCGAAATATT AATACTTCAATTTTGTATCCGAGGAGGGGAGATCTATTCTATACCA ACATCTATTTGATTTTTTGGT</pre>	
MnV3		<p>&gt;ROSR005-17  MNV3 COI</p> <pre>AAAGATATTGGAACCTTTATATTTCTTTTAGGAACATGAGCAGGAATAAT GGCACCTTCTAAGACTTTTAAATCCGAGCTGAATTAGGTAACCCGGGTAC ATTAATTTGGTGATGACCAAATTTACAATGTAATTGTAACCTGCACATGCTTT CATTATAATTTTTTTCATAGTTATACCGATTATAATCGGGGATTGGAATA CTGACTAGTACCCCTAATGCTAGGCGCTCCAGATATAGCTTTCTCCTCGAA TAAATAATAAGGTTCTGATTACTCCCTTCTTTAACTTTACTTTAAT AAGAAGGCTAATGAAAATGGGCTGGAACCTGGGTGAACCTGCTATCCC CCTCTATCAAATAACATTGCTCAGAGTGGGGCTCAGTAGATCTCGCAAT TTTTAGGCTTCACTTGGCAGGAATCTCTTCAATCCTGGAGCTGTAATTT TTACTACTACAGTTATCAATATACGATCCCAGGAATAAGATTTGACCCGAA TACCCTTATTGTTTGTATCAGTAGTAACTGCTTTTATTGCTACTTTTATC TCCTTCTGTTTTAGCTGGGCAATTAATACTATTAACAGATCGAAATAT TAATACTTCAATTTTGTATCCCGAGGAGGGGCGACCCTATTTATACC AACATTTATTTGATTTTTTGGT</pre>	

### **7.2.3 Registro en base de datos de códigos de barras**

Para obtener el código de barras completo de cada voucher de *M. mexicanus* (Figura 14) y *M. nigripes* (Figura 15), se realizó el registro de la información requerida por la base de datos exclusiva para códigos de barras de BOLD Systems, atendiendo categorías de taxonomía, detalles del espécimen, datos de colecta y localidad. Asimismo, toda esta información se complementó con fotografías de cada voucher y los archivos de trazas de las reacciones de secuenciación. El registro del código de barras completo en base de datos internacionales asegura la disponibilidad de esta información a nivel internacional y es punto de referencia para la identificación por taxonomía molecular de cualquier insecto.



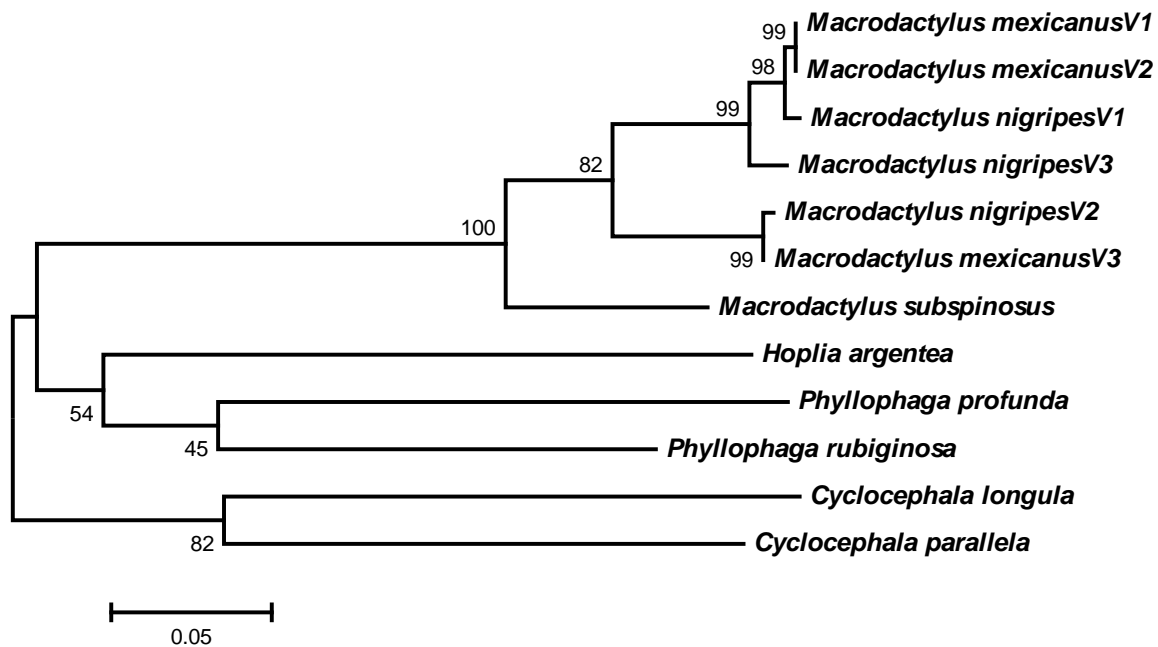


#### 7.2.4 Análisis de secuencias homólogas del gen MT-COI

La similitud entre las secuencias parciales del gen MT-COI de *M. mexicanus* y *M. nigripes*, calculada mediante BLASTN, fue de 92% a 99%. Mientras tanto, la similitud encontrada por reporte taxonómico para *M. mexicanus* estuvo en un intervalo de 88.38% a 95.07% y para *M. nigripes* de 88.88% a 95.25%, con secuencias del gen MT-COI de *M. uniformis*, *M. pseudothoracicus*, *M. angustatus* y *M. subspinosus* (Cuadro4). Para representar la similitud entre las secuencias parciales del gen MT-COI obtenidas para *M. mexicanus* y *M. nigripes* con respecto a ellas mismas y con otras especies, se construyó un cladograma por el método de Máxima Verosimilitud. En la Figura 16 se puede observar la formación de dos agrupaciones principalmente con las especies de la subfamilia Dynastinae (*C. longula* y *C. parallela*) y las de Melolonthidae, utilizadas en el análisis. En esta última subfamilia se destaca la formación de un grupo con las especies de *Macroductylus*, separándolas de *Phyllophaga* y *Hoplia*. Con respecto a las especies de *Macroductylus*, las especies utilizadas en este estudio forman un grupo cercano a *M. subspinosus*. Sin embargo, la asociación por similitud de secuencias se resuelve con la constitución de tres grupos entre *M. mexicanus* y *M. nigripes* (Figura 16).

**Cuadro 4. Rango de similitud con otras especies de *Macrodactylus*.**

<b>Voucher</b>	<b>Intervalo de similitud</b>	<b>Especies</b>
<b><i>M. mexicanus</i> V1</b>	92.98% - 92.32%	<i>M. uniformis</i>
	91.36%	<i>M. pseudothoracicus</i>
	89.4% - 88.33%	<i>M. angustatus</i>
	88.79% - 88.68%	<i>M. subspinosus</i>
<b><i>M. mexicanus</i> V2</b>	93.02% - 92.35%	<i>M. uniformis</i>
	91.4%	<i>M. pseudothoracicus</i>
	89.45% - 88.38%	<i>M. angustatus</i>
	88.84% - 88.73%	<i>M. subspinosus</i>
<b><i>M. mexicanus</i> V3</b>	95.07% - 93.94%	<i>M. uniformis</i>
	90.48% - 90.02%	<i>M. subspinosus</i>
	90.48% - 90.17%	<i>M. angustatus</i>
	89.66%	<i>M. pseudothoracicus</i>
<b><i>M. nigripes</i> V1</b>	92.98% - 92.32%	<i>M. uniformis</i>
	91.67%	<i>M. pseudothoracicus</i>
	89.4% - 88.33%	<i>M. angustatus</i>
	89.09% - 88.79%	<i>M. subspinosus</i>
<b><i>M. nigripes</i> V2</b>	95.25% - 93.99%	<i>M. uniformis</i>
	90.52% - 90.06%	<i>M. angustatus</i>
	90.37% - 89.91%	<i>M. subspinosus</i>
	89.86%	<i>M. pseudothoracicus</i>
<b><i>M. nigripes</i> V3</b>	93.02% - 92.35%	<i>M. uniformis</i>
	91.71%	<i>M. pseudothoracicus</i>
	89.6% - 88.38%	<i>M. angustatus</i>
	89.36% - 88.84%	<i>M. subspinosus</i>



**Figura 16. Cladograma construida con las secuencias parciales del gen MT-COI de *Macroductylus mexicanus* y *Macroductylus nigripes*.** Se empleo el análisis de Máxima Verosimilitud con el programa Mega 7. Se tomó como base el modelo general reversible en el tiempo con una distribución gamma y sitios invariantes (G + I), y un soporte de ramas por el método de Bootstrap con 1000 remuestreos.

## 8. Discusión

Desde los inicios del siglo XIX hasta la actualidad, la descripción e identificación taxonómica de especies del género *Macroductylus* se ha realizado con caracteres morfológicos (Burmeister, 1855; Bates, 1887; Carrillo y Gibson, 1960). Sin embargo, para el siglo XXI la delimitación de especies requiere de la integración de diversas fuentes de datos morfológicos, moleculares y ecológicos. En el caso de *M. mexicanus* y *M. nigripes*, las cuales son consideradas como plagas de cultivos de relevancia económica (Arce-Pérez y Morón, 2000), no se cuenta con herramientas integrativas para su clasificación. Por tal razón, en el presente trabajo se obtuvo por primera vez el código de barras de ADN del gen MT-COI para fortalecer la identificación integral con herramientas moleculares, lo cual

permitirá ahondar en la comprensión de las relaciones ecológicas y evolutivas de estas especies.

En general, los adultos de *M. mexicanus* y *M. nigripes* presentan características morfológicas parecidas, como tamaño y forma, coloración, vestidura, estructuras bucales, anatomía de antenas, disposición de sedas en el protórax, forma del tórax, presencia de esternitos en el abdomen, características de las patas y uñas, entre otras más (Lacordaire 1856; Arce-Pérez y Morón, 2005). Sin embargo, ciertos caracteres los diferencian a simple vista, como es el color de las patas y del edeago. Por otra parte, la identificación de diversas especies de coleópteros mediante únicamente características externas se ha dificultado por la presencia de especies crípticas con nichos ecológicos compartidos (Manjarrés y Rendón, 2013). Por lo tanto, el uso de estructuras internas como la genitalia masculina ha sido uno de los caracteres internos más ampliamente utilizados en la taxonomía y sistemática de todo el orden Coleóptera (López-Guerrero, 1999). Debido a que la morfología de órgano genital de los machos cambia de forma lineal a velocidad más constante que los caracteres externos, ha sido muy confiable la utilización de estructuras genitales para resolver la separación de especies cercanas a nivel supraespecífico (Zunino y Halfftel, 1988). Sin embargo, algunos autores admiten que el uso de caracteres taxonómicos genitales en insectos está sometido a procesos de rápida divergencia (Zunino, 2012). Se ha mencionado que los adultos de *M. mexicanus* presentan diferencias en cuanto a la forma de los parámetros, ya que en ocasiones se pueden observar más angulados. Además, para el caso de las poblaciones de *M. nigripes* los genitales varían, ya que algunos son obtusamente más angulados que redondeados (Arce-Pérez y Morón, 2000). Por lo anteriormente dicho, para el género de *Macroductylus* solo se cuenta con la descripción morfológica y existen muy pocos registros del uso de herramientas moleculares para su identificación taxonómica.

Al respecto, el código de barras de ADN del gen mitocondrial COI ha sido utilizado con éxito para identificar de manera rápida y confiable numerosas especies de insectos. Por ejemplo, para especies de lepidópteros (Hausmann *et*

*al.*, 2011a, b, 2013), himenópteros (Schmidt *et al.*, en preparación), neuroptéridos (Morinière *et al.*, 2014), heterópteros (Raupach *et al.*, 2014), miriápodos (Spelda *et al.*, 2011) y ortópteros (Hawlitschek *et al.*, en preparación), se ha utilizado el código de barras del gen MT-COI para determinar su identidad taxonómica, sugiriendo fuertemente la eficacia del código de barras de ADN para todos los artrópodos.

En el presente trabajo, debido a que no se cuentan con registros de secuencias del gen mitocondrial COI para *M. mexicanus* y *M. nigripes*, se inició con la obtención del código de barras de ADN por primera vez para fortalecer el uso integrativo de herramientas moleculares acorde a las necesidades de la actual taxonomía integrativa. El análisis de las secuencias obtenidas reveló la formación de grupos perfectamente separados de *M. mexicanus* y *M. nigripes* en el cladograma. En contraste, en el dendograma también se evidenció un grupo integrado por “*M. nigripes*V2” y “*M. mexicanus*V3”, lo cual resulta inconsistente con la taxonomía y hábitos (Arce-Pérez y Morón, 2000), aunque con respecto al comportamiento y comunicación química son similares (Romero-López, 2016). Por lo tanto, estas evidencias nos llevan a preguntarnos ¿si son especies híbridas? o ¿son pertenecientes a una misma especie?

Al respecto, en las claves dicotómicas propuestas por Arce-Pérez y Morón (2000), se mencionan que para *Macrodactylus mexicanus* las poblaciones presentan diferencias en cuanto a la forma de los parámetros, pues algunos ejemplares los presentan más angulados; los élitros pueden ser de color uniforme; los tarsos pueden ser totalmente negros o solo con su mitad apical; algunas poblaciones presentan las estrías muy finas y poco marcadas, además de una vestidura amarillo claro, gris- cenizo o de aspecto verde-amarillento; el tamaño corporal también puede ser muy variable entre las poblaciones presentando una media de 11.10 mm de largo por 3.98 mm de anchura, con una desviación estándar de 1.29 en el largo y de 0.64 en la anchura, lo cual pone de manifiesto la gran variación específica, y hace probable la existencia de un complejo de especies o subespecies. En cuanto a *M. nigripes*, los genitales de las diferentes poblaciones

varían, siendo algunos obtusamente más angulados que redondeados. Algunas poblaciones son de talla grande 12.5 mm de largo, como las de Chiapas mientras que otras son de talla pequeña 8.0 mm de largo, como algunas del Estado de México y Tlaxcala.

Por lo dicho anteriormente, es recomendable aumentar el tamaño de muestra para obtener el código de barras de ADN, aunado al empleo diferentes marcadores moleculares nucleares y mitocondriales, así como de datos biogeográficos y ecológicos de estas especies para poder tener resultados concluyentes en cuanto a la delimitación de especies. Existe la posibilidad de que para la identificación de especies cercanas no se presente la suficiente variación y divergencia en las secuencias del gen MT-COI, como ocurre con *Pterostichus nigrita* Paykull y *Pterostichus rhaeticus* Heer, las cuales es imposible de separar con el uso de marcadores moleculares tradicionales (Raupach *et al.*, 2010). Por otra parte, las secuencias del gen MT-COI obtenidas en este estudio presentaron variación suficiente con respecto a otras especies de *Macrodactylus*, entre géneros distintos de Melolonthidae y entre subfamilias de Scarabaeoidea. Como se observa en el cladograma, existe concordancia de asociación de especies agrupadas por caracteres morfológicos. Por lo tanto, el código de barras de ADN del gen MT-COI puede ser potencialmente utilizado combinando los datos de taxonomía tradicional para la identificación a nivel de especie, género y familias. Estas evidencias ofrecen herramientas de identificación taxonómica confiable que pueden utilizarse para la clasificación de este grupo de coleópteros.

Finalmente, el uso combinado de la taxonomía morfológica y molecular abre una nueva puerta para la diversificación de métodos para la identificación de especies del género *Macrodactylus* y de manera general, de la familia Melolonthidae.

## 9. Conclusiones

- 1) Se obtuvieron códigos de barras de 680-685 pb del gen MT-COI de tres adultos machos de *M. mexicanus* y tres adultos machos de *M. nigripes*.
- 2) Las secuencias del gen MT-COI de *M. mexicanus* y *M. nigripes* tienen una similitud del 92% entre ellas y un 95% al 90% con otras especies del mismo género.
- 3) Por primera vez se utiliza taxonomía integrativa para la identificación de especies de Melolonthidae distribuidas en México.

## 10. Literatura citada

- Adler, P. and Foottit, R. (2009). *Insect Biodiversity. Science and Society*. UK: Blackwell Publishing Ltd. 1-6.
- Agapow, P.M., Bininda-Emonds, O.R., Crandall, K.A., Gittleman, J.L., Mace, G.M., Marshall, J.C. and Purvis, A.(2004). The impact of species concept on biodiversity studies. *The Quarterly Review of Biology*, 79(2), 161-79.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3), 403-410.
- Aragón, G.A., Morón, M.A., Rodríguez, S.Y. Cortés, A.N. Zarazúa, M. and Huato, M.A. (2010). Description of the larvae of three species of *Macroductylus* Dejean (Coleoptera: Scarabaeidae: Melolonthinae) from Mexico, with notes on the reproductive behavior of *Macroductylus ocreatus* Bates. *The Coleopterists Bulletin*, 64(3):193-200.
- Arce-Pérez, R. y Morón, M.A. (2000). Taxonomía y distribución de las especies de *Macroductylus* Latreille (Coleoptera: Melolonthidae) en México y Estados Unidos de América. *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*, 79, 123–239.
- Arce-Pérez, R. and Morón. M.A. (2005). New species and new records of species of *Macroductylus Dejean* (Coleoptera: Scarabaeidae: Melolonthinae: Macroductylini) from Honduras y Nicaragua. *Zootaxa*, 1012(1), 23-27.
- Armstrong, K.F. and Ball, S.L. (2005). DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360(1462), 1813-1823.
- Avise, J. C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman & Hall, Inc., New York.
- Ballard, J.W. and Whitlock, M.C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, 13(4), 729-744.
- Barber, P. and Boyce, S.L. (2006). Estimating diversity of Indo-Pacific coral reef stomatopod larvae. *The Royal Society Publishing*, 2738 (18), 2053–2061.
- Bates, H. W. (1887). Pectinicornia and Lamellicornia. pp: 138-147. En: Salvin, O and Godman, F. (Eds.). *Biologia Centrali-Americana, Insecta, Coleoptera*, Vol. II, parte 2. Taylor and Francis, London.
- Bensasson, D., Zhang, D.X., Hartl, D.L., Hewitt, G.M. (2001). Mitochondrial pseudogenes: Evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology and Evolution*, 16(6), 314-321.
- Bertolani, R., Rebecchi, L., Giovannini, I. and Cesari, M. (2011). DNA barcoding and integrative taxonomy of *Macrobiotus hufelandi* C.A.S. Schultze 1834, the first tardigrade species to be described, and some related species. *Zootaxa* 2997: 19–36
- Boore, J.L. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*. 27(8), 1767–80
- Brown, W.M., George, M. and Wilson A.C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(4), 1967-1971.

- Brusca, R.C. and Brusca, G.J. (2002). Invertebrates. 2da Edición. Sinauer Associates, Inc., E.U.A., 595-613.
- Burmeister, H. (1855). Handbuch der entomologie. Bierter band. Befondere entomologie. Fortfessung. Zweite Abtheilung. Coleoptera Lamellicornia Phyllophaga Chaenochela. Berlin, 569 pp.
- Cameron, S.L. (2014). Insect Mitochondrial Genomics: Implications for Evolution and Phylogeny. Annual Review of Entomology, 59, 95–117.
- Carrillo, J.L. y Gibson, W. (1960). Repaso de las especies mexicanas del género *Macrodactylus* (Coleoptera: Scarabaeoidea), con observaciones biológicas de algunas especies. Folleto Técnico. 39, S. A. G. México. 102 pp.
- Caselín, C.S., Carrillo, S.L., Llanderal, C.C y Bravo, M.H. (2003). Incidencia de *Macrodactylus nigripes* Bates (Coleoptera: Melolonthidae) en maíz y haba en Tlaxcala, México. Agrociencia, 37(3), 291-297.
- Catts, E.P. and Haskell, N.H. (1990). Entomology and Death: A Procedural Guide. Joyce's Print Shop, Clemson, SC.
- Chapman, A. (2009). Number of living species in Australia and the world. 2nd Edition. Report for the Australian Biological Resources Study. Canberra. 61.
- Cherman, M.A. y Morón, M.A. (2014). Validación de la familia Melolonthidae Leach, 1819 (Coleoptera: Scarabaeoidea). Acta Zoológica Mexicana, 30(1); 201-220.
- Cohan, F.M. (2006). Towards a conceptual and operational union of bacterial systematics, ecology, and evolution. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological, 361(1475), 1985–1996.
- Cox, A.J., and Hebert, P.D.N. (2001). Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. Molecular Ecology, 10(2), 371–386.
- Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. Biological Journal of the Linnean Society, 85(3), 407-415.
- Delvare, G., Pierre, A. H. Michel, B. y A. Figueroa. 2002. Los insectos de África y de América Tropical. Claves para la identificación de las principales familias. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Palmira- Colombia 259p
- Ebach, M.C. (2011). Taxonomy and the DNA barcoding enterprise. Zootaxa, 2542, 67–68.
- Elias, M., Hill, R.I., Wilmott, K.R., Dasmahapatra, K.K., Brower, A.V. and Mallet, J. (2007). Limited Performance of DNA Barcoding in a Diverse Community of Tropical Butterflies. Proceedings of the Royal Society B, 274(1627), 2881-2889.
- Erickson, D.L., and Kress, W.J. (2012). DNA barcodes: methods and protocols. Methods Molecular Biology 858, 459–465.
- Floyd, R., Abebe, E., Papert, A. and Blaxter, M. (2002). Molecular barcodes for soil nematode identification. Molecular Ecology, 11(4), 839–850.
- Foley, D.H., Wilkerson, R.C., Cooper, R.D., Volovsek, M.E. and Bryan, J.H. (2007). A molecular phylogeny of *Anopheles annulipes* (Diptera: Culicidae) sensu lato: the most species-rich anopheline complex. Molecular Phylogenetics and Evolution, 43(1), 283–297.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. and Vrijenhoek. R. (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.
- Germain, J.F., Chatot, C., Meusnier, I., Artige, E., Rasplus, J.Y. and Cruaud, A. (2013). Molecular identification of *Epitrix* potato flea beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) in Europe and North America. *Bulletin of Entomological Research*, 103(3), 354–362.
- Gernandt, D., Salazar, G., Vergara, F., Arias, S., Sosa V., García, A., Reyes, J. Cabrera, L. y Rosas, P. (2011). Código de barras genético de cinco grupos críticos de la flora de México. (Informe final SNIB-CONABIO, proyecto N°. GE021). México D. F.: Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. Instituto de Ecología, A.C. 33 pp.
- Hajibabaei, M., Dewaard, J.R., Ivanova, N.V., Ratnasingham, S., Dooh, R.T. and Kirk, S.L. (2006). Critical Factors for Assembling a High Volume of DNA Barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 360 (1462), 1959-1967.
- Hausmann, A., Haszprunar, G. and Hebert, P.D.N. (2011a). DNA barcoding the geometrid fauna of Bavaria (Lepidoptera): successes, surprises, and questions. *PLoS ONE*, 6, 9 p.
- Hausmann, A., Godfray, H.C.J. and Huemer, P. (2013). Genetic patterns in European geometrid moths revealed by the Barcode Index Number (BIN) system. *PLoS ONE*, 8, 11 p.
- Hausmann, A., Haszprunar, G., Segerer, A.H., Speidel, W., Behounek, G. and Hebert, P.D.N. (2011b). Now DNA-barcoded: the butterflies and larger moths of Germany (Lepidoptera: Rhopalocera, Macroheterocera). *Spixiana*, 34(1), 47–58.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and Waard, J.R. (2003c). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B*, 270(1512), 313–321.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and Waard J.R. (2003a). Barcode of Life: Identifying Species with DNA Barcoding Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings Biological Sciences* 270, 313–321.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. and Waard, J.R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1), S96–S99.
- Hebert, P.D.N., and Gregory, T.R. (2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*, 54(5), 852–859.
- Hillis, D.M., and Wiens, J.J. (2000). Molecules versus morphology in systematics: Conflicts, artifacts, and misconceptions. Pages 1–19 in *Phylogenetic analysis of morphological data* (J. J. Wiens, Ed.). Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Hillis, D.M., Moritz, C. and Mable, B.K. (1996). *Molecular systematics*, 2da ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.
- Iturbe, U. y Lazcano, A. (2007). El método natural de clasificación y los caracteres de comparación universal. En: Contreras-Ramos, A., Cuevas-Cardona, M. C., Goyenechea, I. e Iturbe U., (editores). *La sistemática, base del conocimiento de la biodiversidad*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo, México.

- Jalali, S.K., Ojha, R. and Venkatesan. T. (2015). DNA Barcoding for Identification of Agriculturally Important Insects. Springer India, 13-22.
- Jordal, B.H., and Kambestad, M. (2014). DNA barcoding of bark and ambrosia beetles reveals excessive NUMTs and consistent east-west divergence across Palearctic forests. *Molecular Ecology Resources*, 14(1), 7–17.
- Köhler, F., and Klausnitzer, B. (1998). Verzeichnis der Käfer Deutschlands. *Entomologische Nachrichten und Berichte (Dresden) Beiheft 4*, 1–185.
- Köhler, J., Vieites, D.R., Bonett, R.M., García, F.H., Glaw, F., Steinke, D. and Vences, M. (2005). New Amphibians and Global Conservation: A Boost in Species Discoveries in a Highly Endangered Vertebrate Group. *BioScience*. 55(8) 693 - 696.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2017). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Lacordaire, M.T. (1856). Histoire naturelle des Insectes. Genera des Coléoptères, or exposé méthodique et critique de tous genres proposés jusqu'ici dans cet ordre d'insectes. Tome Troisième. Contenant les familles des Pecticornes et Lamellicornes. Librairie Encyclopedique de Roret, Paris, 594 p.
- Langguth, A. (2005). Biodiversidad y Taxonomía. Langguth, A (ed.) Biodiversidad y Taxonomía. Presente y Futuro en el Uruguay. UNESCO, Montevideo, 23-30.
- Lawrence, J.F., and Newton, A.F. (1995). Families and subfamilies of Coleoptera (with selected genera, notes, references and data on family-group names) // In: *Biology, Phylogeny, and Classification of Coleoptera*. Eds. J. Pakaluk and S.A. Slipinski. Warszawa, 779-1006.
- Liu, K. Wang, F. CHEN, W. TU, L. MIN, M-S. and BI, K. (2010). Rampant Historical Mitochondrial Genome Introgression Between Two Species of Green Pond Frogs, *Pelophylax nigromaculatus* and *P. plancyi*. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 201.
- 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.
- Malgorn, Y. and Coquoz, R. (1999). DNA typing for identification of some species of Calliphoridae. An interest in forensic entomology. *Forensic Science International*, 102(2-3), 111–119.
- Manjarrés, H. EH., and Rendón, M. F. (2013). Piezas genitales masculinas como carácter taxonómico en escarabajos Coprófagos (Coleoptera.Scarabaeidae). *Ciencia en desarrollo*, 4(2), 39-47.
- Meier, R., Shiyang, K., Vaidya, G., Ng, P.K.L. (2006). DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology*, 55(5), 715–728.
- Moreno-Sanz, M. (2005). De la taxonomía tradicional a las filogenias moleculares. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Sección Biológica)* 100,45-65.
- Morinière, J., Hendrich, L., Hausmann, A., Hebert, P.DN., Haszprunar, G., and Gruppe, A. (2014). Barcoding Fauna Bavarica 78% of the Neuropterida fauna barcoded. *PLoS ONE*, 9.

- Morón, M.A., Ratcliffe, B.C. y Deloya, C. (1997). Atlas de escarabajos de México. Coleoptera Lamellicarnia, Vol. 1. Familia Melolonthidae. CANABIO y Sociedad Mexicana de Entomología, A.C. México. 280.
- Morón, M.A. (1986). El género *Phyllophaga* en México. Morfología, distribución y sistemática supraespecífica (Insecta: Coleoptera), Instituto de Ecología, A.C, 341.
- Morón, M.A. y Valenzuela-González, J.E. (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.A., Nogueira, G., Gómez, C.V. y Pérez, R. (2014). Biodiversidad de Melolonthidae (Coleoptera) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, S298-S302.
- Moorone, J.J. (2001). Sistemática, biogeografía, evolución. Los patrones de la biodiversidad en tiempo-espacio. Las Prensas de Ciencias. Mexico, D.F.
- Nelson, L.A., Wallman, J.F. and Dowton, M. (2007). Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 21(1), 44–52.
- Nieto-Nafría, J.M. (1999). Sobre Taxonomía, Sistemática y otros términos relacionados. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*. 26, 41-44
- Novotny, V., Basset, Y., Miller, S.D., Weiblen, G.D., Bremer, B., Cizek, L. and Drozd, P. (2002). Low host specificity of herbivorous insects in tropical forest. *Nature*, 416,841-844.
- Padial, J.M. and De la Riva, I. (2006). Taxonomic Inflation and the Stability of Species Lists: The Perils of Ostrich's Behavior. *Systematic Biology*. 55(5), 859-867.
- Paz, A., González, M. y Andrew, J. (2011) Códigos de barras de la vida: introducción y perspectiva. *Acta Biológica Colombiana*, 16(3),161-175.
- Purty, R.S. and Chatterjee, S. (2016). DNA Barcoding: An Effective Technique in Molecular Taxonomy. *Austin Journal Biotechnol Bioeng*. 3(1), 1059.
- Raupach, M.J., Astrin, J.J., Hannig, K., Peters, M.K., Stoeckle, M.Y. and Wägele, J.W. (2010). Molecular species identification of Central European ground beetles (Coleoptera: Carabidae) using nuclear rDNA expansion segments and DNA barcodes. *Frontiers in Zoology* 7(26).
- Raupach, M.J., Hendrich, L., Kuechler, S.M., Moriniere, J. and Gossner, M.M. (2014). Building-up of a DNA barcode library for True Bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera) of Germany reveals taxonomic uncertainties and surprises. *PLoS ONE*, 9.
- Romero-López, A.A., Morón, M.A., Aragón, A., and Villalobos, F.J. (2010). La “gallina ciega” (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae) vista como un “ingeniero del suelo”. *Southwestern Entomologist*, 35(3), 331-343.
- Rubinoff, D. (2006). Utility of Mitochondrial DNA Barcodes in Species Conservation. *Conservation Biology*, 20(4),1026-1033.
- Savolainen, V., Cowan, R.S., Vogler, A.P., Roderick, G.K. and Lane, R. (2005). Towards writing the encyclopedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1805–1811.

- Schindel, D.E. (2005). DNA Barcoding and the Consortium for the Barcode of Life. <http://www.barcoding.si.edu/>
- Schindel, D.E. and Miller, S.E. (2005). DNA barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature*, 435(7038),1-17.
- Schlick-Steiner, B.C., Steiner, F.M., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E. and Crozier, R.H. (2010). Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annual Review of Entomology*, 55, 421–438.
- Smith, K.G.V. (1986). *Manual of Forensic Entomology*. British Museum (Natural History), London
- Smith, M.A., Woodley, N.E., Jansen, D.H., Hallwachs, W. and Hebert, P.D.N. (2006). DNA barcode reveals cryptic host specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proceedings of the National Academy of Sciences*,103(10),3657-3662.
- Solís, A. (1999). Escarabajos de Costa Rica: las familias más comunes. *INBio, Costa Rica*, 110.
- Solano, J.J., Wolff, M. y Castro, L.R. (2013). Identificación molecular de califóridos (Diptera: Calliphoridae) de importancia forense en Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 39 (2), 281-290.
- Spelda, J., Reip, H.S. and Oliveira-Biener, U.M.RR. (2011). Barcoding Fauna Bavarica: Myriapoda—a contribution to DNA sequence-based identifications of centipedes and millipedes (Chilopoda, Diplopoda). *ZooKeys*, 156, 123–139.
- Sperling, F.A., Anderson, G.S., and Hickey, D.A. (1994). A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. *Journal of Forensic Sciences*, 39(2),418–427.
- Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R.H. and Vogler, A.P. (2003). A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*,18(2), 70-74.
- Triantafyllidis, A., Bobori, D.C. and Koliimitra. C. (2007). DNA barcoding in Greek freshwater fish: the cases of Doirani and Volvi lakes. *ESEB XI Congress Uppsala Sweden*. <http://www.dnabarcoding.ca/>.
- Tsukihara, T., Aoyama, H. and Yamashita. E. (1996). The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*, 272(5265), 1136–44.
- Valentini, A., Pompanon, F. and Taberlet, P. (2009) DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(2), 110–117.
- Vallejo, L.F. and Wolff, M. (2013). The genus *Phyllophaga* Harris (Coleoptera: Scarabaeidae: Melolonthinae) in the Colombian Andean Mountains. *Zootaxa* 3722(2), 101–142.
- Vincent, S.J., Vian, M. and Carlotti, M.P. (2000). Partial sequencing of the cytochrome oxidase b subunit gene I: a tool for the identification of European species of blow flies for postmortem interval estimation. *Journal of Forensic Sciences*, 45(4), 820–823.
- Wallman, J.F. and Donnellan, S.C. (2001). The utility of mitochondrial DNA sequences for the identification of forensically important blowflies (Diptera: Calliphoridae) in southeastern Australia. *Forensic Science International*, 120(1), 60–67.

- Ward, R.D., Holmes, B.H., William, T.W. and Last, P.R. (2008). DNA barcoding Australasian chondrichthyans: results and potential uses in conservation. *Marine and Freshwater Research* 59(1), 57-71.
- Wells, J.D. and Sperling, F.A. (2001). DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International*, 120(1), 110–115.
- Wells, J.D., Pape, T. and Sperling, F.A. (2001). DNA-based identification and molecular systematics of forensically important Sarcophagidae (Diptera). *Journal of Forensic Sciences*, 46(5), 1098–1102.
- Wiens, J. J. (2000). Preface. Pages IX–X in *Phylogenetic analysis of morphological data* (J. J. Wiens, Ed.). Smithsonian Institution Press, Washington, DC
- Wiens, J.J. and Servedio, M.R. (2000). Species delimitation in systematics: inferring diagnostic differences between species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological*, 267(1444), 631–636.
- Will, K.W., Mishler, B.D. and Wheeler, Q.D. (2005). The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology* 54(5), 844-851.
- Wilson, E.O. (2003). The encyclopedia of life. *Trends in Ecology & Evolution*, 18, 77-80.
- Wilson, E.O. (2004). Taxonomy as a fundamental discipline. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 359(1444), 739.
- World Conservation Union. (2010). IUCN Red list of threatened species. Summary Statistics for Globally Threatened Species.
- Zhang, D.X., and Hewitt, G.M. (1997). Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial primers in insects. *Insect Molecular Biology*. 6(2), 143–150.
- Zhang, Z. Q. (2011). Phylum Arthropoda von Siebold, 1848. In *Animal biodiversity: an outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness*, Z. Q. Zhang (Ed.). *Zootaxa (Special issue)* 3148, 99-103.
- Zunino, M. (2012). Cuarenta años de anatomía de las piezas genitales en la taxonomía de los escarabajos (Coleoptera: Scarabaeoidea): el estado del arte. *Dugesiana*, 18(2), 197-206.
- Zunino, M. y Halffter, G. (1988). Análisis taxonómico ecológico y biogeográfico de un grupo americano de Onthophagus. *Museo Regionale di Scienze Naturale Torino Monografía*, 9. 1-211.