



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Búsqueda de bacterias en el aparato reproductor de
Phyllophaga ravida (Coleoptera: Melolonthidae),
desde un enfoque químico-ecológico

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciado en Biología

PRESENTA:

Francisco Javier Pérez Estrada

DIRECTOR:

Angel Alonso Romero López



Agosto, 2016

AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo para mi trabajo de tesis, a través del proyecto VIEP “ROLA-NAT15-1 Búsqueda de microorganismos con potencial para la producción de atrayentes sexuales presentes en el aparato reproductor de hembras de coleópteros Melolonthidae”.

A la Dirección General de Planeación Institucional (DGPI), a través del Grupo de Investigación “Ecología, Manejo y Conservación de Recursos Naturales”, por el apoyo con una beca durante seis meses, para la conclusión del trabajo.

Este trabajo lo dedico principalmente a mis padres Marco Antonio Pérez Tlacuahuac y Marybell Estrada Morales, por la forma en que me educaron y me apoyaron, por creer en mí y en mis expectativas, por anhelar y desear siempre lo mejor para mí en cada día, por cada consejo y regaño que me guiaron durante toda mi vida para poder llegar a ser un profesional. Muchas gracias por todo lo que me han dado y por siempre estar ahí para mí.

A mis hermanos Marco Antonio Pérez Estrada, David Yair Pérez Estrada, Edwin Pérez Estrada, Uriel Iván Pérez Estrada y a mi cuñada Irais Cerón Fajardo, por todo su apoyo y preocupación que siempre me brindan día a día, por estar disponible para mí en cualquier situación y además de estar siempre con ustedes pasando buenos momentos durante todo el transcurso de mi vida, carrera y tesis. Siempre puedo contar con cada uno de ustedes gracias.

A mi director de tesis y amigo Angel Alonso Romero López, por todo el apoyo moral que brindaste durante el desarrollo de la tesis. Te agradezco la forma en que me enseñaste a ser independiente, sé que en el futuro me servirá de mucho, también gracias por de todos los consejos, sugerencias, regaños, enojos, desesperaciones, trabajos en rojo y muchas cosas más que me ayudaron a mejorar como persona y profesionista, por siempre estar pendiente en conseguir el material que solicitaba. Al igual te agradezco las convivencias que se realizaron fuera del ámbito estudiantil y te prometo que en algún momento de la vida conocer el significado de “el trabajo es para tal fecha”. Fue una experiencia muy grata al estar bajo tu tutela, trabajando con uno de los mejores investigadores que puede tener este país. Gracias por todo jefe.

A la profesora María Rosete Enríquez que fue parte fundamental para la realización de este proyecto mediante sus muy valiosas enseñanzas. Gracias por siempre estar en disposición de enseñarme, de nunca dejarme solo y ver que las cosas que realizo las entienda. Gracias por todo el apoyo moral, las convivencias, los consejos, la ayuda en conseguir materiales y equipo, Le agradezco mucho que me permitiera trabajar con usted unas de las mejores profesoras existen y que es excelente en el trabajo que realiza. Es una de las mejores experiencias que he tenido al trabajar con usted.

A Martha Raquel Trujillo Vélez, la ayuda que me brindaste ha sido sumamente importante para mí, estuviste a mi lado inclusive en los momentos y situaciones más tormentosas, siempre ayudándome y motivándome. Me ayudaste hasta donde te era posible, incluso más

que eso. Muchas gracias por todo lo que has hecho por mí y los momentos que hemos pasado.

Al Dr. José Antonio Rivera Tapia y al M. en C. Gonzalo Yanes Gómez, por sus importantes correcciones y sugerencias que mejoraron el manuscrito.

Al Dr. Agustín Aragón García, por recibirme en su laboratorio y permitirme usar su equipo de laboratorio.

A la Biol. Luz Benítez Herrera, por su tiempo y paciencia para enseñar me a realizar disecciones, que fue una parte fundamental para la elaboración de mi tesis.

Al compañero, colega y amigo Kareem Martínez Bonilla, al ser en gran medida la inspiración a seguir siempre adelante en el trabajo y de una manera muy emocionada he interesante. Gracias por toda esa motivación y por ser un ejemplo a seguir.

A los miembros y amigos del grupo de ecología química: Kika, Dafne, Saraí, Belem y Abraham por todo el apoyo brindado, los momentos juntos que pasamos, las buenas platicas, las convivencias y más que nada fue un placer trabajar con cada uno de ustedes. Gracias chicos

A los integrantes y amigos del laboratorio de macromoléculas: Efra, Bea, Angi, Fer, Gabo y Aki, por soportar las altas temperaturas a la hora de los experimentos y las exigencias al no permitir abrir la puerta, también por permitirme ser parte de su grupo y además de pasar muy buenos momentos con cada uno de ustedes. Gracias por todas las convivencias, sus buenos deseos y su apoyo.

Con dedicatoria especial a Sergio Espinosa Morales, gracias por tus grandes enseñanzas a lo largo de la carrera, las pláticas interminables de temas diversos en tu laboratorio, el rico café, el ser un guía en mi vida, al ofrecer siempre tu ayuda en cada momento, a tus palabras de consuelo y apoyo, gracias por todos esos momentos divertidos que la pase contigo y sobre todo gracias por tus grandes sugerencias. Descansa en paz.

RESUMEN	6
1. INTRODUCCION	7
2. ANTECEDENTES	8
2.1. Interacción entre microorganismos con otros organismos	8
2.2. Interacciones entre microorganismos con insectos	9
2.3. Coleópteros Melolonthidae	11
2.3.1. Clasificación taxonómica	11
2.3.2. Generalidades de hábitos alimentarios y desarrollo	11
2.3.3. Generalidades morfológicas	13
2.3.4. Aspectos de comunicación química de los melolóntidos	16
2.4. El género <i>Phyllophaga</i>	18
2.4.1. Generalidades	18
2.4.2. Anatomía interna de hembras de <i>Phyllophaga</i> : tubo digestivo y aparato reproductor	19
2.4.3. Comunicación química sexual en integrantes de <i>Phyllophaga</i>	20
2.5. <i>Phyllophaga ravid</i> a	21
2.5.1. Generalidades	21
2.5.2. Comunicación química sexual de <i>P. ravid</i> a	22
2.6. Interacción melolóntido-microorganismos desde un enfoque químico-ecológico	23
3. JUSTIFICACIÓN	23
4.HIPÓTESIS	24
5.-OBJETIVOS	24
5.1. General	24
5.2. Particulares	25

6. MATERIAL Y MÉTODOS	25
6.1. Obtención de adultos de <i>P. ravidia</i>	25
6.2. Descripción anatómica del aparato reproductor de hembras	26
6.3. Estudio microbiológico básico	26
6.4. Estudio bioquímico-metabólico	27
7. RESULTADOS	27
7.1. Descripción anatómica del aparato reproductor de hembras	27
7.2. Estudio microbiológico básico	30
7.3. Estudio bioquímico-metabólico	32
8. DISCUSIÓN	34
9. CONCLUSIONES	40
10. LITERATURA CITADA	41
11. ANEXOS	45

RESUMEN

Hace casi cuatro décadas se registró la existencia de bacterias en las glándulas accesorias de las hembras de *Costelytra zealandica* (White), a las cuales se les atribuyó la producción de un atrayente sexual. A partir de este antecedente, en años recientes se ha iniciado la búsqueda e identificación de microorganismos con estas características, en asociación con “melolóntidos” (Coleoptera: Melolonthidae) de especies distribuidas en México. Para tales fines, en el presente estudio, se consideró a *Phyllophaga ravidia* (Blanchard) como modelo biológico. Con el estudio morfológico, se encontró que el aparato reproductor de las hembras de *P. ravidia* es similar al aparato reproductor de las hembras de otras especies del género, con diferencias mínimas en organización estructural. En el interior de la cámara genital se encontraron dos tipos de colonias de bacterias con un olor “pronunciado” particular: las denominadas colonias “PRA” y “PRB”. La colonia PRA mostró una coloración amarilla, consistencia cremosa, translúcida, brillante, con un tamaño de 4 a 5 mm; con bacterias de forma de cocobacilo Gram negativo. La colonia PRB presentó una coloración blanca, consistencia lisa, tamaño de 1 a 2 mm, es translúcida y las bacterias mostraron forma de cocos Gram negativos. En estas mismas hembras se observó el crecimiento de una gran variedad de colonias en las muestras obtenidas del tubo digestivo, con una importante diversidad de colonias bacterianas; la mayor parte de las bacterias fueron Gram positivas con diferente morfología, desde bacilos hasta cocobacilos, cocos y estreptobacilos. Con la prueba bioquímica API 20E, se observó que la colonia PRA produce H₂S, Indol y NO₂, reaccionando a la ureasa, triptófano-desaminasa y gelatinasa, además de llevar a cabo fermentación-oxidación de glucosa y sacarosa; en los medios selectivos resultaron positivas para Salmonela Shigella, eosina azul de metileno y Mac Conkey Lac negativo. En contraste, la colonia PRB resultó positiva para arginina-dihidrolasa, triptofano desaminasa, además de desarrollar fermentación-oxidación de glucosa y de sacarosa; en los medios selectivos, resultaron positivas para sal-manitol y agar Mac Conkey Lac negativo. Estas evidencias permiten sugerir que los microorganismos encontrados, por su ubicación en el interior de la cámara genital de *P. ravidia*, podrían estar relacionadas con la producción de atrayentes químicos en esta especie.

1.- INTRODUCCIÓN

Las bacterias han existido por billones de años en la Tierra, siendo los organismos más abundantes y más estudiados desde épocas muy antiguas. Gran parte de la investigación de estos microorganismos se ha enfocado al ámbito médico, industrial, económico, biotecnológico y ecológico (Davis *et al.*, 2013). Dentro de estos estudios hay algunos de gran relevancia que han demostrado que ciertos microorganismos producen y liberan sustancias volátiles que provocan respuestas comportamentales en otros organismos. Recientemente ha surgido el interés de estudiar la asociación de estos microorganismos con insectos, desde diferentes enfoques, como el químico-ecológico. En este sentido, la búsqueda de sitios de producción de atrayentes sexuales (AS) ha despertado el interés, en un grupo en particular: el de los coleópteros Melolonthidae (“melolóntidos”) (Cherman y Morón, 2014). En algunas especies de este grupo se han localizado epitelios especializados en la producción de AS en sitios específicos del cuerpo (esternitos abdominales y placa anal) y del aparato reproductor de hembras (cámara genital y glándulas accesorias) de los géneros *Holotrichia* y *Phyllophaga* (Tada y Leal, 1997; Romero-López *et al.*, 2011). Estas sustancias químicas transmiten información en una relación entre muchos individuos, provocando en el receptor una respuesta comportamental o fisiológica, con carácter adaptativo para cualquiera de los interactuantes o para ambos (Dicke y Sabelis, 1988). Los AS y feromonas sexuales (FS) median interacciones entre organismos de la misma especie y diferente sexo, con fines de apareamiento (Dicke y Sabelis, 1988).

Para los melolóntidos, la información es prácticamente nula y sin existencia para especies mexicanas acerca de posibles asociaciones de estos organismos con bacterias para la producción de AS. Con el presente trabajo se pretende atender esta necesidad, iniciando la

búsqueda de microorganismos en el interior del aparato reproductor de las hembras de una especie perteneciente a los melolóntidos, estudiando sus algunas características básicas morfológicas, bioquímicas y metabólicas. De esta forma, se espera complementar la información con la que ya se cuenta sobre la comunicación química sexual de este grupo de insectos, enfocando la atención en la parte emisora (producción y liberación de AS) desde un enfoque microbiológico, tomando como modelo biológico a *P. ravidia*.

2.- ANTECEDENTES

2.1.- Interacción entre microorganismos con otros organismos

En la actualidad las interacciones entre los microorganismos con su hospedero pueden ser de varios tipos como comensalismo, mutualismo y parasitismo o patogenicidad (Rodríguez y Redman, 2007). Los microorganismos llevan a cabo miles de interacciones positivas o negativas con otros seres vivos. Ejemplos de este tipo de interacciones positivas se pueden encontrar con algunas bacterias Gram negativas que se encuentran en el interior de las raíces de plantas, como en el caso de *Azospirillum brasilense*, *Azotobacter* sp., *Acetobacter diazotrophicus* y *Burkholdemia cepacia*, las cuales presentan características particulares como la fijación de nitrógeno, síntesis de auxinas, producción de ácido indolacético, sideróforos, antibióticos y enzimas líticas detoxificadora, utilizadas para promover el crecimiento en las plantas (Torriente, 2010). En otros ejemplos de interacciones positivas, los microorganismos pueden cambiar el estilo de vida de algunos organismos hasta incluso su adaptación, como en el caso de los animales. Las proteobacterias, bacteroidetes, firmicutes, actinobacterias y verrucomicrobios se encuentran en el interior del intestino de

diferentes mamíferos en donde llevan a cabo la síntesis de vitaminas, la regulación de secreciones gastrointestinales, digestión de macronutrientes y xenobióticos, síntesis de antibióticos, estimulación de secreciones IgA, regulación de la producción de citoquinas, entre otras funciones (Pandeya *et al.*, 2012). En algunos peces, la interacción con bacterias de *Aliivibrio fischeri* permite la formación de órganos luminosos necesarios para el desarrollo de diferentes actividades cotidianas (Postigo-Ruiz, 2011). Algo parecido se puede presenciar en roedores donde algunas bacterias como *Bacteroides fragilis* producen polisacáridos, que están involucrados en la organogénesis del tejido linfoide del ratón e inducen la corrección de posibles deficiencias y desequilibrio en las células linfocitarias “T”, permitiendo así la maduración celular durante el desarrollo del sistema inmunológico (Postigo-Ruiz, 2011).

La participación de los microorganismos en el interior de otros organismos más complejos, es de una gran importancia por estar involucrados en procesos vitales o regulatorios, hasta incluso evolutivos, como se vio anteriormente y de esta manera se establece la importancia del estudio de estos microorganismos desde todos los ámbitos posibles y tener así una mayor comprensión de los fenómenos existentes en la naturaleza.

2.2. Interacciones entre microorganismos con insectos

En los insectos las relaciones biológicas con microorganismos se presentan en algunos procesos biológicos de sus hospederos, permitiendo así la existencia de ambos individuos. Se ha citado en la literatura especializada que integrantes de las familias Staphylinidae, Curculionidae y Chrysomelidae establecen interacciones con microorganismos de las

especies *Acyrtosiphon pisum*, *Pseudomonas syringa*, *Ophiostoma ips*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Sitophilus oryzae* y *Sitophilus zeamais* y de los géneros *Botryosphaeria*, *Ramichloridium*, *Cladophialophora*, *Fonsecaea*, *Rhynchostoma*, *Phomopsis*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Trametes*, *Trichosporon*, *Geotrichum* y *Leptosphaerulina*. Estos microorganismos presentan características ligno-celulolíticas para poder degradar componentes de carboximetilcelulosa. Existen otros microorganismos con características que les permiten proteger a los insectos de temperaturas bajas, además de ayudar en la absorción de nutrientes y producción de elementos protectores para los insectos contra otros organismos (König and Varma 2006; Delalibera, 2005; Rajagopal *et al.*, 2009).

Muchos de los trabajos acerca del estudio de las interacciones entre microorganismos e insectos se enfocan en la búsqueda de bacterias con atributos para la degradación de polisacáridos, como la celulosa. En este sentido, Lynd (2002), Devries (2001), Kumar (2008), Warren (1996), Geib *et al.* (2008), Sung (2003) y Rojas-Jiménez (2015), encontraron que algunos microorganismos como *Actinomycetales*, *Clostridiales*, *Trichoderma viride*, *Ufsarium Oxusporin*, *Piptoporus betulinus*, *Peniillium echinualatum*, *P. purpurogenum*, *Sporotrichum thermophile*, *Scyalidium thermophilum*, entre otros más, poseen la capacidad de degradar la celulosa. Algunos de estos microorganismos se han encontrado en el interior de algunos coleópteros pertenecientes a la familia Cerambycidae, *Passalidae* y en el interior de *Anoplophora glabrioennis* (Motschulsky) y *Zootermopsis angusticollis* (Hagen). En cambio, otras interacciones microorganismo-insecto han sido menos estudiadas como el estudio de microorganismos relacionados con la producción de volátiles que provoquen una respuesta comportamental. *Staphylococcus bacterium*,

Staphylococcus aureus, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Sphingobacterium multivorum*, *Enterobacter agglomerans* y *Ophiostoma ips* poseen la capacidad de producir componentes volátiles como amoníaco, metilamina, 3-metil-butanamina, 1-pirrolina, 2,3,4,5-tetrahidropiridina, pirazinas, ácido acético, 3-hidroxi-2-butanona, 2-feniletanol, indol, trimetilpirazina y verbenonas (Leroy *et al.*, 2011; Davis *et al.*, 2013), las cuales provocan respuestas comportamentales en los insectos relacionadas con la oviposición, la repelencia y la atracción (Leroy *et al.*, 2011; Davis *et al.*, 2013).

2.3.- Coleópteros Melolonthidae

2.3.1.- Clasificación taxonómica

La clasificación reciente de los melolóntidos se basa en la propuesta de Cherman y Morón (2014), la cual valida el empleo de este nivel taxonómico para su estudio. En general, la familia Melolonthidae está integrada por seis subfamilias: Melolonthinae, Dynastinae, Rutelinae, Hopliinae, Sericinae y Euchirinae; a su vez, junto con las familias Scarabaeidae, Cetoniidae, Lucanidae, Passalidae, Trogidae conforman la superfamilia Scarabaeoidea (Lamellicornia). Las características representativas de los integrantes de esta familia son la maza antenal formada por tres a seis lamelas brillantes con sedas dispersas, cuerpo ovalado de colores diversos, además de que en los últimos tres segmentos abdominales hay orificios respiratorios que están situados en el borde superior de los esternitos, entre otras características.

2.3.2.- Generalidades de hábitos alimentarios y desarrollo

Los melolóntidos están presentes en casi todos los ecosistemas terrestres, excepto en ambientes con hielo perenne. Se pueden encontrar desde el edafón hasta el dosel. Sus

hábitos se consideran diurnos, crepusculares o nocturnos. Algunas especies tienen asociaciones con nidos o madrigueras (Morón *et al.*, 2014). También se les considera como seres con importancia ecológica por ser degradadores, por intervenir en la polinización de algunas plantas y contribuir como bioindicadores zoogeográficos y biológicos (Amat-García *et al.*, 2005). Los adultos se alimentan de tejido vegetal vivo, madera, hojarasca, humus, así como de secreciones vegetales dulces que provienen de frutos maduros o fermentados. Algunas especies presentan hábitos alimentarios de tipo filo-rizófagos, filo-xilófagos, caulo-saprófagos y fle-xilófagos, mientras que otras cuentan con hábitos rizófagos, sapro-melífagos, sapro-antófagos y xilo-melífagos (Amat-García *et al.*, 2005). En estado larvario su dieta se basa en raíces, humus o xilema, bulbos, tubérculos, tejido vegetal humificado y desechos vegetales. Por algunos hábitos alimentarios, ciertas especies son consideradas como plagas en estado adulto y larvario, ya que afectan cultivos como maíz, frijol, caña de azúcar, algodón, arroz, sorgo, pastos, trigo, rosas, plántulas de viveros, papa, fresa, chiles, acelga, camote, durazno, garbanzo, haba, jitomate, manzano, betabel, zanahoria, espinaca, cebolla y sorgo (Morón, 1986; Amat-García *et al.*, 2005).

Los escarabajos de esta familia cuentan con un tipo de desarrollo conocido como metamorfosis completa u holometábola, en donde se presentan una serie de pasos de embriogénesis y diferenciación con etapas larvarias y pupales (Amat-García *et al.*, 2005). Las hembras ovipositan en el suelo a profundidades de 5 cm a 15 cm. Los huevos incrementan su tamaño conforme avanza su desarrollo; éstos presentan forma esferoide, elipsoide o ligeramente cilíndrica y están conformados por el corion (células foliculares del ovario). El siguiente evento es la ruptura del corion para la emergencia de las larvas, a los 12 o 14 días después de haber ovipositado; a esta primera etapa se le denomina primer

estadio larval. La siguiente etapa es la larva de segundo estadio donde aumenta la capa cefálica más o menos un 38% con respecto a la larva del primer estadio. La última etapa es la del tercer estadio; aquí se lleva a cabo un aumento de tamaño a diferencia de la larva de segundo estadio; además, presenta una cabeza más esclerosada, con mandíbulas de mayor tamaño y fuerza. Una vez alcanzado el tercer estadio, la larva sufre una etapa conocida como pupa, en la cual se encuentra inactiva, semejante a un estado de latencia con un cambio de las estructuras internas y externas. Por último, la pupa se rompe por el efecto de las lluvias de mayo a junio, emergiendo el imago o adulto para llevar a cabo las diferentes actividades propias de esta etapa (Ortega-Ojeda, 2005; Amat-García *et al.*, 2005; Ramos-Santafe *et al.*, 2013).

2.3.3.- Generalidades morfológicas

Morfología externa

Los adultos de esta familia tienen expuestos o escondidos el labro y las mandíbulas bajo el clípeo. Presentan mandíbulas esclerosadas, antenas con ocho o diez artejos, de las cuales, sólo de tres a siete forman la maza antenal; además, sus lamelas plegadizas, en su mayoría, tienen sensilas placoideas y está presente el *canthus* ocular. En el abdomen presentan seis esternitos, siete pares de orificios respiratorios (tres o cuatro están en la región pleura), dos o tres en los extremos esternales y uno se encuentra en la zona tergal. La placa pigidial está completamente expuesta o cubierta por los élitros en algunas zonas. Los parámetros genitales masculinos son bilobulados o fusionados. El dimorfismo sexual en esta familia va de lo muy notable a lo poco visible. La coloración de los organismos es diversa, creada por elementos químicos, físicos o fisicoquímicos. El tamaño de los adultos es muy variable, ya

que la longitud de sus cuerpos va de los 3 mm hasta los 130 mm, la anchura de los élitros oscila de 1.8 a 51 mm y la expansión de las alas es de 8 a 230 mm. En la última etapa del estado larvario, la longitud dorsal va de los 12 a los 225 mm y el ancho del abdomen de 2 a 40 mm (Morón *et al.*, 2014).

En el estado larvario son escarabeiformes, presentando antenas con cuatro artejos alargados. Su epifaringe es asimétrica con tormae separada. El maxilar contiene galea y lacinia fusionadas. Sus placas respiratorias son cribiformes. Las extremidades posteriores presentan forma alargada. Su abdomen muestra nueve segmentos, cuatro pares de orificios respiratorios funcionales de forma anular y cuatro pares rosetiformes que se encuentran atrofiados, algunos con órganos dioneiforme y urogomphi (Morón *et al.*, 2014).

Morfología interna

El aparato reproductor femenino de los insectos en general, incluyendo a los melolóntidos, (Figura 1), cuenta con un par de ovarios con sistemas de conductos. Cada uno de los ovarios presenta grupos de ovariolas, las cuales en su base forman el pedicelo; éstos a su vez, se reúnen para formar el cáliz, el cual se abre a un oviducto lateral. La agrupación de los oviductos laterales forma el oviducto común que desemboca hasta la cámara genital (vagina), en la cual se pueden encontrar otras estructuras asociadas como la espermateca, la glándula espermática y glándulas accesorias (Cabezas-Melara, 1996; Martínez y Morón, 2015).

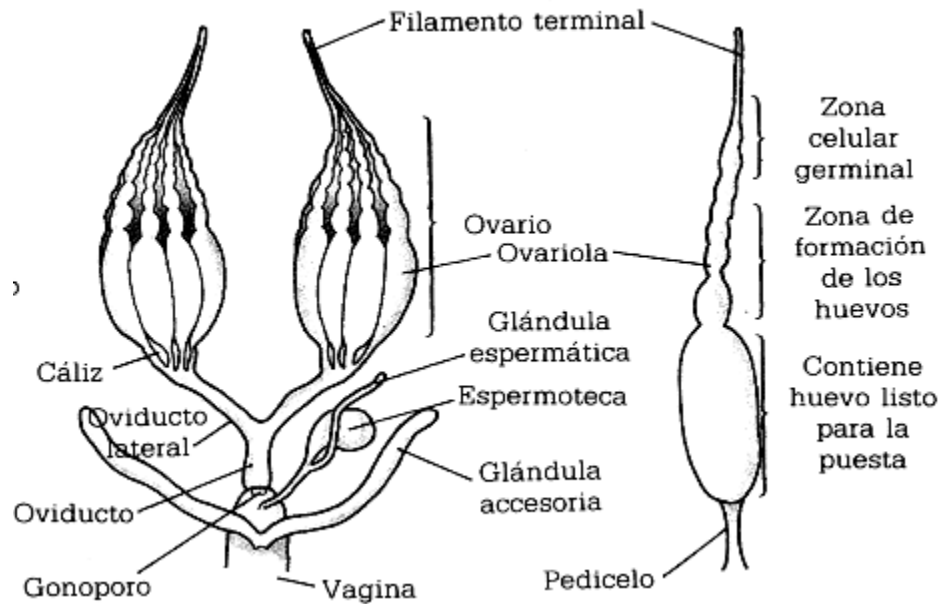


Figura 1. Componentes del sistema reproductor femenino de los insectos y melolóntidos (tomado de Cabezas-Melara, 1996).

En general, el tubo digestivo de los insectos y de los melolóntidos (Figura 2) está constituido por tres regiones: el estomodeo, el mesenterón y el proctodeo. El estomodeo comprende la faringe, el esófago, un tubo estrecho después de la faringe, el buche, un alargamiento del esófago y el proventrículo que contiene el estomodeica. La siguiente sección (mesenterón) consta de una bolsa de diámetro uniforme que por lo regular está dividido en dos o más partes. La última parte del sistema digestivo (proctodeo) está dividida en dos regiones: el intestino anterior y el recto. El intestino anterior consta de una parte anterior, el íleo y el colon, además el tubo digestivo se encuentra muy cerca del sistema reproductor femenino (Berberet y Helms, 1972; Cabezas-Melara, 1996).

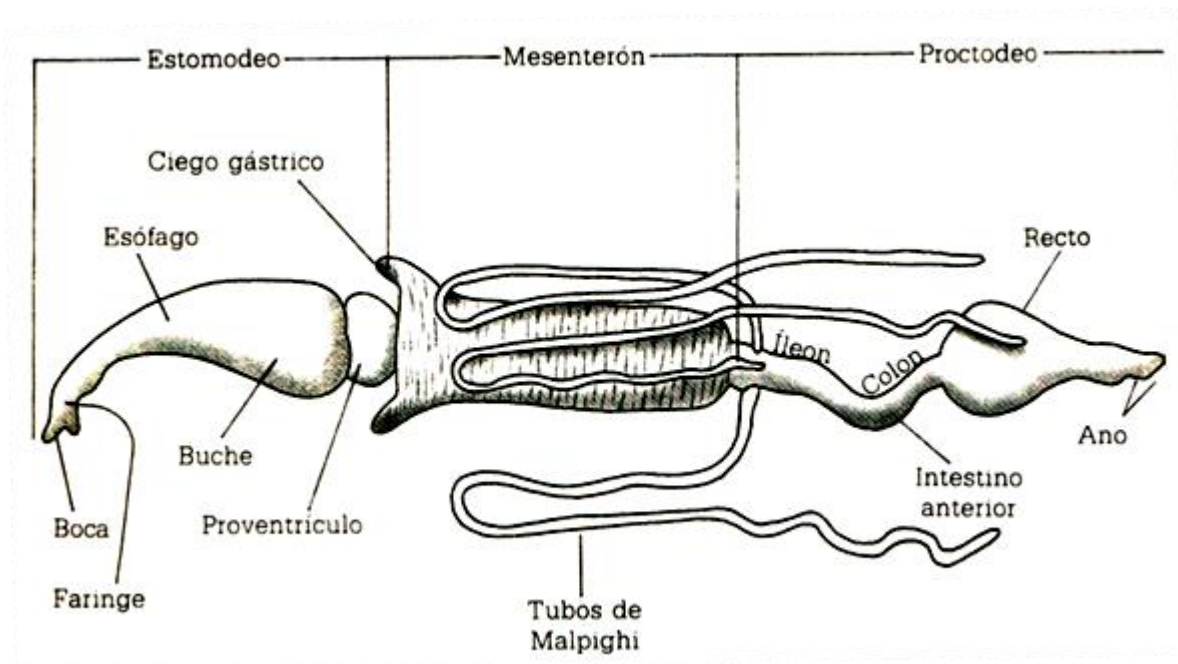


Figura 2. Secciones del tubo digestivo de los insectos y melolótidos (tomado de Cabezas-Melara, 1996).

2.3.4.- Aspectos de comunicación química de los melolótidos

La ecología química se encarga del estudio de sustancias químicas relacionadas en las interacciones ecológicas intra e interespecíficas entre organismos (Wood, 1983; Cortez, 2013). Dichas sustancias químicas son consideradas como infoquímicos, los cuales transmiten información en una interacción entre muchos individuos, provocando en el receptor una respuesta conductual o fisiológica, con carácter adaptativo para cualquiera de los interactuantes o para ambos (Dicke y Sabelis, 1988). Dentro de estas sustancias químicas se encuentran los aleloquímicos y las feromonas. Los aleloquímicos median interacciones entre dos individuos de diferentes especies y se dividen en alomonas (el segundo interactuante se favorece en el contacto), kairomonas (solo el primero de los interactuantes se beneficia) y sinomonas (ambos interactuantes son beneficiados). En el caso de las feromonas, son sustancias que se encuentran involucradas en interacciones entre

individuos de la misma especie, destacan las feromonas sexuales (FS), los cuales median interacciones entre organismos de la misma especie y diferente sexo, con fines de apareamiento (Nordlund y Lewis, 1976; Dicke y Sabelis, 1988). Esto es la base para entender un esquema de ecología química en cualquier modelo biológico. En este caso en particular, se cuenta ya con información sobre la comunicación química y el comportamiento sexual de los melolóntidos, lo que en conjunto se ha denominado “comunicación química sexual” (Romero-López *et al.*, 2010a). Esto se centra en el estudio de tres elementos principales: “emisor”, “mensaje químico” y “receptor”. Para obtener esta información, es necesario el estudio del comportamiento precopulatorio de la especie bajo estudio. Con base en esto se ha encontrado que en los melolóntidos se presenta el denominado “llamado sexual”, un patrón de comportamiento que consiste en una serie de actos, movimientos y posturas consecutivas por parte de las hembras, que culmina con la exposición de la cámara genital; en este preciso momento se sugiere que son liberados los infoquímicos que atraen a los machos para el acercamiento y el contacto sexual (Romero-López *et al.*, 2010a). El estudio del “emisor” ha permitido la obtención de evidencias morfológicas que confirman la existencia de sitios productores de FS o atrayentes sexuales (AS) en hembras de los géneros *Anomala* y *Holotrichia* (Tada y Leal, 1996; Leal, 1998; Kim y Leal, 1999). En especies de *Anomala* se ha encontrado que la producción de los AS y FS se lleva a cabo en células epiteliales localizadas en la placa anal y los esternitos pigidiales de las hembras, así como a través de pequeños poros cuticulares (Tada y Leal, 1997). En contraste, en especies de *Holotrichia* se ha observado que en la sección posterior de la cámara genital hay células Clase I, relacionadas con la producción y secreción de feromonas en insectos (Kim y Leal, 1999).

Otros trabajos se han enfocado en el “mensaje químico”, encontrándose que las FS de estos insectos se componen principalmente de derivados de aminoácidos, fenólicos, de ácidos grasos e isoprenoides (Leal, 1998; Tillman *et al.*, 1999; Anaya *et al.*, 2001 Zarbin *et al.* 2007) y en el “receptor”, reportándose que los quimiorreceptores localizados en las lamelas antenales son el principal sitio de captación de las feromonas (Leal, 1998; Ochieng *et al.*, 2002; Romero-López *et al.*, 2010b).

2.4.- El género *Phyllophaga*

2.4.1. Generalidades

Phyllophaga, propuesto por Thaddeus y Hariss en 1827, es un género que forma parte de la subfamilia Melolonthinae y se divide en nueve subgéneros (Phytalus, Chlaenobia, Listrochelus, Tostegoptera, Eugastra, Chirodines, Clemora, Cnemarachis y Triodonyx), presenta más de cuarenta grupos de especies y se estima que el género está conformado por 792 especies (Morón, 1986; Morón, 2003a; Evans *et al.*, 2009). Los integrantes de este género presentan formas muy variadas. En general, presentan un contorno ovalado-alargado con sección subcilíndrica. En el caso de la superficie dorsal, ésta es muy variable. El abdomen, en la mayoría, es robusto y convexo. El tamaño general es 15 mm de largo y de ancho 6.5 mm. La mayoría de las especies de este género presentan una coloración externa pardo-amarillenta o pardo-rojiza (Morón, 1986). En México, son conocidos como “mayates de mayo”, “escarabajos sanjuaneros”, “escarabajos de junio” o melolóntidos. En estado larvario son mejor conocidas como “gallinas ciegas”, “gusanos blancos” o “nixticuiles” (Morón, 1986). Los adultos se alimentan del follaje de un gran número de plantas frutales,

forrajeras y de ornato. En estado larvario tienen una mayor importancia económica en nuestro país, ya que se alimenta de raíces de cultivos como la fresa, frijol, haba, maíz, etc. (Morón, 1986; 2003b).

2.4.2. Anatomía interna de hembras de *Phyllophaga*: tubo digestivo y aparato reproductor

El aparato reproductor de las hembras de este género consta de un par de placas superiores (supragenitales) y un par de placas inferiores (subgenitales), las cuales están articuladas entre sí. Este par de placas se encuentran sostenidas por membranas plegadizas y cuentan con una cámara genital caracterizada por tener la íntima gruesa y la presencia de estructuras esclerosadas (Morón, 1986). También cuenta con una *bolsa copulatrix* que puede ser larga pedunculada o corta sin pedúnculo, la cual es alargada pedunculada y contiene una zona tubular, seguida de una ampolla donde las membranas suelen tener las texturas gráciles o gruesas, con presencia o ausencia de estriaciones. En algunos casos, el pedúnculo presenta placas fuertemente esclerosadas o zonas con seda. La posición de las bolsas regularmente es dorsal con respecto al aparato reproductor abriéndose hacia el oviducto, cuando están reducidas las bolsas se abren directamente al antro o en la cámara genital (Coca-Abia, *et al.*, 1993). El oviducto medio es un conducto cercano al antro genital. Es una zona con un desarrollo medio que en algunos casos puede estar muy esclerosada; su morfología y tamaño es variable. La espermateca con su glándula son de las estructuras del aparato reproductor con presencia más constante en el género. Los integrantes de este género presentan dos conductos, uno bulboso y otro tubular, los cuales no están fuertemente esclerosados (Coca-Abia, *et al.*, 1993). Estos escarabajos poseen glándulas accesorias, las cuales se abren ventralmente de la base del oviducto medio o de la *bolsa copulatrix*. En

algunos casos quedan envueltas por la cámara genital cuando ésta es de un tamaño muy grande. Pueden presentarse uno o dos pares de glándulas accesorias: un par es semiesférico de mayor tamaño y el otro par es tubular, de un tamaño menor al primer par (Coca-Abia, *et al.*, 1993; Romero-López *et al.*, 2011). La cámara genital presenta escleritos pares e impares que, dependiendo de la especie, su forma y grado de esclerotización varían. En algunos casos las especies de este género pueden presentar repliegues supra o infraintestinales (Coca-Abia, *et al.*, 1993). El tubo digestivo para este género presenta un intestino anterior con una extensión dentro del protórax. Enseguida se encuentra el intestino medio el cual desemboca en el VII segmento abdominal; el último segmento es el intestino posterior donde está el área de absorción (Berberet y Helms, 1972)

2.4.3. Comunicación química sexual en integrantes de *Phyllophaga*

Para el género *Phyllophaga*, el comportamiento precopulatorio sigue el patrón general de los melolóntidos, con la particularidad de que el “llamado sexual” culmina con la protrusión de la cámara genital por parte de las hembras, con la posterior atracción de los machos con fines de apareamiento (Romero-López *et al.*, 2010a). Con respecto a los demás elementos de comunicación química, se cuenta con datos sobre la “emisión” para la especie norteamericana *Phyllophaga anxia* (LeConte) (Berberet y Helms, 1972) y algunas distribuidas en México, como es el caso de *Phyllophaga opaca* (Moser) (Romero-López *et al.*, 2010b), *Phyllophaga obsoleta* (Blanchard) (Romero-López *et al.*, 2011) y *Macroductylus mexicanus* (Burmeister) (Benítez-Herrera *et al.*, 2015). Se sabe ya de la existencia de un epitelio glandular especializado en el interior de la cámara genital y de las

glándulas accesorias (tipo I y tipo II) de las hembras de dichas especies; todo ello asociado a la producción de los AS y FS.

2.5.- *Phyllophaga ravid*

2.5.1. Generalidades

Phyllophaga ravid (Figura 3) es un melolóntido que presenta un ciclo biológico anual y se distribuye desde Estados Unidos hasta Guatemala, Belice y México (Morón *et al.*, 1997). Las larvas de esta especie se alimentan de raíces de diversos cultivos agrícolas, como el maíz (Morón, 2003b), mientras que a los adultos se les ha asociado con hojas de *Quercus* spp. (Fabaceae), posiblemente alimentándose de éstas (Romero-López *et al.*, 2007). Los adultos de *P. ravid* presentan una longitud de 12-14 mm, cuerpo alargado con una cabeza chica comparada con el protórax, ojos grandes y clipeo trapezoidal redondeado. Las antenas están compuestas por diez artejos. Las uñas tienen la base dilatada con el diente intermedio largo. Cuenta con pronoto ancho con bordes prolongados en la parte medial. Espolones metatibiales articulados. Los machos tienen una placa anal acanalada o ligeramente plana. El cuerpo presenta una coloración amarillenta o un color pardo rojizo (Hernández-Cruz *et al.*, 2014). Las actividades de vuelo generales de *P. ravid* inician en los horarios de 20:15 a 20:40 hrs, con un periodo de 145 min. En lo referente al ciclo de vida, el periodo de incubación de los huevos va de los 9 a 30 días. El primer estadio larval dura entre 16 y 46 días, el segundo estadio de 21 a 58 días y el tercer estadio entre 76 y 127 días. La pupa tiene un periodo de desarrollo de 24 a 43 días, previo a la emergencia del imago o adulto

inmaduro; por lo tanto, el ciclo de vida de esta especie es anual (Aragón-García *et al.*, 2005).

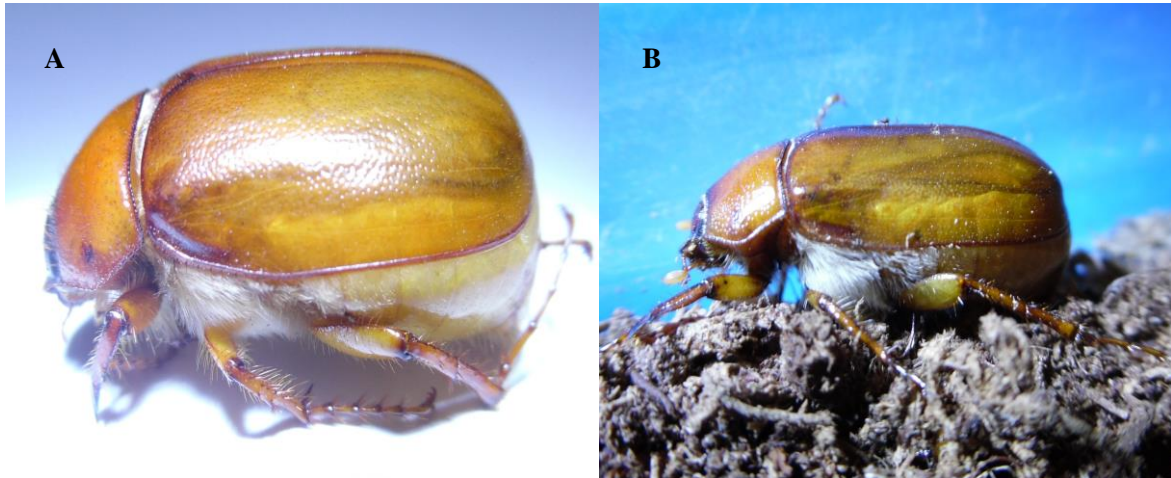


Figura 3. Imágenes de la hembra de *Phyllopha ravidia* ((Blanchard). A) Acercamiento latera izquierdo. B) Vista lateral izquierdo de la hembra postrada sobre sustrato. Tomado con cámara digital modelo EC-ES9ZZZBABCO.

2.5.2.- Comunicación química sexual de *P. ravidia*

Se sabe que el comportamiento precopulatorio de esta especie se inicia con la emergencia y vuelo de las hembras alrededor de las 20:15 hrs; enseguida comienza el “llamado sexual” donde las hembras exponen la cámara genital (duración aproximada de 139 s), para dar paso al acercamiento de los machos (duración aproximada de 30 s) y los intentos de cópula (23 s aproximadamente). Ya después, durante la cópula, los machos exponen su edeago, el cual introducen dentro del conducto genital de las hembras (duración aproximada de 700 s). Al final, los machos retraen el edeago y se alejan de las hembras, las cuales permanecen estáticas unos segundos para inmediatamente enterrarse en los sitios de donde emergieron

originalmente (Romero-López *et al.*, 2007). De todo el esquema de comunicación química sexual de esta especie, al momento se cuenta con información exclusivamente sobre el “receptor”, reportándose dimorfismo sexual evidente en el tipo, número y distribución de quimiorreceptores en las lamelas antenales de los adultos (Romero-López *et al.*, 2010c).

2.6. Interacción meloléntido-microorganismos desde un enfoque químico-ecológico

Hoyt *et al.* (1971) extrajeron bacterias de las glándulas accesorias de *Costelytra zealandica*, a las cuales les atribuyeron la propiedad de producir fenol, el cual es el componente principal del AS de esta especie; se trata del primer (y único) trabajo para meloléntidos en el cual se menciona la presencia de bacterias involucradas en la producción de AS. En estudios para *P. obsoleta* y *M. mexicanus*, se ha sugerido la presencia de microorganismos dentro de las glándulas accesorias (Romero-López *et al.*, 2011; Benítez-Herrera *et al.*, 2015), aunque no se han efectuado estudios microbiológicos para contrastar esta información.

3.- JUSTIFICACIÓN

Para contar con mayor información acerca de cómo se lleva a cabo cualquier tipo de interacción ecológica en la naturaleza, es necesario el estudio detallado de cada integrante involucrado en forma individual, así como de la interacción de todos los elementos desde un enfoque integral. Para el estudio de las interacciones microorganismo-meloléntido, no es la excepción e incluso, requiere de un análisis más riguroso cuando se aborda desde el contexto de la endosimbiosis y de la comunicación química.

En el presente estudio se plantea la búsqueda de microorganismos en el interior de la cámara genital y glándulas accesorias de hembras de *P. ravidia*. Además de complementar el esquema de comunicación (con más datos sobre el “emisor”) y ampliar la información sobre aspectos ecológicos, sistemáticos y evolutivos del grupo Melolonthidae, con lo que se espera abrir una línea de investigación desde una perspectiva microbiológica, bioquímica y metabólica de la interacción melolóntido-microorganismo. Todo ello, para sentar las bases a mediano y largo plazo en pro de impulsar alternativas de manejo de especies consideradas como plaga (como es *P. ravidia*), a través del monitoreo de poblaciones por AS y FS.

4.-HIPÓTESIS

En el interior de la cámara genital y glándulas accesorias de hembras de *P. ravidia* se observan bacterias con características morfológicas y bioquímicas específicas, diferentes a las de otras bacterias encontradas en el tubo digestivo y en la hemolinfa de las mismas hembras y que algunas de estas características estén ligadas en la producción de los AS.

5.- OBJETIVOS

5.1.- General

Obtener información sobre la comunicación química sexual de los melolóntidos, en particular del sitio de emisión de atrayentes sexuales, con la búsqueda de microorganismos dentro de estructuras del aparato reproductor de hembras de *P. ravidia*.

5.2.- Particulares

- Obtener cultivos de microorganismos del interior de la cámara genital y de las glándulas accesorias (tipo I y tipo II) de hembras de *P. ravidia*.
- Obtener cultivos de microorganismos del tubo digestivo y de hemolinfa colectada del interior de la región abdominal de las mismas hembras.
- Describir la morfología de los microorganismos localizados dentro de la cámara genital, glándulas accesorias, tubo digestivo y hemolinfa de hembras de esta especie, con base en técnicas básicas de identificación.
- Efectuar pruebas microbiológicas y de bioquímica microbiológica con las colonias previamente aisladas de la cámara genital, glándulas accesorias, tubo digestivo y hemolinfa de *P. ravidia*.

6.- MATERIAL Y MÉTODOS

6.1.- Obtención de adultos de *P. ravidia*

Las hembras de *P. ravidia* se colectaron manualmente debajo de las lámparas de luz de los jardines de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) (coordenadas 19°00'13.2" N - 98°12'11.6" W). Los especímenes obtenidos se sexaron e identificaron taxonómicamente con base en las claves dicotómicas de Morón (1986). Para los experimentos, se seleccionaron las hembras que presentaban una apariencia corporal externa sin deformaciones ni lesiones y sin la presencia de huevos en su región abdominal.

6.2.- Descripción anatómica del aparato reproductor de hembras

Se utilizaron quince hembras de esta especie, las cuales se colocaron en solución fisiológica Ringer (Anexo 1), donde se les extrajo el aparato reproductor. Cada uno de éstos se fijó con Carnoy y se almacenaron en alcohol al 96%. Posteriormente, las muestras se sometieron a la tinción con Negro de clorazol (Anexo 1) y se observaron a través de un microscopio de luz clara (Olympus SZX7).

6.3.- Estudio microbiológico básico

Las quince hembras seleccionadas con el criterio empleado para el estudio anatómico, se sometieron a un proceso de lavado con agua destilada y etanol al 70%. Se colocaron en la solución Ringer (estéril) donde se disectaron ventral y longitudinalmente, con el objetivo de extraer el aparato reproductor completo de cada una. De los aparatos reproductores obtenidos, se separó la cámara genital y las glándulas accesorias (tipo I-tipo II), las cuales se lavaron con etanol al 70% y posteriormente se colocaron en solución Ringer (estéril). De cada una de las cámaras genitales se les realizaron cortes sagitales. De las mitades obtenidas de las cámaras genitales, se obtuvieron raspados del interior que a su vez se depositaron en placas con agar Luria Bertani (LB) e incubándolas a 37°C por 24 h. Con las glándulas tipo I se efectuó el mismo procedimiento que con las cámaras genitales. En el caso de las glándulas tipo II, se procedió a fragmentar el órgano. Posteriormente, se colocó una fracción sobre placas de agar LB con posterior incubación a 37°C por 24 h. Del resto del cuerpo se obtuvieron muestras del interior del tubo de hemolinfa, tubo digestivo y de la solución Ringer antes y después de colocar las partes del aparato reproductor. Dichos raspados se sembraron en placas con agar LB y se incubaron a 37°C por 24 h. De las bacterias que crecieron en el agar LB, se tomó una “Unidad Formadora de Colonias” (UFC)

a la cual se realizó su descripción tomado en cuenta la forma, tamaño, borde, elevación, superficie, consistencia, luz transmitida, luz reflejada y color. Para determinar su morfología bacteriana se realizó una tinción de Gram que básicamente se realizó un frotis, el cual se sometió a cristal violeta, lugol, alcohol-cetona y safranina (cada componente durante 1 min); en cada paso la muestra se enjuagó con agua destilada. Las tinciones, una vez secas, se observaron a 100x.

6.4. Estudio bioquímico-metabólico

Los microorganismos encontrados dentro de la cámara genital y de las glándulas accesorias fueron considerados como UFCs para su cultivo en medio LB líquido con agitación a 37°C por 24 h. Del cultivo resultante se sometió a una dilución de 1:100; de esta solución se tomaron 20 µl y se distribuyeron en placas con medio LB sólido, obteniendo diluciones de 1×10^{-1} a 1×10^{-10} . Se utilizó la dilución 1×10^{-8} para efectuar una prueba API 20E, utilizando las instrucciones del fabricante (Biomérieux) (Anexo 2). De las muestras de la cámara genital y tubo digestivo en las placas con medio LB, se consideró una UFC para posteriormente ser sembradas en diferentes medios selectivos como agar Mac Conkey, citrato de Simmons, eosina azul de metileno, Salmonella-shigella y sal-manitol a 37°C, por 24 h.

7.- RESULTADOS

7.1.- Descripción anatómica del aparato reproductor de hembras

En la Figura 4 se muestra el aparato reproductor de las hembras de *P. ravidia*, el cual está conformado por dos ovarios, dos oviductos laterales, oviducto común, la espermateca, la

glándula espermática, la *bursa copulatrix*, tres pares de placas genitales, la cámara genital y dos pares de glándulas (tipo I-II). En la parte apical del aparato reproductor de las hembras de *P. ravida* se localizan los ovarios que están conformados por 6 ovariolas cada una. En cada ovariola se observan de cinco a seis oocitos, en diferentes niveles de desarrollo. Las uniones de las partes basales de las ovariolas dan lugar al cáliz en cada una de los ovarios. Cada cáliz se encuentra conectado con un oviducto lateral que a su vez estos dos últimos conductos se unen para formar el oviducto común con un tamaño mayor que las estructuras anteriores. En la región centro-lateral del aparato reproductor de las mismas hembras se localizan dos conductos, uno de los conductos es largo y corto que tiene una parte muy quitinizada con una ligera depresión. Este conducto se dirige hacia la *bursa copulatrix*, que es una estructura semi-esférica rugosa que en su región basal presenta una zona esclerosada. El segundo conducto muy delgado y corto, que es una estructura tubular ligeramente encorvada de la parte medial, además, el mismo conducto se dirige hacia la glándula de la espermateca, la cual es de forma semi-tubular, voluminosa, de un tamaño mayor con respecto a la espermateca y presenta un tejido que la envuelve por completo. Estas dos últimas estructuras se encuentran unidas en la parte basal de la *bursa copulatrix*. En la región postero-dorsal del aparato reproductor de estas hembras se pueden localizar dos pares de placas de coloración café en el extremo dorsal, las cuales presenta una forma circular en la base y en la parte posterior presentan una forma puntiaguda de coloración negra, sin la presencia de fibras. En la parte postero-ventral del aparato reproductor de estas hembras está el último par de placas que presentan una forma irregular y con una coloración café; en la parte superior presentan una quitina gruesa y en la región basal contienen pequeñas fibras delgadas. A comparación de las placas dorsales, las ventrales son de mayor tamaño. En la base del oviducto común se localiza la cámara genital de las

hembras de esta especie, la cual es de una forma semi-esférica y presenta una pared delgada conformada por cutícula. De cada extremo de la parte anterior de la cámara genital, se encuentran unidas las glándulas tipo I. Estas glándulas son periformes de una coloración negra, que por la parte dorsal están conectadas a la cámara genital por un tejido tubular ancho y corto. En la región anterior se encuentran conectadas a las glándulas tipo II mediante un tejido tubular delgado. Estas glándulas son de forma tubular, de una coloración café y presentan un tamaño menor a comparación de las glándulas tipo I.

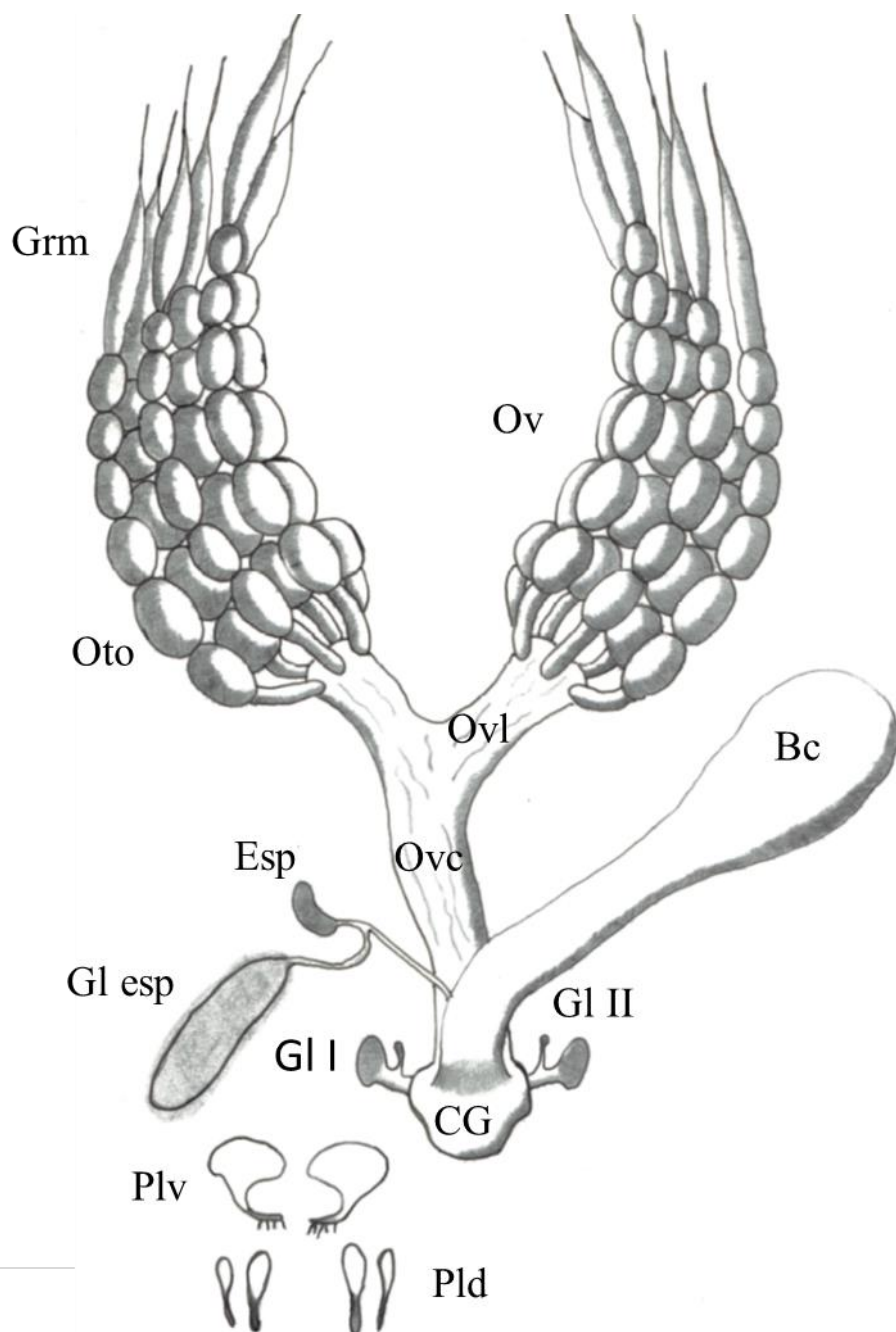


Figura 4. Imagen donde se muestra una organización general de estructuras del aparato reproductor de las hembras de *Phyllophaga ravidia*. Bc= bursa copulatrix; Cg= cámara genital; E= espermátoforo; Esp= espermateca; Gl I= glándula accesoria tipo I; Gl II= glándula accesoria tipo II; Gl esp= glándula de la espermateca; Grm= germario; Oto= oocito; Ov= ovario; Ovc= oviducto común; Ovl= oviducto lateral; Pld= placa genital dorsal; Plv= placa genital ventral.

7.2.- Estudio microbiológico básico

Se observó el crecimiento de colonias bacterianas únicamente en las muestras del tubo digestivo y de la cámara genital. En el caso de la hemolinfa (Figura 5C), las glándulas accesorias de ambos tipos (Figura 5A y 5B) y en el Ringer antes y después de usar (Figura 5D), no se encontraron microorganismos. En el interior del tubo digestivo, se detectó una gran diversidad de colonias bacterianas en las placas con medio LB sólido (Figura 5E). La mayoría de las bacterias presentes fueron Gram positivas con diferente morfología, desde bacilos y estreptobacilos hasta cocos y cocobacilos.

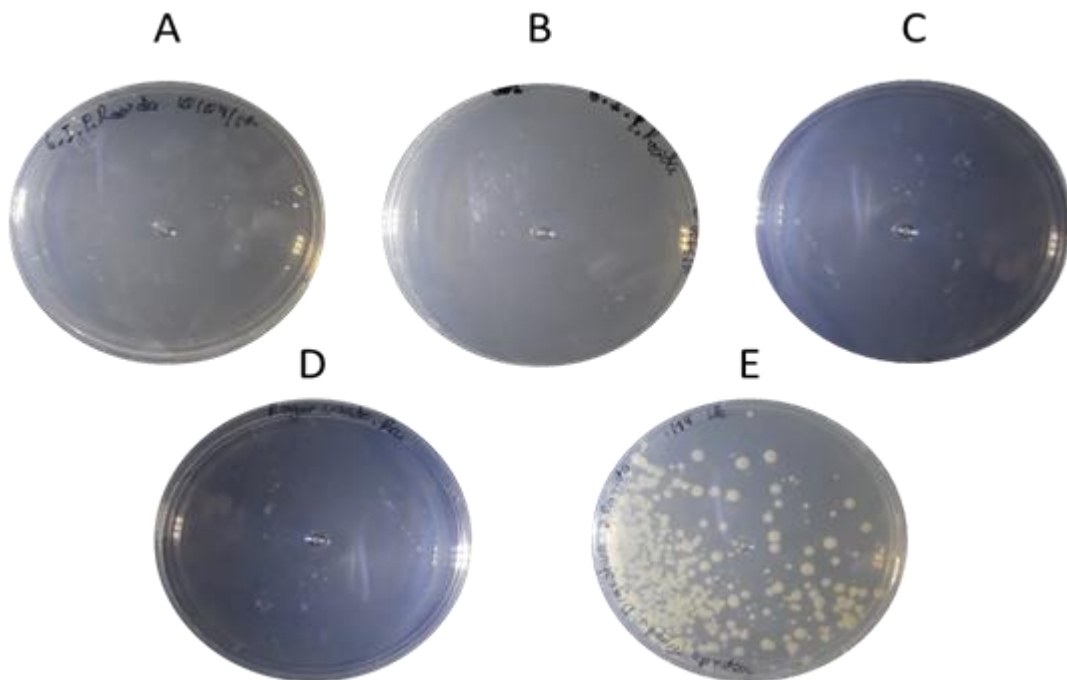


Figura 5. Imágenes de los cultivos bacterianos de diferentes partes del cuerpo de *P.ravida*, en medio LB. A) Glándulas accesorias tipo I. B) Glándulas accesorias tipo II. C) Hemolinfa. D) Ringer antes y después de usar. E) Tubo digestivo.

Con respecto al interior de la cámara genital, en las muestras extraídas se observó el crecimiento de dos tipos de colonias bacterianas en el medio LB sólido: “PRA” (siglas de “*Phyllophaga ravida* amarillas”) y “PRB” (“*Phyllophaga ravida* blancas”) (Figura 6). La colonia PRA (Figuras 6B y 6F) presentó una coloración amarilla, borde liso, forma irregular con una elevación umbonada, consistencia cremosa, translúcida-brillante y con un tamaño de 4 a 5 mm. Las bacterias de esta colonia mostraron una forma de bacilo de tipo Gram negativas con un olor “pronunciado” muy particular. La colonia PRB (Figuras 6C y 6E) presentó una coloración blanca, la forma del borde es lisa con una elevación convexa, consistencia cremosa, presenta un tamaño de 1 a 2 mm, es translúcida y brillante. Las bacterias presentes en esta colonia tienen la forma de cocos con clasificación de Gram negativas que al igual que las bacterias PRA presenta un olor particular y pronunciado.

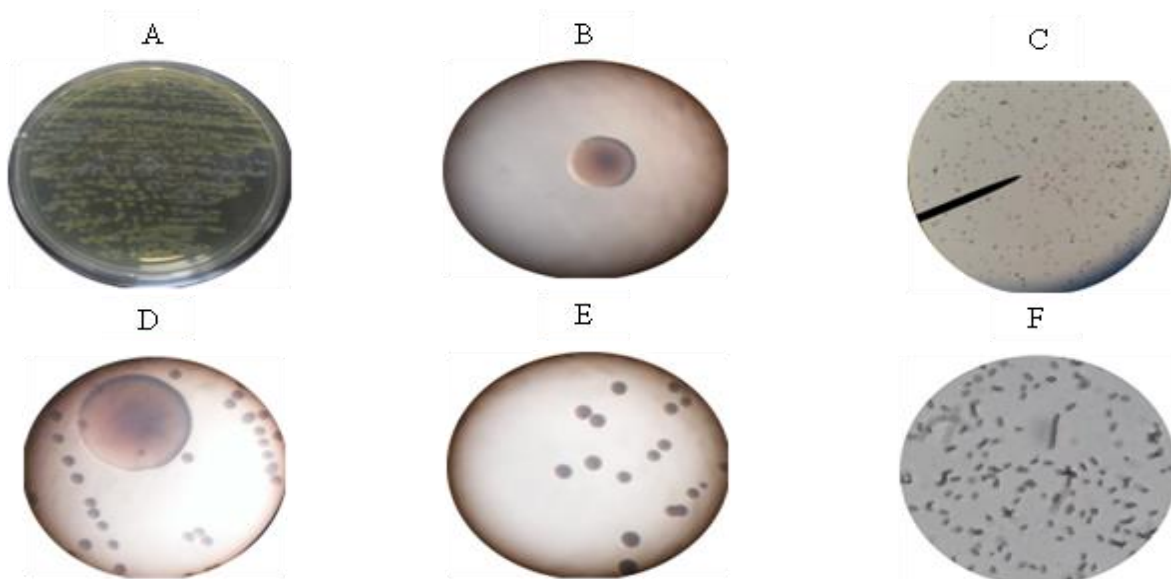


Figura 6. Imágenes de las colonias bacterianas encontradas en el interior de la cámara genital de *Phyllophaga ravidia*. A) Las dos colonias de bacterias en la placa con medio LB-agar. B) Colonias de bacterias “PRA”, 60x. C) Tinción de Gram y morfología de las bacterias PRB, 100x. D) Las dos colonias de bacterias a 60x. F) Colonia de las bacterias PRA a 10x. G) Tinción de Gram y morfología de las colonias de bacterias PRB. 100x.

7.3.- Estudio bioquímico-metabólico

En la prueba API 20E, la colonia PRA produjo H₂S (ácido sulfhídrico), indol y NO₂ (óxido de nitrógeno), presentó reacción positiva para las enzimas ureasa, triptófano-desaminasa y gelatinasa, además lleva a cabo la fermentación-oxidación de glucosa y sacarosa (Figura 8). En los medios selectivos, resultaron positivas para los medios Salmonella Shigella, eosina azul de metileno y Mac Conkey Lac negativo (Figura 7). En contraste, la colonia PRB resultó positiva para arginina-dihidrolasa y triptófano desaminasa; también realiza la fermentación-oxidación de glucosa y de sacarosa (Figura 9). En los medios selectivos, resultaron positivas para sal-manitol y en el agar Mac Conkey Lac negativo (Figura 7). En la Figura 10 se sintetizan los resultados positivos y negativos obtenidos para ambas colonias de todas las pruebas a las que se sometieron.

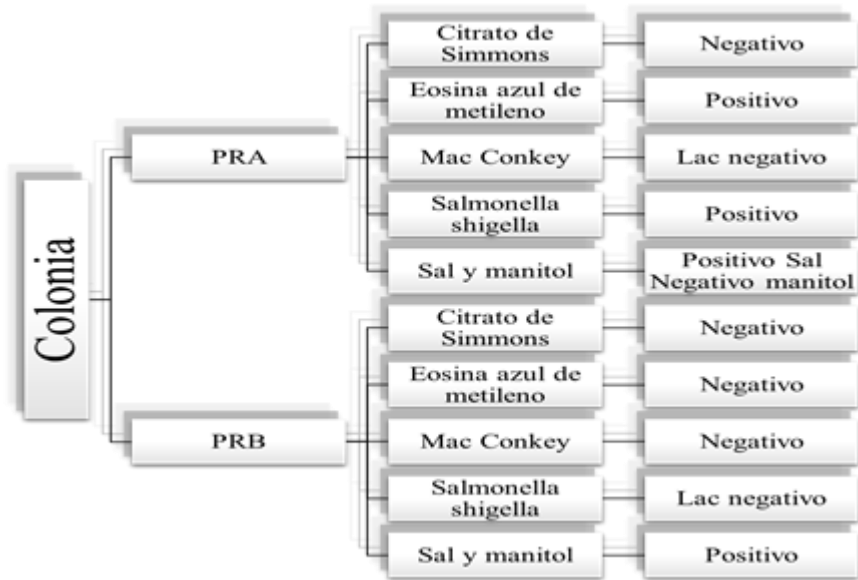


Figura 7. Pruebas bioquímicas de las colonias extraídas en la cámara genital de *Phyllophaga ravidia* (PRA y PRB) a los medios selectivos citrato de Simmons, eosina azul de metileno, Mac Conkey, Salmonella Shigella y sal-manitol.



Figura 8. Material empleado para la prueba API 20E con las colonias PRA. Las pruebas positivas fueron H₂S, URE, TDA, IND, GEL, GLU y SAC. H₂S= ácido sulfhídrico; URE= ureasa; TDA= triptófano desaminasa, IND= indol; GEL=gelatinasa; GLU= glucosa; SAC= sacarosa.



Figura 9. Material empleado para la prueba API 20E con las colonias PRB, donde salió positivo en las pruebas TDA, GLU y SAC. TDA= triptófano desaminasa, GLU= glucosa; SAC= sacarosa.

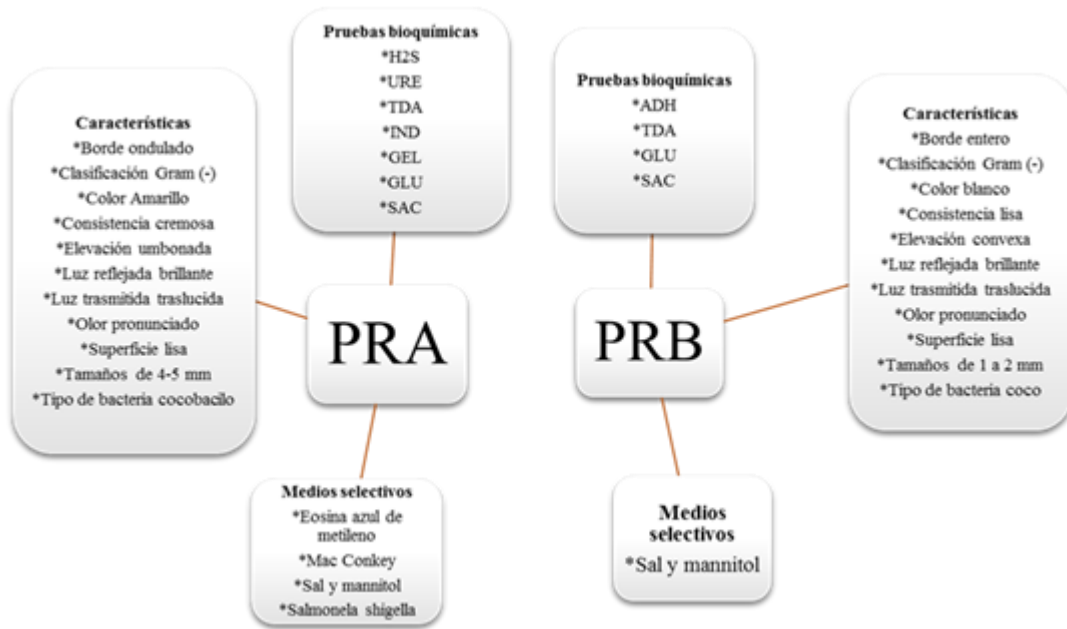


Figura 10. Pruebas positivas obtenidas en la tinción de Gram, prueba API 20E y medios selectivos con las colonias bacterianas PRA y PRB, encontradas en la cámara genital de las hembras de *Phyllophaga ravida*.

8.- DISCUSIÓN

El aparato reproductor de las hembras de *P. ravida* es similar al de otras especies del género. La distribución, organización de las estructuras y órganos son prácticamente idénticos a las del aparato reproductor de las hembras de otras especies del género como *P. obsoleta*, *P. opaca* (Romero-López *et al.*, 2010b, 2011), *Phyllophaga testaceipennis* (Blanchard), *Phyllophaga latipes* (Bates), *Phyllophaga pruinosa* (Blanchard), *Phyllophaga rugipennis* (Schauffus), *Phyllophaga setifera* (Burmeister), *Phyllophaga subrugosa* (Moser) y *Phyllophaga tenuipilis* (Bates) (Martínez-Morales *et al.*, 2015). Sólo se pueden apreciar algunas diferencias en la forma de las estructuras, en el tamaño de las mismas, la cantidad y distribución de los oocitos, por lo que en la mayoría de las especies del género

Phyllophaga presentan de cuatro a cinco oocitos por ovariola (Martínez-Morales *et al.*, 2015), mientras que para *P. ravidata* son de cinco o seis oocitos por ovariola. La espermateca y su glándula (solo por observación) son ligeramente más grandes con respecto a las especies anteriormente mencionadas. Una diferencia muy distintiva de *P. ravidata* es la existencia de una zona esclerosada en la base de la *bursa copulatrix*. En esta zona es, aparentemente, donde se conecta la espermateca junto con su glándula; en el caso de las otras especies del género la espermateca y su glándula van directamente conectada a la cámara genital. Las glándulas accesorias de la mayoría de las especies de *Phyllophaga*, son dos pares, pero también pueden presentar un solo par de glándulas como en el caso de *P. latipes*, *P. opaca*, *P. pruinosa* (Martínez-Morales *et al.*, 2015). La forma de las glándulas es muy variada, pero en general las glándulas tipo I son semi-globosas y las glándulas tipo II semi-tubulares (Martínez-Morales *et al.*, 2015). El tamaño igual varía dependiendo de la especie, pero se conserva que la glándula tipo I es de mayor tamaño con respecto a las glándulas tipo II (Martínez-Morales *et al.*, 2015). En cambio, para las glándulas accesorias de *P. ravidata* se conservan estas mismas características al poseer un par de ambos tipos de glándulas, destacando que aparentemente las glándulas tipo I son de mayor tamaño que las especies mencionadas anteriormente. Las placas genitales de algunos integrantes del género *Phyllophaga* presenta una forma muy variada y pueden tener de dos a cuatro pares distintos de placas donde la mayoría de las especies del género presentan solo un par de placas genitales, por lo tanto, son consideradas como un carácter taxonómico (Martínez-Morales *et al.*, 2015). Las placas genitales de *P. ravidata* son de forma distinta a las placas genitales de las demás especies del género y lo que la distingue de la mayoría de las especies del género es por presentar 3 pares de placas. Se puede observar que tiene cierta similitud con las placas ventrales de *P. obsoleta*, *P. rugipennis* y *P. setifera* por tener un par de placas con

forma de tenaza (Martínez-Morales *et al.*, 2015). Para el caso de la cámara genital es similar que las demás cámaras genitales de las especies del género al ser de forma semi redonda y además es la región donde todas las estructuras desembocan. Con lo anterior se obtuvo una descripción del aparato reproductor completo e integrado de las hembras de *P. ravidia* (Blanchard) por lo que solo se contaba con una leve descripción de algunos órganos por separado del aparato reproductor de estas hembras (Martínez-Morales *et al.*, 2015). Por ultimo nos brinda las bases para complementar el esquema de comunicación química sexual de *P. ravidia* permitiendo así la posible localización de los sitios productores de infoquímicos y además de facilitarnos la búsqueda de los posibles sitios de alojamiento de los microorganismos que pudieran estar involucrados en la producción de AS.

Referente a los microorganismos, existen diferencias con respecto a lo que se observó en las hembras de *C. zealandica*. En *P. ravidia* se encontraron bacterias en el interior de la cámara genital, aunque no dentro de las glándulas accesorias como sucedió en el estudio de Hoyt *et al.* (1971). La diferencia entre lo encontrado en *P. ravidia* y en *C. zealandica* puede ser que para esta última el principal objetivo de la investigación era la búsqueda directa de una FS para su uso en el manejo de *C. zealandica*. En contraste, el interés con *P. ravidia* se enfocó en la búsqueda de posibles nuevos elementos involucrados en la producción de AS dentro del esquema de la comunicación química de estos melolóntidos. Por ello, además de la obtención de información básica generada en este sentido, se promueve la apertura de una línea de investigación novedosa, proponiéndose una metodología específica que permitiera una comprobación y localización de microorganismos más precisa en el interior del aparato reproductor de las hembras, evitando así contaminación de otros microorganismos pertenecientes al resto del cuerpo.

Las bacterias encontradas específicamente en el interior de la cámara genital de las hembras de *P. ravidia* posiblemente estén relacionadas con la participación en alguna actividad vital del escarabajo como se ha visto con otras especies de insectos. Además, estos microorganismos que se encuentran comúnmente asociado a un órgano interno comúnmente tienen interacciones positivas y están involucrados en el, desarrollo normal, vital y evolutivo de los insectos (Rajagopal, 2009). Por lo tanto, desde el enfoque químico-ecológico es posible que estos microorganismos encontrados específicamente en la cámara genital estén participando muy de cerca en el proceso de la comunicación química sexual de *P. ravidia* con la producción de los AS, debido a que están presentes en una de las zonas productoras de estas sustancias (Kim y Leal 1999). También, se deben considerar que nosotros demostramos que en el caso de las bacterias PRA producen productos metabólicos derivados del azufre (H₂S) y en otras especies de melolóntidos como *Phyllophaga critina* (Burmeister) se ha reportado que dentro de la composición química de su feromona contiene componentes químicos derivados de compuestos sulfurosos (Robbins *et al.*, 2003). Por lo anterior, es posible que las bacterias estén aportando componentes químicos para la elaboración del AS junto con las glándulas accesorias, ya que éstas también están involucradas en la producción de estos atrayentes (Berberet y Helms 1972; Zamotailov, 1988). Ahora bien, también se debe considerar la posibilidad de que las bacterias por sí solas estén sintetizando el AS mediante los productos derivados de su metabolismo como el caso del indol y del amoníaco, que son elementos químicos volátiles que producen las bacterias PRA. Estos componentes volátiles se han reportado que en otros insectos provoca una actividad biológica reflejada en respuestas de atracción (Leroy *et al.*, 2011; Davis *et al.*, 2013; Tillman *et al.*, 1999). Incluso algunas otras bacterias también se ha reportado que

producen componentes fenólicos que también son elementos principales en los AS de algunos insectos (Leroy *et al.*, 2011; Davis *et al.*, 2013; Tillman *et al.*, 1999).

Las colonias PRA aparentemente son las que están más relacionadas con la producción del AS por el metabolismo y los elementos volátiles que libera al ambiente, como se mencionó anteriormente. En cambio, las PRB, con base en su metabolismo, no presenta elementos volátiles; por lo tanto, estas bacterias podrían estar más relacionadas con el mantenimiento del medio en donde se desarrollan o incluso involucradas en aspectos de protección como se ha documentado en otras bacterias encontradas en el intestino de algunos otros insectos al no permitir el crecimiento de otros agentes bacterianos o fúngicos al ser ingresando en la ingesta (Pound *et al.*, 2011). Por ello, se sugiere que la cámara genital de las hembras de *P. ravidata*, es una estructura interna que al momento en que las hembras de esta especie realizan el “llamado sexual”, para emitir los AS con el objetivo de atraer al macho, exponen esta estructura interna mediante un par de músculos (Romero-López *et al.*, 2010a), en este preciso momento, al estar abierta la cámara genital puede ingresar cualquier microorganismo que se encuentre en el medio, por lo que se sugiere que las bacterias PRB pudieran estar interviniendo en la protección de la cámara genital mediante la eliminación de estos microorganismos externos.

Las PRA son bacterias aerobias, mesófilas que carecen de la capacidad de oxidar el citocromo, aunque sí tienen la capacidad para degradar el aminoácido triptófano mediante la enzima triptofanasa. Esta colonia posee la característica de hidrolizar la gelatina a péptidos y aminoácidos mediante la enzima gelatinasa, de desdoblar la urea para formar dos moléculas de amoníaco mediante la acción de la enzima ureasa, además de liberar azufre

enzimáticamente mediante la cisteinasa en aminoácidos que contienen azufre, produciendo así H₂S. Además, presenta la característica de desaminar la fenilalanina en ácido fenilpirúvico, pueden crecer en medios salinos (concentración 10%) y tiene la capacidad de fermentar la glucosa-sacarosa en CO₂, agua y energía. En cambio, las PRB cuentan con la capacidad de desaminar la fenilalanina en ácido fenilpirúvico, se establecen en medios salinos (concentración 10%) y fermentar la glucosa-sacarosa produciendo CO₂, agua y energía (Koneman *et al.*, 2006).

El presente estudio es el único en su tipo en donde se consideran las características bioquímicas-metabólicas de los microorganismos encontrados en el aparato reproductor de un melolóntido, con el objetivo de obtener las primeras bases para la descripción e identificación de las bacterias localizadas en la cámara genital de *P. ravidia*. También es importante resaltar el hecho de que este trabajo puede cambiar como se estudia el esquema de comunicación química sexual de los melolóntidos en la parte del emisor, al no solo tomar en cuenta la cámara genital y las glándulas accesorias como los sitios exclusivos de producción de AS, si no también considerar un posible nuevo elemento (microorganismos) en el esquema de comunicación química sexual de los melolóntidos para la producción de los AS que no es considerar como un epitelio “especializado” perteneciente al aparato reproductor de las hembras de los melolóntidos.

Por todo lo anterior, es indispensable realizar más trabajos a los microorganismos encontrados dentro del aparato reproductor de *P. ravidia*, como la confirmación de su participación en la ecología-química de *P. ravidia* con la comprobación de su actividad de

“atracción” mediante bioensayos (estableciendo así su simbiosis) y si es el caso, identificar los elementos químicos volátiles que están emitiendo al ambiente estas bacterias, la identificación molecular de estas bacterias y el diseño de trampas de monitorio. También es importante realizar trabajos acerca de la búsqueda de microorganismos dentro de la cámara genital y en las glándulas accesorias en otros melolóntidos y comprobar sus actividades de atracción.

Por otro lado, este trabajo nos brinda incógnitas fuera del contexto de la ecología-química, incógnitas que van de temas acerca de la coevolución que existe dentro de estos dos organismos (bacterias-melolóntidos), temas referentes a la adquisición-herencia de las bacterias en el aparato reproductor de las hembras en los melolóntidos, temas sobre la existencia-distribución de otros microorganismos (no cultivables) en la cámara genital y glándulas accesorias del aparato reproductor de las hembras de estos escarabajos que no estén inmersos en la producción de AS. Con lo anterior se establecen posibles bases para la construcción de líneas de investigación que estén fuera del contexto químico-ecológico en melolóntidos.

9.- CONCLUSIONES

1. La organización y ubicación de estructuras y órganos del aparato reproductor de las hembras de *P. ravidia* son similares al de otras hembras del género.

2. En el interior de la cámara genital de hembras de *P. ravidia* se encontraron dos tipos de colonias bacterianas: la colonia PRA con morfología de cocobacilo Gram-negativo y la colonia PRB con morfología de coco Gram negativo
3. Las bacterias encontradas en el tubo digestivo de *P. ravidia* tienen morfología y metabolismos distintos a comparación de las bacterias obtenidas de la cámara genital.
4. Los requerimientos metabólicos de las dos colonias de bacterias en la cámara genital son distintos entre sí y permiten sugerir la producción de compuestos químicos volátiles.
5. Las glándulas accesorias tipo I y tipo II no presentaron crecimiento de microorganismos, a diferencia de lo reportado por Hoyt *et al.*, (1971) para hembras de *C. zealandica*.

10.- LITERATURA CITADA

- Amat-García, G., Gasca, H. J. y Gasca, G. E. 2005. Guía para la cría de escarabajos. Fundación Natura- Universidad de Colombia, Bogotá, Colombia, pp. 20-21.
- Anaya, A.L., Espinosa-García, F. y Cruz-Ortega, R. 2001. Relaciones químicas entre organismos: aspectos básicos y perspectivas de su aplicación. Ed. Instituto de Ecología, Mexico, pp. 36-41.
- Aragón-García, A., Morón, M.A., López-Olguín, J. F. y Cervantes-Peredo, L.M. 2005. Ciclo de vida y conducta de adultos de cinco especies de *Phyllophaga* Harris, 1827 (Coleoptera: Melolonthidae; Melolonthinae). *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.), 21(2): 87-99.
- Benítez-Herrera, L.N., Martínez, I. y Romero-López, A.A. 2015. Anatomía del aparato reproductor de *Macrodactylus mexicanus* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae) y su posible participación en su comunicación química. *Southwestern Entomologist*, 40(1): 189-198.
- Berberet, R. C. and Helms, T. J. 1972. Comparative anatomy and histology of selected systems in larval and adult *Phyllophaga anxia* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 65: 1026-1053.
- Cabezas-Melara, F. A. 1996. Introducción a la entomología. UAAAN., México. 148 p.
- Coca-Abia, M., Martín-Piera, F. y Morón, M. A. 1993. Anatomía y morfología de la genitalia femenina de las especies mexicanas del género *Phyllophaga* (*sensu lato*) (Coleoptera: Melolonthidae). Relaciones filogenéticas con otros géneros del área mediterránea. *Giornale Italiano di Entomologia*, 6: 263-274.

- Cortez, V. 2013. Ecología química y perspectivas de su aplicación en la conservación de la biodiversidad. Cuadernos de Biodiversidad, 41:16-21.
- Costa, J. F., Yábar, E., Gianoli, E. 2009. Parasitismo sobre *Eurysacca melanocampta* Meyrick (Lepidoptera: gelechiidae) en dos localidades de Cusco, Perú. Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín, 62(1): 4807-4813.
- Davis, T. S., Crippen, T. L., Hofstetter, R. W. and Tomberlin, J. K. 2013. Microbial volatile emissions as insect semiochemicals. Journal of Chemical Ecology, 39 (6): 687-806.
- Delalibera, I., Handelsman, J. and Raffa, K.F. 2005. Contrasts in cellulolytic activities of gutmicroorganisms between the wood borer, *Saperda vestita* (Coleoptera: Cerambycidae), and the bark beetles, *Ips pini* and *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculionidae). Environ. Entomol, 34, 541–547.
- Devotto, L., Merino, L., France, A., Contreras, M. y San Martín, D. 2010. Control invernal de las larvas de *Cydia pomonella* usando nematodos entomopatógenos nativos. Informativo Agropecuario. INIA-BIOLECHE, 23(4): 34-36.
- Devries, R., Visser, J. 2001. Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 65(4): 497-522.
- Dicke, M. and Sabelis, W. 1988. Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? Functional Ecology, 59(5):131-139.
- Dickschat, J. S., Wagner-Dobler, I. and Schulz, S. 2005. The chafer pheromone buibuilactone and ant pyrazines are also produced by marine bacteria. Journal of Chemical Ecology, 31(4): 925-947.
- Evans, A. V. and Smith, A. B. T. 2009. An electronic checklist of the New World chafers (Coleoptera: Scarabaeidae:Melolonthinae), 353 p.
- Geib, S., Filley, T., Hatcher, P., Hoover, K., Carlson, J., Jiménez, M., Nakagawa, K., Sleighter, R. and Tien, M. 2008. Lignin degradation in wood-feeding insects. Proceedings of the National Academy of Science, 105 (35): 12932-12937.
- Hernández-Cruz, J., Morón, M.A., Ruiz-Vega, J., Sánchez-García, J.A., Martínez-Martínez, L. y Pérez-Pacheco, R. 2014. Bionomía de las especies de *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolothidae) en Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México. Acta Zoológica Mexicana, 30: 144-160.
- Hoyt, C.P., Osborne, G.O. and Mulcock, A. P. 1971. Production of an insect sex attractant by symbiotic bacteria. Nature, 230: 472-473.
- Koneman, E. W. 2008. Diagnóstico microbiológico. México DF, México: Médica Panamericana, pp. 204-288.
- König, H. and Varma, A. 2006. Intestinal Microorganisms of termites and other invertebrates. Velga Berlin Heidelberg: Springer, pp 271- 300.
- Kumar, R., Singh, S. and Singh, O. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. Journal Ind Microbiol Biotechnol, 35: 377-391.
- Leroy, P.D., Sabri, A., Verheggen, F.J., Francis, F., Thonart, P. and Haubruge, E. 2011. The semiochemically mediated interactions between bacteria and insects. Chemoecology, 21: 113–122.
- Lynd, L., Weimer, P., Vanzyl, W. and Pretorius, I. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66(3): 506-577.

- Martínez-Morales, I. y Morón, M.A. 2015. Los sistemas reproductivos en hembras de Melolonthinae, Rutelinae y Dynastinae (Coleoptera: Scarabaeoidea, Melolonthidae). *Southwestern Entomologist*, 40(2): 369-385.
- Mera-Velasco, Y. A., Gallego-Roperó, M. C. y Armbrrecht, I. 2010. Interacciones entre hormigas e insectos en follaje de cafetales de sol y sombra, Cauca-Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, 36 (1): 116-126.
- Monge, N. J., Gómez, E. P. y Rivas, R. M. 2002. *Biología general*. Editorial Universidad Estatal a Distancia, San José, Costa Rica. 251 p.
- Morón, M. A. 1986. El género *Phyllophaga* en México. Morfología, Distribución y Sistemática supraespecífica (Insecta: Coleoptera). Instituto de Ecología. México, D.F. pp. 2-47.
- Morón, M. A. 2003a. Diversidad, distribución e importancia de las especies de *Phyllophaga* Harris en México (Coleoptera: Melolonthidae). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, pp. 1-27.
- Morón, M. A. 2003b. Las especies de *Phyllophaga* (*s. str.*) del grupo *rugipennis* (Coleoptera: Melolonthidae). En: *Escarabajos de Latinoamérica: Estado del conocimiento: Monografías tercer milenio*: Sociedad Entomológica Aragonesa, Melic, A. (Ed). Zaragoza, España, 3: 19-34.
- Morón, M.A., Ratcliffe, B.C. y Deloya, C. 1997. Atlas de los escarabajos de México. Coleoptera: Lamellicornia. Vol. I. Familia Melolonthidae. Rutelinae, Dynastinae, Cetoniinae, Trichiinae, Valginae y Melolonthinae. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Soc. Mex. de Entomología. Xalapa, Veracruz, México. 270 p.
- Morón, M. A., Nogueira G., Rojas-Gómez C. V. y Arce-Pérez, R. 2014. Biodiversidad de Melolonthidae (Coleoptera) en México, 85: 299-302.
- Ortega-Ojeda, C. A. 2005. Estudios metodológicos para evaluar el impacto económico de escarabajos Melolonthidae (Insecta: Coleoptera) en tres cultivos tropicales. Tesis de Maestría en Ciencias en Fitoprotección. Escuela Politécnica del Ejército, Palmira, Valle del Cauca, Colombia, pp. 18-36.
- Pond, W.G., Bazer, F.W. and Rollin, B.E. 2011. *Animal Welfare in Animal Agriculture: Husbandry, Stewardship and Sustainability in Animal Production*. CRC Press, New York. pp. 185-203.
- Postigo-Ruiz, A.G. 2011. La complejidad de las relaciones de los microorganismos con organismos superiores. *Real academia de ciencias veterinarias de Andalucía oriental*, 24(1): 33-43.
- Rajagopal, R. 2009. Beneficial interactions between insects and gut bacteria. *Indian J. Microbiol*, 49: 114-119.
- Ramos-Santafé, N. C. y Suarez-Carvajal, M. A. 2013. Determinación taxonómica y evaluación del ciclo de vida del escarabajo defoliador (Coleoptera: Scarabaeidae) posible nueva plaga del *Theobroma cacao* en Doncello, Caquetá. Tesis en Ingeniería Agroforestal. Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente, Florencia, Colombia, pp 2-33.
- Rivera-Gasperín, S. L. y Morón, M. A. 2013. Análisis filogenético del subgénero *Phyllophaga* (*Triodonyx*) (Coleoptera: Melolonthidae: Melolonthinae). *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84: 802-817.

- Robbins, P. S., Crocker, R. L., Nojima, S., Morris, B. D., Roelofs, W. L. and Villani, M. G. 2003. Methyl 2-(methylthio) benzoate: the unique sulfur-containing sex pheromone of *Phyllophaga crinita*. *Naturwissenschaften*, 90: 517–520.
- Rodríguez, R. and Redman, R. 2007. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, 5: 1109-1114.
- Rojas-Jiménez, K. and Hernández, M. 2015. Isolation of Fungi and Bacteria Associated with the Guts of Tropical Wood-Feeding Coleoptera and Determination of Their Lignocellulolytic Activities. *International Journal of Microbiology*, ID 285018.
- Romero-López, A.A. 2003. Ecología química del escarabajo *Phyllophaga obsoleta* (Coleoptera: Melolonthidae). Tesis de Maestría en Ciencias en desarrollo de productos bióticos. Instituto Politécnico Nacional, México. pp. 1-22.
- Romero-López, A. A., Aragón, A. y Arzuffi, R. 2007. Estudio comparativo del comportamiento sexual de cuatro especies de *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae). En: Estrada, E.G., Equihua, A., Luna, C. y Rosas-Acevedo, J.L. (Eds.). *Entomología mexicana*, Vol. 6. Publicación especial de la Sociedad Mexicana de Entomología México. pp. 275-281.
- Romero-López, A. A., Arzuffi, R. y Morón, M. A. 2010a. Comunicación química sexual. En: Rodríguez del Bosque, L.A. y Morón, M.A. (Eds.). *Plagas del suelo*. Editorial Mundi-Prensa, México. pp. 83-96.
- Romero-López, A. A., Martínez, I. and Morón, M. A. 2010b. Morphology of the genital chamber and accessory glands of *Phyllophaga opaca* Moser (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae) females. *World Journal of Zoology*, 5: 210-216.
- Romero-López, A. A., Morón, M. A. and Valdez, J. 2010c. Sexual dimorphism in antennal receptors of *Phyllophaga ravida* Blanchard (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae). *Neotropical Entomology*, 39(6): 957-966.
- Romero-López, A.A., Arzuffi, R., Valdez, J., Sánchez-Espíndola, E. and Morón M. A. 2011. Tissues involved in sex pheromone production in *Phyllophaga obsoleta* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 104(5): 960-965.
- Rosas-García, N. M., Durán-Martínez, E., Luna-Santillana, E. y Villegas-Mendoza, J. M. 2009. Potencial de depredación de *Cryptolaemus montrouzieri* (Mulsant) hacia *Planococcus citri* (Risso). *Southwestern entomologist*, 34(2):179-188.
- Sung, S., Marshall, C., Mchugh, J. and Blackwell, M. 2003. Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose-fermenting gut yeast. *Molecular Ecology*, 12. 3137-3145.
- Salas, J. 1984. Parasitismo natural de huevo de *Antitenchus tripterus* (Hemiptera: pentatomidae) por *Phonuropsis semiflorientris* (Hymenoptera: Scleronidae) con observaciones etiológicas del parasito y el huésped. *Agronomía Tropical*, 34 (1-3), 7-13.
- Tada, S. and Leal, W. S. 1996. Localization and morphology of sex pheromone glands in scarab beetles. *Journal of Chemical Ecology*, 23: 903-915.
- Tierno de Figueroa, J. M. 2000. Biología reproductora de algunos insectos acuáticos. *Bol. S.E.A.* 27:121-125.
- Tillman, J.A., Seybold, S.J. Jurenka, R.A. and Blomquist, G.J. 1999. Insect pheromones - an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 481-514.

- Vallejos-Lagos, E. F. 2013. Prospección de parásitos y comensales asociados a insectos adultos en *Bombus* spp. (Hymenoptera: Apidae) en Valdivia. Tesis de ingeniería. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. pp. 3-7.
- Warren, R. 1996. Microbial Hydrolysis of polysaccharides. *Annual Reviews of Microbiology*, 50: 183-212.
- Wood, W.F. 1983. Chemical ecology: chemical communication in nature. *Journal of Chemical Education*, 60(7): 531-539.
- Zamotailov, A. S. 1988. (Sobre los atrayentes y el comportamiento sexual de los Scarabaeidae). *Vestnik Zoologii*, 6: 61-64.

Anexo I

Reactivos utilizados

- Medio LB-agar: 5 gr de extracto de levadura, 10 gr de triptona, 10 gr de NaCl y 15 gr. de agar bacteriológico en 1000 ml de agua destilada.
- Ringer: 0.5 gr de cloruro de sodio, 0.25 gr de cloruro de potasio, 0.3 gr de cloruro de calcio y 0.2 gr de bicarbonato de sodio en 1000 ml de agua destilada.
- Solución de Negro de clorazol: 1 gr de negro de clorazol en 100 ml de alcohol al 70%.



Anexo 2

Instrucciones API 20E (Biomérieux):

- Abrir una ampolleta de API NaCl 0.85% Medium (5 ml) o una API Suspension Medium (5 ml).
- Con una pipeta extraer una colonia bien aislada sobre medio agar. Utilizar preferentemente cultivos “jóvenes” (18-24 h).
- Realizar la suspensión bacteriana homogeneizando cuidadosamente las bacterias en el medio. Esta suspensión debe ser utilizada inmediatamente después de su preparación.
- Introducir la suspensión bacteriana en los tubos de la galería con la ayuda de la misma pipeta.
- Para las pruebas CIT, VP y GEL llenar el tubo y la cúpula. Para las pruebas ADH, LDC, ODC, H₂S y URE llenar la cúpula con aceite de parafina.
- Cerrar la cámara de incubación e incubar a 36°C durante 18-24 h.