



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN FITOSANIDAD-ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA

**IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y
MOLECULAR DEL GÉNERO *Phyllophaga*
(COLEOPTERA: MELOLONTHIDAE) EN LA
ZONA DE ABASTO DEL INGENIO EMILIANO
ZAPATA, MORELOS**

MÓNICA ZARAGOZA ORTEGA

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

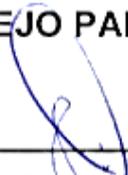
2016

LA PRESENTE TESIS TITULADA: “IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DEL GÉNERO *Phyllophaga* (COLEOPTERA: MELOLONTHIDAE) EN LA ZONA DE ABASTO DEL INGENIO EMILIANO ZAPATA, MORELOS” REALIZADA POR LA ALUMNA MÓNICA ZARAGOZA ORTEGA, BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR INDICADO, HA SIDO APROBADA POR EL MISMO Y ACEPTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
ENTOMOLOGÍA Y ACAROLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DRA. OBDULIA LOURDES SEGURA LEÓN

ASESOR



M. C. JULIAN HERNÁNDEZ CRUZ

ASESOR



M. C. JORGE MANUEL VALDEZ CARRASCO

ASESOR



DR. SAÚL SÁNCHEZ SOTO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Enero de 2016

RESUMEN

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DEL GÉNERO *Phyllophaga* (COLEOPTERA: MELOLONTHIDAE) EN LA ZONA DE ABASTO DEL INGENIO EMILIANO ZAPATA, MORELOS

Zaragoza Ortega Mónica

Colegio de Postgraduados, 2016

Con la finalidad de establecer alternativas de manejo del complejo de gallina ciega en la zona de abasto del Ingenio Emiliano Zapata, Morelos, México, se propuso realizar la identificación taxonómica de adultos del género *Phyllophaga*, así como generar una clave dicotómica ilustrada para la identificación de las especies de este género en la zona, que sea la base para la identificación molecular de éstas especies, con los genes COI y Cyt B de la mitocondria. Finalmente se propuso saber si el atrayente sexual Methyl 2-(methylthio)-benzoate (F) y luz led (L), de manera individual y en combinación, tienen capacidad de atracción a algunas de las especies del género *Phyllophaga* en la zona. Se realizaron colectas de adultos en el periodo marzo-julio 2013 - 2015, a través de trampas tipo embudo con luz blanca, colectas manuales, F y L, con base en cada uno de los objetivos. Las especies identificadas morfológicamente pertenecen a cuatro subgéneros, siete grupos y diez especies, que corresponden a: *Phyllophaga riverana* Morón, *P. rzedowskiana* Aragón y Morón, *P. hoogstraali* Saylor, *P. batillifer* (Bates), *P. porodera* (Bates), *P. fulviventris* (Moser), *P. martinezpalcios* Morón, *P. ilhuicaminai* Morón, *P. lenis* (Horn) y *P. brevidens* (Bates), para cuya identificación se elaboró una clave dicotómica ilustrada. La caracterización molecular con los genes COI y Cyt B, se realizó para siete de las diez especies identificadas morfológicamente. La reconstrucción filogenética del Citocromo B (Cyt B) soporta la filogenia morfológica a nivel de género y subgénero, no así el gen Citocromo Oxidasa I (COI).

Finalmente, *P. brevidens* y *P. lenis*, respondieron a la combinación de F+L, la primera fue la más abundante con 271 y la segunda con 55 ejemplares. Sin embargo, difieren a las especies del género *Phyllophaga* señaladas por otros autores. Los resultados señalan que la combinación F+L puede ser un método selectivo para el manejo de estas especies de importancia agrícola.

Palabras clave: caña de azúcar, clave dicotómica, gallina ciega, atrayente sexual

ABSTRACT

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF *PHYLLOPHAGA* (COLEOPTERA: MELOLONTHIDAE) GENDER AT THE SUPPLY AREA OF THE EMILIANO ZAPATA SUGARMILL, MORELOS, MEXICO

Zaragoza Ortega Mónica

Postgraduate College, 2016

In order to establish alternative management of the grub worm at the supply area of the Emiliano Zapata sugarmill located in Morelos, Mexico, it was proposed to carry out the taxonomic identification of adults of the *Phyllophaga* gender, as well as to generate an illustrated dichotomous key for identification of species of this genus in the area, which could be the basis for the molecular identification of these species, with the COI and Cyt B genes of the mitochondria. Additionally, it was proposed to analyze if Methyl 2-(methylthio)-benzoate (F) (sexual attractant) and/ or led light (L), alone or combined, were able to attract some of the *Phyllophaga* species in the area. Adult collections were made in the March-July 2013- 2015 time frame, through funnel traps with white light, manual collections, F and L, based on each of the goals. Morphologically identified species belong to four subgenera, seven groups and ten species, corresponding to: *Phyllophaga riverana* Moron, *P. rzedowskiana* Aragon and Moron, *P. hoogstraali* Saylor, *P. batillifer* (Bates), *P. porodera* (Bates), *P. fulviventris* (Moser), *P. martinezpalaciosi* Moron, *P. ilhuicaminai* Moron, *P. lenis* (Horn) and *P. brevidens* (Bates), for whose identification an illustrated dichotomous key was developed. The molecular characterization with COI and Cyt B genes, was done for seven of the ten species morphologically identified, phylogenetic reconstruction of the cytochrome b (Cyt B) supports the morphological phylogeny to genus and subgenus levels, on the contrary with the Cytochrome Oxidase I (COI) gene.

Lastly, *P. brevidens* and *P. lenis*, responded to the F + L combination, the first was the most abundant with 271 and the second with 55 specimens. However, these results differ to the species of the *Phyllophaga* genus reported by other authors. The results showed that the F + L combination can be a selective method for the management of these species of agricultural importance.

Keywords: sugarcane, dichotomous key, grub worm, sexual attractant

AGRADECIMIENTOS

Al **Colegio de Postgraduados** especialmente al programa de Entomología y Acarología por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de postgrado.

A la Línea Prioritaria de Investigación 5. Biotecnología microbiana, vegetal y animal. 2014. Proyecto Plagas de caña de azúcar, por el apoyo económico otorgado en el año 2014.

Agradezco a la **Dra. Obdulia Lourdes Segura León**, directora de tesis, por el gran apoyo, constancia y tiempo dedicado al trabajo de tesis, por compartir sus conocimientos y experiencias en la biología molecular y en especial por su valiosa amistad.

Al **M. C. Julián Hernández Cruz**, por su valioso apoyo en la determinación de las especies de *Phyllophaga*, por su interés y constancia en el desarrollo de la tesis y sobre todo por compartirme sus conocimientos.

Al **Mc. Jorge Manuel Valdez Carrasco**, por el esfuerzo, paciencia, dedicación y sugerencias en el trabajo fotográfico.

Al **Dr. Miguel Ángel Morón Ríos** por su valiosa participación en la corroboración de las especies.

Al **Dr. Saúl Sánchez Soto**, por su apoyo y asesoría en la revisión de la tesis.

Al **Dr. Juan Cibrián Tovar**, por facilitar parte del material para el establecimiento del experimento sobre atrayentes en campo.

Al **Dr. José A. Sánchez G.** por las facilidades otorgadas en la Colección Entomológica del CIIDIR Oaxaca para la determinación de los especímenes de *Phyllophaga*.

Agradezco la ayuda del **Dr. Sergio Ramírez Rojas** (Inifap-Zacatepec), **Ing. Alejandro Palacios** y el **Sr. Armando Ramos Gómez**, por sus aportaciones con los especímenes colectados.

A todos aquellos profesores que formaron parte de mi formación académica y a todo el personal que me brindó su apoyo en servicios y trámites.

DEDICATORIA

A mis hijas, **Atziri** y **Sofía** porque sus llegadas han sido los mejores momentos de mi vida, son mi motivación para salir adelante, progresar y culminar con éxito cada una de las metas que me propongo.

A mi compañero de vida, **Asael Edem de la Rosa Zariñana** por tu amor, paciencia y apoyo en todo momento.

Con infinito amor y cariño a mis padres **Juana Ortega Olmedo** y **Prisciliano Zaragoza Espejel** por su invaluable apoyo, amor, comprensión y enseñanzas en todo momento de mi vida. Los amo.

A mis herma@s **Javier, Adela, Federico** y **Ma. Del Carmen** por su cariño, consejos y estar en todo momento a mi lado.

A mis cuñad@s por formar parte de nuestra gran familia.

A mis sobrinos con amor.

A la familia **De la Rosa Zariñana** por aceptarme y quererme como a otra hija y hermana. Gracias por todo el apoyo que me han brindado.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA	vi
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
Introducción general	1
Objetivos e hipótesis.....	3
Objetivo General.....	3
Objetivos Particulares.....	3
Hipótesis	3
Referencias citadas	4
CAPÍTULO I. <i>Phyllophaga</i> (COLEOPTERA: MELOLONTHIDAE) EN LA ZONA CAÑERA DE MORELOS, MÉXICO	6
Resumen.	6
1.1 Introducción	6
1.2 Materiales y Métodos	7
1.2.1 Área de estudio.....	7
1.2.2. Colecta e identificación.	8
1.3 Resultados y Discusión	8
1.3.1 Diagnósis de los grupos de especies representados en el área de estudio (<i>sensu lato</i>) Morón (1986):	10
1.3.2 Clave para separar los machos del género <i>Phyllophaga</i> de la zona cañera de Morelos, México	15
1.4 Referencias citadas.....	18
CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES COI Y Cyt B DE LA MITOCONDRIA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE <i>Phyllophaga</i> (COLEOPTERA: MELOLONTHIDAE) DE MORELOS, MÉXICO	25
Resumen.	25
2.1 Introducción	25
2.2 Materiales y Métodos	26
2.2.1 Características del área de estudio.....	26
2.2.2 Identificación taxonómica.....	27
2.2.3 Extracción de ADN genómico.	27

2.2.4 Amplificación de los genes COI y Cyt B	27
2.2.5 Análisis de secuencias	28
2.3. Resultados y Discusión	29
2.3.1 Identificación taxonómica.....	29
2.3.2 Estudio molecular.....	29
2.4 Referencias Citadas.....	35
CAPÍTULO III. CAPTURA DE ESPECIES DE <i>Phyllophaga</i> (COLEOPTERA: MELOLONTHIDAE) CON METHYL 2-(METHYLTHIO)-BENZOATE Y LUZ EN EL CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR, MORELOS, MÉXICO	38
Resumen.....	38
3.1 Introducción	38
3.2 Material y Métodos	39
3.2.1 Características del área de estudio.....	39
3.2.2 Tratamientos.....	40
3.3 Resultados y Discusión	41
3.4 Referencias citadas.....	45
Conclusiones generales.....	50

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. <i>Phyllophaga</i> (<i>sensu lato</i>) colectados en la zona cañera de Morelos, México.....	10
Cuadro 2. Localización del área de estudio.....	27
Cuadro 3. Análisis de varianza entre tratamientos de capturas de <i>Phyllophaga</i> en los periodos de muestreo (marzo-julio 2014, 2015), en Tlaltizapán, Morelos.....	42

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *P. riverana* macho, A) vista dorsal, B) vista lateral, C) vista lateral de la uña protarsal, D) vista lateral de la genitalia, E) vista dorsal de la genitalia, F) aspecto distal de los parámetros.....20
- Figura 2.** *P. rzedowskiana* macho, A) vista dorsal, B) vista lateral, C) vista lateral de la uña protarsal, D) vista lateral de la genitalia, E) vista dorsal de la genitalia, F) aspecto distal de los parámetros.....20
- Figura 3.** *P. hoogstraali* macho, A) vista dorsal, B) vista lateral, C) vista lateral de la uña protarsal, D) vista lateral de la genitalia, E) vista dorsal de la genitalia, F) aspecto distal de los parámetros.21
- Figura 4.** *P. batillifer* macho, A) vista dorsal, B) vista lateral, C) vista lateral de la uña protarsal, D) vista lateral de la genitalia, E) vista dorsal de la genitalia, F) aspecto distal de los parámetros.21
- Figura 5.** *P. porodera* macho, A) vista dorsal, B) vista lateral, C) vista lateral de la uña protarsal, D) vista lateral de la genitalia, E) vista dorsal de la genitalia, F) aspecto distal de los parámetros.22
- Figura 6.** *P. fulviventris* macho, A) vista dorsal, B) vista lateral, C) vista lateral de la uña protarsal, D) vista lateral de la uña mesotarsal, E) vista lateral de la genitalia, F) vista dorsal de la genitalia, G) aspecto distal de los parámetros.22
- Figura 7.** *P. martinezpalaciosi* macho, A) vista dorsal, B) vista lateral, C) vista lateral de la uña protarsal, D) vista lateral de la genitalia, E) vista dorsal de la genitalia, F) aspecto distal de los parámetros.23
- Figura 8.** *P. ilhuicaminai* macho, A) vista dorsal, B) vista lateral, C) vista lateral de la uña protarsal, D) vista lateral de la genitalia, E) vista dorsal de la genitalia, F) aspecto distal de los parámetros.....23
- Figura 9.** *P. lenis* macho, A) vista dorsal, B) vista lateral, B) vista lateral de la uña protarsal, D) vista lateral de la genitalia, E) vista dorsal de la genitalia, F) aspecto distal de los parámetros.24

Figura 10. <i>P. brevidens</i> macho, A) vista dorsal, B) vista lateral, C) vista lateral de la uña protarsal, D) vista lateral de la genitalia, E) vista dorsal de la genitalia, F) aspecto distal de los parámetros.	24
Figura 11. Reconstrucción filogenética de <i>Phyllophaga</i> de la región Citocromo Oxidasa I (COI) (nucleótidos), con el método de Máxima verosimilitud, modelo General Tiempo Reversible, distribución gama y sitios invariables (GTR+ G+ I) y 500 repeticiones de Bootstrap. Árbol construido con raíz. Literal S=subgénero, G=grupo.....	31
Figura 12. Reconstrucción filogenética de <i>Phyllophaga</i> de la región Citocromo Oxidasa I (COI) (aminoácidos), con el método de Máxima verosimilitud, modelo Jones Taylor Thornton y distribución gama (JTT + G) y 500 repeticiones de Bootstrap. Árbol construido con raíz. Literal S=subgénero, G=grupo.....	32
Figura 13. Reconstrucción filogenética de <i>Phyllophaga</i> de la región Cyt B (nucleótidos), con el método de Máxima verosimilitud, modelo General Tiempo Reversible y distribución gama (GTR + G) y 500 repeticiones de Bootstrap. Árbol construido con raíz. Literal S=subgénero, G=grupo.....	33
Figura 14. Reconstrucción filogenética de <i>Phyllophaga</i> de la región Cyt B (aminoácidos), con el método de Máxima verosimilitud, modelo Hasegawa Kishino Yano y sitios invariables (HKY+I) y 500 repeticiones de Bootstrap. Árbol construido con raíz. Literal S=subgénero, G=grupo.....	34
Figura 15. Sistema para la captura de <i>Phyllophaga</i> F+L..	40
Figura 16. Capturas totales de <i>Phyllophaga</i> (<i>sensu lato</i>) por tratamiento en Tlaltizapan, Morelos. Morelos.....	41
Figura 17. Capturas totales de <i>Phyllophaga</i> por especie, sexo y tratamiento en Tlaltizapan, Morelos.....	42

Introducción general

La agroindustria azucarera es una de las principales actividades en la economía de México; su importancia radica en la superficie sembrada e impacto socioeconómico a nivel local y nacional. La superficie sembrada de caña de azúcar en México es de 828,609 hectáreas (SIAP, 2014), para abastecer a 58 ingenios, los que representan el séptimo lugar en consumo y producción a nivel mundial. Los principales estados productores con ingenios azucareros a nivel nacional son: Veracruz (22), Jalisco (6), San Luis Potosí (4), Tamaulipas (2), Oaxaca (4), Nayarit (2), Sinaloa (3), Tabasco (3), Chiapas (2), Quintana Roo (1), Michoacán (3), Morelos (2) Puebla (2), Campeche (1) y Colima (1) (CNIAA, 2015). Morelos es uno de los estados con menor superficie sembrada, sin embargo, es uno de los que tiene los mejores rendimientos por hectárea (SAGARPA, 2007; SIAP, 2014).

El cultivo de caña en diferentes regiones de México se ve afectado por diferentes problemas fitosanitarios; uno de ellos es la presencia de larvas de varias familias de coleópteros, que causan daños al cultivo y que se han catalogado como plagas de importancia económica, entre ellos los géneros *Phyllophaga* Harris, *Cyclocephala* Latreille, *Paranomala* Casey, *Dyscinetus* Harold, *Euetheola* Bates, *Macroductylus* Dejean y *Ligyryus* Burmeister, conocidos en su mayoría como gallinas ciegas o nixticuiles (Flores, 1994).

Los reportes de daños más severos ocasionados por gallinas ciegas se citan para las zonas productoras de maíz y caña de azúcar. En Tamaulipas se reportan pérdidas que alcanzan el 48% de la producción de maíz (Villalobos, 1998) y en Morelos se reportaron pérdidas equivalentes al 32% para el mismo cultivo (Villalobos *et al.* 2001; Núñez-Valdez *et al.* 2002).

Rodríguez del Bosque y Morón (2011) mencionan que, dependiendo de la especie de gallina ciega, el ciclo de vida dura de 8 a 16 meses; sin embargo, en algunos casos puede llegar hasta 24. Las larvas permanecen en el suelo, especialmente en los primeros 30 cm de profundidad, alimentándose de las raíces. Los daños se manifiestan con mayor intensidad en los meses de agosto a octubre, cuando las larvas se encuentran en el tercer ínstar que es el más voraz. Los adultos emergen de sus cápsulas y aparecen en los campos de cultivo en el período de abril

a junio, que coincide con el inicio y establecimiento de la época lluviosa en Centro América (Macz *et al.* 2000).

Los adultos, salen en forma masiva a copular y ponen huevos en grupos de 10 a 14 huevos en el suelo a profundidad de 2 a 10 cm. Cada hembra tiene potencial de poner hasta 200 huevos, y en estado adulto ambos, el macho y la hembra, pueden vivir hasta dos meses, cabe señalar que son fuertemente atraídos por la luz artificial, característica que se aprovecha para su captura.

La intensidad del daño depende del número de larvas presentes en la cepa de caña. Cuando se producen infestaciones severas se observan cepas sin raíces, se reduce la capacidad de absorción de agua, minerales y nutrimentos, lo que retarda el crecimiento y limita la producción. El daño en las cepas es la pérdida de anclaje, en consecuencia una disminución en las poblaciones de tallos de caña en la soca o rebrote (ASOCAÑA, 1994). Además, las heridas que ocasiona facilitan el ingreso de agentes infecciosos como bacterias, hongos y nematodos.

Por otro lado la identificación precisa de las especies del complejo *Phyllophaga* (*sensu lato*) es compleja y se basa en características morfológicas exteriores de los adultos y específicamente de la genitalia de los machos (Luginbill y Painter, 1953) realizada por taxónomos especialistas en el grupo, características que limitan la identificación práctica de estas especies, para la implementación de medidas fitosanitarias. Por lo anterior el uso de fragmentos del genoma constituyen una herramienta valiosa en la identificación de individuos y ha sido ampliamente aplicada para el estudio de las relaciones filogenéticas de organismos (Baker *et al.*, 1996; Teletchea *et al.* 2008). Hebert *et al.* (2003) señala que la región del código de barras, del gen citocromo oxidasa subunidad I (COI) constituye un instrumento útil para un sistema de bio-identificación global y ha sido utilizado por Doskoncil *et al.* (2008) para la identificación de adultos y larvas de diversas especies de *Phyllophaga* en Estados Unidos. Otro gen mitocondrial que se ha utilizado como marcador molecular y para análisis filogenéticos en coleópteros es el gen Citocromo B (Cyt B), debido a la variabilidad que exhibe a diferentes niveles taxonómicos (Irwin *et al.* 1991). Por lo antes expuesto, a continuación se detallan los objetivos e hipótesis del presente trabajo.

Objetivos e hipótesis

Objetivo General

- Determinar y caracterizar morfológica y molecularmente las especies del género *Phyllophaga* (*sensu lato*) en la zona de abasto del ingenio Emiliano Zapata, Morelos.

Objetivos Particulares

- Generar una clave dicotómica ilustrada de adultos machos de las especies del género *Phyllophaga*.
- Caracterizar los genes COI y Cyt B de las especies de *Phyllophaga* determinadas morfológicamente.
- Evaluar el atrayente sexual Methyl 2-(methylthio)-benzoate y luz led generada por una celda solar de manera independiente y en combinación para la captura de especies del género *Phyllophaga* en el cultivo caña de azúcar.

Hipótesis

a) El género *Phyllophaga* en la zona de abasto del Ingenio Emiliano Zapata, Morelos está compuesto por más de una especie.

b) Los genes COI y Cyt B de la mitocondria permitirán una clara diferenciación entre las especies de *Phyllophaga*.

C) El compuesto Methyl 2-(methylthio) benzoate, en combinación con luz led generada por una celda solar, tiene la capacidad de capturar adultos del género *Phyllophaga* en el cultivo de caña de azúcar.

Referencias citadas

- ASOCAÑA. 1994. Aspectos generales del sector azucarero. Sáenz editores Ltda. Santiago de Cali, Colombia. 56p.
- Baker, C.S., Cipriano, F., Palumbi, S. R. 1996. Molecular Genetic Identification Of Whale and Dolphin Products from Commercial Markets in Korea and Japan. *Molecular Ecology* 5(5):671-685.
- CNIAA. 2015. Cámara Nacional de las Industrias Azucareras y Alcoholicas Consultado en mayo 2015, en línea <http://www.camaraazucarera.org.mx/>
- Doskoncil, J. P., N. R. Walker, G. E. Bell, S. M. Marek, J. A. Reinert, and T. A. Royer. 2008. Species Composition and Seasonal Occurrence of *Phyllophaga* (Coleoptera: Scarabaeidae) Infesting Intensely Managed Bermudagrass in Oklahoma. *J. Econ. Entomol.* 101(5): 1624-1632
- Emerson, B. C., and G. P. Wallis. 1995. Phylogenetic relationships of the *Prodontria* (Coleoptera; Scarabaeidae; subfamily Melolonthinae), derived from sequence variation in the mitochondrial cytochrome oxidase II gene. *Mol. Phylogenet. Evol.* 4 (4):433-447
- Flores, C. S. 1994. Las plagas de la caña de azúcar en México. Editorial. México. 350p.
- Hebert, P. D. N, A. Cywinska, S. L. Ball, J. R. Dewaard. 2003, Biological Identifications through DNA Barcodes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 270(1512):313-321.
- Irwin D.M., T. D. Kocher, A. C, Wilson. 1991. Evolution of the cytochrome b gene in mammals. *J. Mol. Evo.* 32: 128-144.
- Luginbill, P., Sr., and H. R. Painter. 1953. Maybeetles of the United States and Canada. U.S. Dep. Agric. Washington, DC. Tech. Bull. No. 1060. Washington, DC.
- Macz, L.; Salguero, V.; Hidalgo, H.; Márquez, J. 2000. Fluctuación poblacional y distribución vertical de especies de chinche hedionda, gallina ciega y gusano alambre, en caña de azúcar. En: Memoria, Presentación de Resultados de Investigación Zafra 1999-2000. CENGICAÑA, Guatemala. pp 86-92.

Núñez-Valdez. M. E., A. Romero, R. Arzuffi, A. L. Llanos, M. E. Valdés, R. Figueroa y F. J. Villalobos. 2002. Agrobiotecnología aplicada al manejo integrado de plagas subterráneas: un enfoque promisorio para el manejo de la gallina ciega (Coleoptera: Scarabaeidae) y el picudo negro del nardo y agave (Coleoptera: Curculionidae). En Aragón, A. y J. F. López-Olguín (Eds). Métodos para la generación de tecnología de punta.

Rodríguez del Bosque, L. A., y M. A. Morón. 2011. Plagas del suelo. Mundi Prensa. México D. F. 416 p. ISBN-078-100-07-769906-04

SAGARPA. 2007. Programa Nacional De La Caña de Azúcar. 2007-2012.

SIAP. 2014. Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera. Morelos. Consultado en julio 2014, en línea <http://www.siap.gob.mx/>

Teletchea, F. J. Bernillon, M. Duffraisie, V. Laudet, C. Hänni. 2008. Molecular Identification of Vertebrate Species by Oligonucleotide Microarray in Food and Forensic Samples. J. Appl .Ecol. 45 (3): 967-975.

Villalobos, F. J. 1998. Bioecology and sustainable management of white grubs (Coleoptera: Melolonthidae) pest of corn in el Cielo biosphere reserve, Tamaulipas, México. In. M. A. Morón y A. Aragón (eds). Avances en el estudio de la diversidad, Importancia y Manejo de los Coleópteros Edafícolas Americanos. Pub. Esp. de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y la Sociedad Mexicana de Entomología. Puebla. México. pp 173-184

Villalobos, F. J., A. Romero-López, M. E. Núñez-Valdez. 2001. Diagnóstico del problema causado por gallina ciega en cultivos de maíz del Estado de Morelos. En Memorias del 1er Simposium de Manejo Integrado de Plagas del Estado de Morelos. UAEM, Morelos, México. 27 p.

CAPÍTULO I. *Phyllophaga* (COLEOPTERA: MELOLONTHIDAE) EN LA ZONA CAÑERA DE MORELOS, MÉXICO

Resumen. La identificación precisa del complejo gallina ciega es complicada y no se cuenta con claves dicotómicas de las especies presentes en la zona de producción de caña de azúcar que permita una rápida identificación. Por lo que se propuso elaborar una clave dicotómica ilustrada de machos con los caracteres diagnósticos de las especies de *Phyllophaga* presentes en Morelos. Se realizaron colectas con trampas tipo embudo con luz blanca dentro del cultivo de caña de azúcar y capturas manuales en zonas aledañas, en el periodo marzo 2013 a julio 2015. La separación a subgéneros, grupos y complejos de especies fue principalmente con base en las características de las mesotibias, uñas, cobertura setífera y segmentos antenales, en tanto que la morfología de la genitalia permitió la separación de especies. De cada especie se realizó una lámina con las fotografías de los caracteres diagnósticos. Finalmente, se elaboró una clave dicotómica ilustrada para los machos del género *Phyllophaga* encontrados en la zona.

1.1 Introducción

La producción de caña de azúcar en diferentes regiones en México se ve afectada por diversos insectos, entre ellos las larvas de los coleópteros de los géneros *Phyllophaga* Harris, *Cyclocephala* Latreille, *Paranomala* Casey, *Dyscinetus* Harold, *Euetheola* Bates, *Macroductylus* Dejean y *Ligyris* Burmeister, la mayoría conocidos como gallinas ciegas o nixticuiles (Flores, 1994). En Morelos se han citado a *Phyllophaga obsoleta* (Blanchard), *P. brevidens* (Bates), *P. vetula* (Horn), *P. setifera* (Burmeister), *P. pruinosa* (Blanchard), *P. lenis* (Horn), *P. ravidata* (Blanchard), *P. fulviventris* (Moser) y *P. ilhuicaminai* Morón, como plagas potenciales para la caña de azúcar y el maíz (Rodríguez del Bosque y Morón, 2011). En 1998, 20,451 ha de varias localidades del estado de Morelos sufrieron pérdidas equivalentes al 32% del grano de maíz y se estimó que en todo el estado se perdieron casi 32 mil toneladas del cereal, valoradas en 57 millones de pesos a causa de la gallina ciega (Villalobos *et al.* 2001; Núñez-Valdez *et al.* 2002). Sin embargo, son pocos los estudios que se han realizado para conocer aspectos básicos como la identidad, importancia económica y biología de las especies asociadas al cultivo de caña de azúcar, debido

principalmente a que los estados inmaduros, quienes causan los daños a plantas, socas y resocas, tienen una distribución heterogénea, ciclos de vida anuales o bianuales (Flores, 1994; Riees y Flores, 1976; Rodríguez del Bosque y Morón, 2011) y a que en muchos de los casos los productores no relacionan los inmaduros con los adultos, desconociendo el impacto económico de estos insectos en la producción y considerando así a las gallinas ciegas como plagas secundarias. Por otro lado, la separación de especies en estados larvarios es complicada por la falta de caracteres morfológicos distintivos, por lo que la identificación se basa principalmente en la taxonomía de machos.

Grandes son los esfuerzos que se han hecho para describir la diversidad del género *Phyllophaga* (*sensu lato*), los estudios taxonómicos y faunísticos sobre este grupo en el estado de Morelos están documentados por Deloya (1993), Deloya *et al.* (1988, 1993, 1995), Deloya y Morón (1994, 1998), Moron *et al.* (1977), Aragón y Morón (2003), Morón (2004), y Rodríguez del Bosque y Morón (2011) en los que principalmente se describen los taxa; sin embargo, la información está fragmentada y no hay claves ilustradas que permitan una clara y precisa identificación taxonómica del género para el estado, que sea la base para la identificación molecular, que más adelante apoyen la identificación de larvas presentes en las raíces de caña de azúcar, para el desarrollo de estrategias de manejo en el cultivo. Por lo anterior y considerando que la identificación de las especies constituye el primer paso en los programas de manejo integrado de plagas (Norris *et al.* 2003), el presente trabajo tuvo como objetivo identificar y describir la morfología por grupos del género *Phyllophaga* y generar una clave dicotómica ilustrada de los machos adultos para el estado de Morelos, México.

1.2 Materiales y Métodos

1.2.1 Área de estudio.

La investigación se realizó en cuatro municipios del estado de Morelos: Tlaltizapan, Tlaquiltenango, Jojutla y Xochitepec pertenecientes a la zona cañera de Morelos, situados en la provincia fisiográfica de la Sierra Madre del sur y la depresión del Balsas, con temperatura media anual de 24 °C y promedio de precipitación anual de 917 mm.

1.2.2. Colecta e identificación.

La captura de adultos de *Phyllophaga* se realizó con trampas tipo embudo con luz blanca (16 w) y colectas manuales durante los meses de lluvias que variaron entre mayo y septiembre de 2013-2015.

Los machos de *Phyllophaga* se seleccionaron con base en el tipo de uñas, tamaño y coloración. Los ejemplares con diferentes patrones de variación se montaron junto con su genitalia con la metodología de Morón y Terrón (1988). Se capturaron las imágenes de cada especie y de sus caracteres diagnósticos, con un microscopio Tessoovar de Carl Zeiss® con cámara digital para microscopía PAXcam 3®. Las imágenes fueron procesadas en el editor de imágenes GIMP versión 2.8.14. Para la identificación se utilizaron los criterios descritos por Morón (1986, 2004). Se realizó la diagnosis de los grupos identificados y se elaboró una clave dicotómica ilustrada para separar las especies.

1.3 Resultados y Discusión

Se obtuvieron 1,066 adultos machos del género *Phyllophaga* representantes de cuatro subgéneros: *Phyllophaga*, *Chlaenobia*, *Phytalus* y *Listrochelus*, (*s. str.*), más *P. ilhuicaminai* Morón, especie considerada como *incerta sedis*, lo que señala que la taxonomía del grupo es complicada. El subgénero *Phyllophaga* tuvo la mayor representación con tres grupos de especies: *anodentata*, *porodera* y *ravida*, cinco especies *P. lenis* (Horn), *P. brevidens* (Bates), *P. porodera* (Bates), *P. fulviventris* (Moser) y *P. martinezpalaciosi* Morón, seguida de éstas el subgénero *Chlaenobia*, grupo *vexata*, especie *P. rzedowskiana* (Aragón y Morón). El subgénero *Phytalus* con dos grupos *pruinosa* y *macrocera* y dos especies *P. hoogstraali* Saylor y *P. batillifer* (Bates), y finalmente el subgénero *Listrochelus*, con el grupo *cavata*, especie *P. riverana* Morón (Cuadro 1).

Entre las especies capturadas, las más abundantes fueron *P. lenis*, *P. rzedowskiana*, y *P. brevidens* que representan el 84.4% de la colecta. *P. lenis* tiene amplia distribución en los estados de la región occidental, centro y sureste del país, *P. brevidens* se encuentra en el norte y centro de México y *P. rzedowskiana* representa un endemismo de la región. Las otras especies con menor presencia se han reportado para la zona norte y centro de México (Morón, *et al.* 1997).

Las colectas de adultos de gallina ciega en la zona cañera de Morelos, México durante los tres años, señalan la presencia de un complejo de diez especies del género *Phyllophaga*, las cuales coinciden con el 50% de las especies reportadas para el estado por Deloya *et al.* 1988, 1993, 1995, Deloya y Morón (1994, 1998), Morón *et al.* 1977, Aragón y Morón (2003, 2004), Rodríguez del Bosque y Morón (2011) en estudios de diversidad. Con base en estos resultados se evidencia la diversidad de especies del género *Phyllophaga*, aunque ésta es menor que la que se presenta en el estado de Morelos.

Por otro lado, la clave dicotómica y las ilustraciones de los caracteres diagnósticos son una herramienta práctica para la identificación precisa de estas especies. Es posible que muchos de los ejemplares capturados con la trampa de luz no se desarrollaran en terrenos cultivados con caña de azúcar, ya que el radio de atracción de este tipo de trampas es extenso, y puede incluir terrenos con otro tipo de cultivos o parcelas con vegetación silvestre. Sin embargo, este tipo de investigación básica permite una correcta identificación de los adultos de la zona, facilitando el diagnóstico de posibles especies plaga, como base para la correcta identificación molecular, y son el fundamento de estudios posteriores de biología, donde es indispensable ubicar perfectamente a las especies. Por ello, se sugiere realizar estudios especialmente con las especies más abundantes para determinar si sus larvas son las más numerosas en suelos cañeros, cuáles son sus plantas hospederas, profundidad a la que se encuentran de acuerdo con el tipo de suelo y época del año, y duración de su ciclo de vida, ya que esta información es importante para establecer estrategias de control (Flores, 1994).

Cuadro 1. *Phyllophaga* (*sensu lato*) colectados en la zona cañera de Morelos, México.

Género	Subgénero	Grupo	Especie	Ejemplares
<i>Phyllophaga</i>	<i>Phyllophaga</i>	“anodentata”	<i>P. lenis</i>	317
		“anodentata”	<i>P. brevidens</i>	175
		“porodera”	<i>P. porodera</i>	26
		“ravida”	<i>P. fulviventris</i>	15
		“incerta sedis”	<i>P. martinezpalciosi</i>	7
	<i>Chlaenobia</i>	“vexata”	<i>P. rzedowskiana</i>	217
	<i>Phytalus</i>	“pruinosa”	<i>P. hoogstraali</i>	65
		“macrocera”	<i>P. batillifer</i>	31
	<i>Listrochelus</i>	“cavata”	<i>P. riverana</i>	22
	“incerta sedis”	“incerta sedis”	<i>P. ilhuicaminai</i>	191
	Total 4	7	10	1066

1.3.1 Diagnósis de los grupos de especies representados en el área de estudio (*sensu lato*) Morón (1986):

Cavata. Longitud corporal, 11-14 mm. Cuerpo más ovalado que alargado, especialmente en las hembras. Color castaño rojizo a castaño amarillento, brillante y con frecuencia escabriculoso. Quilla del vértice más o menos definida. Región posterior del vértice sin puntuación central. Maza antenal masculina más larga que el funículo. Masa antenal femenina más corta o tan larga como el funículo. Labro profundo y ampliamente hendido, con escasas sedas laterales.

Pronoto densamente punteado, brillante o en pocos casos un poco mate. Élitros densamente punteados, brillantes o glabros. Pigidio masculino muy convexo, casi hemiesférico. Pigidio femenino con una depresión apical más o menos marcada, que en ocasiones está flanqueada por procesos dentiformes cortos. Placa anal masculina estrecha, en ocasiones con una ligera depresión o escotadura mesal. Placa anal femenina convexa, en algunos casos con escotaduras y depresiones.

Metatarsos masculinos con escasas sedas ventrales. Uñas masculinas unipectinadas. Uñas femeninas dentadas, pectinadas solo hacia atrás del dentículo medio.

Vexata. Longitud corporal de 12-16 mm. Color amarillento pajizo o rojizo. Antenas formadas por nueve o diez artejos (cuando tienen nueve, el 4° es más largo que el 3°). Maza antenal masculina un poco más larga que el funículo. Maza antenal femenina un poco más corta que el funículo. Labro un poco excavado y reniforme, glabro o setífero.

Pronoto brillante, con puntuación fina, moderada, en ocasiones densa o ligeramente rugosa. Ángulos posteriores del pronoto poco obtusos o casi rectos, doblados o replegados hacia la pleura. Pigidio masculino convexo, generalmente glabro. Pigidio femenino excavado, surcado o tuberculado generalmente glabro. Placa anal masculina con forma variable, excavada o casi plana, amplia o estrecha y con sedas abundantes o escasas. Placa anal femenina convexa o amplia. Todos los artejos tarsales masculinos mayor o menormente ensanchados y deprimidos provistos con una cobertura setífera bastante densa y evidente en sus partes ventrales.

Pruinosa. Longitud corporal de 18-26 mm. Cuerpo ovalado (proporción largo-ancho 2.1 a 2:5:1). Color pardo oscuro, castaño rojizo o amarillento. Antenas formadas por diez artejos (3°, 4° y 5° cortos). Maza antenal masculina más larga o de igual longitud que el funículo. Maza antenal femenina más corta o de igual longitud que el funículo. Clípeo trapezoidal redondeado o un poco bilobulado.

Pronoto y élitros aterciopelados, setíferos o glabros. Pigidio masculino convexo. Pigidio femenino convexo o ligeramente cónico. Vestidura pigidial variable, abundante y fina, aterciopelada o ausente. Placa anal masculina poco convexa o excavada.

Espolón metatibial externo masculino corto y fusionado con el borde de la tibia. Diente inferior de las uñas tarsales generalmente mayor que la proyección apical superior. Borde inferior de las uñas liso.

Macrocera. Longitud corporal entre 13-18 mm. Cuerpo ovalado (proporción largo-ancho 2 a 2.3: 1). Color pardo oscuro, rojizo o amarillento. Antenas formadas

por diez artejos (3 a 5 cortos). Maza antenal masculina más larga o de igual longitud que el funículo. Maza antenal femenina de igual longitud que el funículo. Clípeo subrectangular o redondeado.

Pronoto y élitros setíferos, ligeramente aterciopelados o glabros. Pigidio masculino moderadamente convexo. Pigidio femenino convexo, bicalloso o cóncavo. Vestidura pigidial escasa o nula. Placa anal masculina convexa, excavada o surcada.

Espolón metatibial externo masculino libremente articulado con el borde de la tibia. Proyección inferior del ápice de las uñas tarsales más corta que la proyección superior. Borde inferior de las uñas liso o aserrado.

Porodera. Longitud corporal de 14-19 mm. Cuerpo ovalado, robusto, notablemente ensanchado hacia atrás. Color castaño oscuro a castaño rojizo, con un viso blanquecino o grisáceo. Región dorsal aterciopelada, con sedas erectas más o menos esparcidas. Cabeza pequeña en proporción al protórax, ojos pequeños y poco prominentes. Clípeo corto, redondeado y ligeramente sinuado. Antenas formadas por nueve artejos. Maza antenal masculina de igual longitud que el funículo. Maza antenal femenina 0.1 veces más corta que el funículo. Labro pequeño, reniforme, ampliamente sinuado.

Pronoto 1.5 veces más ancho que largo con los bordes laterales redondeados, poco proyectados en su porción media; puntuación circular, amplia y moderadamente densa; ángulos anteriores prominentes y aguzados; ángulos basales obtusos bien marcados. Pigidio masculino y femenino poco convexo, con cobertura setífera abundante y mixta. Placa anal masculina, estrecha, excavada, con un reborde posterior sinuado o escotado. Placa anal femenina convexa y provista con sedas. Vestidura mesal de los esternitos escasa, corta y fina sobre una delicada cubierta aterciopelada.

Ambos espolones metatibiales masculinos articulados. Uñas masculinas y femeninas semejantes, con el dentículo intermedio corto, semitriangular y más o menos equidistante de los extremos. Parámetros cortos, cortos fusionados en anillo. Edeago con soporte esclerosado, muy ornamentado con placas y grupos de sedas macroscópicas erectas.

Ravida. Longitud corporal de 12-14 mm. Cuerpo alargado un poco ensanchado hacia atrás. Color amarillento rojizo o pardo-rojizo. Región dorsal brillante con frecuencia con sedas variables en longitud, distribución y densidad. Cabeza pequeña en proporción con el protórax, ojos grandes poco prominentes. Clípeo trapezoidal redondeado, cóncavo con puntuación variable. Antenas formadas por diez artejos. Maza antenal masculina 2.6 a 1.3 veces mayor que el funículo. Maza antenal femenina tan larga como el funículo o 1.2 veces mayor. Labro reniforme, estrecho y poco prominente.

Pronoto 1.6 veces más ancho que largo, con los bordes laterales poco proyectados en su porción media; puntuación pequeña pero bien marcada, con densidad y distribución variable; ángulos posteriores casi rectos y un poco proyectados o ligeramente obtusos y redondeados. Pigidios masculino y femenino convexos, prominentes hacia el ápice, con vestidura variable pero siempre presente. Placa anal masculina someramente excavada, acanalada o casi plana. Placa anal femenina convexa. Vestidura mesal de los esternitos escasa a muy abundante.

Ambos espolones metatibiales articulados. Uñas con la base dilatada y el diente intermedio largo y afilado, flanqueado por escotaduras profundas, o corto y desplazado cerca de la dilatación basal. Las uñas exteriores de los mesotarsos masculinos presentan la porción apical recurvada, de tal modo que el diente intermedio sobresale lateralmente deformando el conjunto. Parámetros cortos y fusionados disto-ventralmente. Edeago ornamentado con sedas largas y gruesas, o con un soporte esclerosado voluminoso.

Complejo 1, *dasyпода*. Longitud corporal: 16-23 mm. Uñas externas de los mesotarsos masculinos poco con el diente apical extendido y el diente intermedio corto, poco sobresaliente.

Anodentata. Longitud corporal de 13-20 mm. Cuerpo ovalado, robusto, notablemente ensanchado hacia atrás. Color pardo oscuro, pardo rojizo, castaño rojizo, castaño amarillento, y frecuentemente con un viso grisáceo o blanquecino. Región dorsal cubierta con sedas largas y cortas muy abundantes. Más notorias en la mitad anterior, y en ocasiones con una cubierta aterciopelada muy fina. Cabeza pequeña en proporción con el protórax, ojos grandes poco prominentes. Clípeo corto, redondeado, casi hemicircular, en ocasiones con el borde anterior ligeramente

sinuado. Antenas formadas por 10 artejos. Maza antenal masculina de igual longitud o hasta dos veces más larga que éste. Maza antenal femenina, con longitud equivalente al funículo. Labro reniforme, poco excavado, setífero, poco prominente.

Pronoto 1.5-1.7 veces más ancho que largo, con los bordes laterales moderadamente proyectados en su porción media; puntuación en general circular, muy fina y muy densa setífera, aunque en ocasiones es tosca; ángulos anteriores prominentes y aguzados o poco notables y redondeados; ángulos posteriores obtusos pero bien marcados. Pigidio masculino poco convexo; pigidio femenino convexo y un poco prominente apicalmente, cobertura setífera abundante o escasa, pero siempre presente, eventualmente con cubierta aterciopelada. Placa anal masculina con un reborde anterior que alcanza los extremos laterales, y cuya parte mesal presenta una escotadura, un seno, o un proceso bilobado o bidentado; en otros casos este reborde solo está marcado hacia los lados. Placa anal femenina convexa. Vestidura mesal de los esternitos variable, escasa a muy abundante pero siempre corta y fina.

Ambos espolones metatibiales masculinos articulados. Uñas masculinas y femeninas similares con el dentículo intermedio corto, semitriangular y frecuentemente un poco aproximado hacia la pequeña dilatación basal. Parámetros cortos, fusionados en anillo con una pequeña proyección bidentada ventral y dentículos latero-distales simétricos. Edeago esclerosado muy ornamentado con espinas, sedas y un filamento recurvado ligeramente asimétrico en algunas especies.

1.3.2 Clave para separar los machos del género *Phyllophaga* de la zona cañera de Morelos, México

- 1 Machos con uñas unidentadas.5
- 1' Machos con uñas de forma variable..... 2
- 2 Uñas bífidas o hendidas, sin carina en el vertex.....3
- 2' Uñas aserradas (Fig. 1C), con una carina en el vertex (Fig. 1B), de aspecto pruinoso (Fig. 1A). Longitud corporal de 13 mm aprox. Cápsula genital masculina con parámetros cortos (Fig. 1D), fusionados dorsalmente (Fig. 1E) y excavados en vista lateral (Fig. 1D), con ápices en forma de paletillas curvadas hacia afuera en vista distal (Fig. 1F). Edeago con un soporte esclerosado, ensanchado y con el ápice recurvado hacia abajo..... ***P. (Listrochelus) riverana***
- 3 Cuerpo ovalado, pardo oscuro, dorso con aspecto variable.....4
- 3' Cuerpo alargado, amarillento, dorso siempre glabro, brillante (Figs. 2A-B). Puntuación en clípeo, pronoto y élitros (Fig. 2A). Longitud corporal: 12-12.5 mm. Uñas hendidas con el denticulo inferior más corto que el superior (Fig. 2C). Cápsula genital masculina con parámetros simétricos (Fig. 2F), fusionados dorsoventralmente (Fig. 2E), con los ápices aplanados en vista lateral y dirigidos hacia adelante (Fig. 2D). Edeago con soporte tubular esclerotizado, con tres proyecciones apicales agudas, una de ellas notablemente ensanchada en su base y dirigida hacia abajo (Fig. 2D).....***P. (Chlaenobia) rzedowskiana***
- 4 Espolón metatibial fusionado con el borde de la tibia, corto y recurvado. Cuerpo ovalado, el dorso aterciopelado (Fig. 3A). Longitud corporal: 20 mm (Fig. 3B). Uñas bífidas (Fig. 3C). Cápsula genital masculina con los parámetros fusionados dorsoventralmente (Fig. 3F). En vista lateral (Fig. 3D), ápices aplanados, dirigidos hacia el frente, curvados, convergiendo ventralmente pero con las puntas libres (Fig. 3F). Edeago sacular con un área apical de aspecto escamoso (Fig. 3E).
..... ***P. (Phytalus) hoogstraali***
- 4' Espolón metatibial articulado con el borde de la tibia. Diente inferior de las uñas notablemente más corto que el diente inferior (Fig. 4C). Clípeo subrectangular, muy

prominente con aspecto de pala en vista dorsal (Fig. 4A). Longitud corporal 21 mm (Fig. 4B). Genitalia con los parámetros fusionados dorsoventralmente, con los ápices convergentes y curvados hacia abajo en vista lateral (Figs. 4D, 4F). Edeago esclerosado en la base (Fig. 4E) y sacular en la mitad apical, con una espícula dorsal recurvada y un proceso simétrico escamoso, ambos en el ápice (Figs. 4D-E).

..... ***P. (Phytalus) batillifer***

5 Con 9 artejos antenales, color pardo amarillento, notablemente ensanchadas hacia atrás (Fig. 5A). Longitud del cuerpo 14 mm (Fig. 5B). Uñas dentadas, con el denticulo en la mitad basal (Fig. 5C). En vista distal, genitalia con parámetros cortos, delgados, convergentes en su ápice (Fig. 5F), con proyecciones laterales afiladas fuertemente orientadas hacia atrás (Figs. 5D, 5F). Edeago con soporte esclerosado, con un proceso setífero largo preapical (Figs. 5D-E). ***P. (Phyllophaga) porodera***

5' Con 10 artejos antenales. 6

6 Uñas asimétricas, deformadas. 7

6' Uñas simétricas. 8

7 Machos solo con las uñas mesotarsales deformadas (Fig. 6D). Uñas protarsales y metatarsales no deformadas (Fig. 6C). Pronoto y élitros glabros y brillantes (Fig. 6A-B). Parámetros fusionados disto-ventralmente (Figs. 6E-F) cortos y ensanchados en vista lateral (Fig. 6E), con proyecciones dirigidas hacia adelante. En vista dorsal, edeago corto con un soporte bifurcado y una espina dorso apical (Fig. 6F).

..... ***P. (Phyllophaga) fulviventris***

7' Machos con los tres pares de uñas deformadas (Fig. 7C). Color pardo amarillento, aspecto dorsal rugopunteado (Fig. 7A). Longitud corporal: 24-26 mm (Fig. 7B). Genitalia con parámetros ensanchados, fusionados dorsoventralmente, convergentes (Figs. 7E-F), con proyecciones apicales puntiagudas, recurvadas ventralmente (Fig. 7D). Edeago sacular sin ornamentos (Fig. 7E)... ***P. (Phyllophaga) martinezpalaciosi***

8 Denticulo de las uñas tarsales corto, en ocasiones apenas visible, con denticillos en todo el borde inferior (Fig. 8C). Con nueve artejos antenales de color pardo amarillento con el dorso glabro (Fig. 8A-B). Genitalia con parámetros cortos, fusionados dorsoventralmente con una proyección puntiaguda frontal a cada lado y

una proyección bidentada ventral y proyectada caudalmente (Fig. 8F). Edeago con un soporte esclerosado semitubular con un ornamento tubular dorsal, alargado con setas apicales (Fig. 8D-E). ***P. (incerta sedis) ilhuicaminai***

8'Dentículo de las uñas largo y claramente visible, sin dientecillos en el todo borde inferior.9

9 Placa anal con dos dentículos en el borde anterior, sin un área granulosa en el penúltimo segmento abdominal. Color pardo rojizo, cuerpo ovalado (Fig. 9A). Dorso con sedas largas (Fig. 9B). Uñas dentadas con el diente ubicado en posición basal (Fig. 9C) Longitud corporal 18 mm. Genitalia con parámetros cortos fusionados dorsoventralmente, con los ápices convergentes y con una proyección bidentada, aguda, orientada hacia abajo (Fig. 9F). Edeago semitubular esclerosado con dos proyecciones laterales orientadas caudalmente y un flagelo en posición dorso-apical, largo, recurvado y espinoso el ápice (Figs. 9D-E). ***P. (Phyllophaga) lenis***

9'Placa anal sin dentículos, con un área granulosa en el penúltimo segmento abdominal. Color pardo rojizo, cuerpo ovalado (Fig. 10A). Longitud corporal 18 mm. Dorso con sedas cortas (Fig. 10B). Uñas dentadas, recurvadas con el diente en posición basal (Fig. 10C). Genitalia con parámetros cortos fusionados dorsoventralmente (Fig. 10F), con los ápices convergentes, con una proyección bidentada ventral orientada caudalmente y una notable proyección a los lados, que en vista lateral da un aspecto bifurcado (Fig. 10D). Edeago semitubular, medianamente esclerosado con un ornamento preapical recurvado y setoso en el ápice (Fig. 10D-E). ***P. (Phyllophaga) brevidens***

1.4 Referencias citadas

- Aragón, G. A., M. A. Morón. 2003. Two new species of *Phyllophaga* Harris (Coleoptera: Scarabaeidae: Melolonthidae) from South Central, México. P. Entomol. Soc. Wash. 105: 559-567.
- Deloya, C. 1988. Coleópteros lamelicornios asociados a depósitos de detritos de *Atta mexicana* (Smith) Hymenoptera: formicidae) en el Sur del Estado de Morelos. Folia Entomológica Mexicana. 75: 77-91.
- Deloya, C. 1993. El género *Phyllophaga* Harris en Cuernavaca, Morelos, México. En: Diversidad y manejo de plagas subterráneas (M.A. Morón compilador). Publicación especial de la Sociedad Mexicana de Entomología e Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz, México. pp. 39-54.
- Deloya, C., A. Burgos, J. Blackaller, J. M. Lobo. 1993. Los coleópteros lamelicornios de Cuernavaca, Morelos, México, (Passalidae, Trogidae, Scarabaeidae y Melolonthidae), Boletín de la Sociedad Veracruzana de Zoología. 3(1): 15-55.
- Deloya, C., M. A. Morón. 1994. Coleópteros Lamelicornios del distrito de Jojutla, Morelos, México (Melolonthidae, Scarabaeidae, Trogidae y Passalidae). Listados faunísticos de México. V. Instituto de Biología. UNAM. México. pp. 1-49.
- Deloya, C., M. A. Morón. 1998. Nuevas especies *Phyllophaga* Harris (Coleoptera: Melolonthidae) de Morelos, Puebla y Chiapas, México. Folia Entomológica Mexicana 104: 109-119.
- Deloya, C., M. A. Morón, J. M. Lobo. 1995. Coleoptera Lamellicornia (Macleay, 1819) del sur del Estado de Morelos, México. Acta Zoológica Mexicana (n.s) 65: 1-42.
- Flores, C. S. 1994. Las plagas de la caña de azúcar en México. Editorial. México. 350 p.
- Gimp 2.8.14. 2015. The GIMP team. www.gim.p.org. Instalado en 14 de mayo de 2015.

- Morón, M. A. 1986. El género *Phyllophaga* en México. Morfología, distribución y sistemática supraespecífica (Insecta: Coleoptera). Publicación 20. Instituto de Ecología, México. 344 p. ISBN-968-7213-02-7
- Morón, M. A., y R. Terrón. 1988. Entomología Práctica. Publicación 22. Instituto de Ecología. A.C. México D.F. 504 p. ISBN-968-7213-08-6
- Morón, M. A., B. C. Ratcliffe, C. Deloya. 1997. Atlas de los escarabajos de México. Coleoptera: Lamellicornia Vol. I Familia Melolonthidae Subfamilias Rutelinae, Dynastinae, Cetoniinae, Trichinae, Valginae y Melolonthinae. Sociedad Mexicana de Entomología. Veracruz, México. pp. 205-264. ISBN-9680-7801-00-X
- Morón, M. A. 2004. Revision of the *cavata* group of *Phyllophaga* (*Listrochelus*) Blanchard (Coleoptera: Melolonthidae: Melolonthinae) Ann. Entomol. Soc. Am. 91: 77-96.
- Norris, R. F., E. P. Caswell-Chen, M. Kogan. 2003. Concepts in integrated pest management. Prentice Hall, USA. 586 p.
- Núñez-Valdez. M. E., A. Romero, R. Arzuffi, A. L. Llanos, M. E. Valdés, R. Figueroa y F. J. Villalobos. 2002. Agrobiotecnología aplicada al manejo integrado de plagas subterráneas: un enfoque promisorio para el manejo de la gallina ciega (Coleoptera: Scarabaeidae) y el picudo negro del nardo y agave (Coleoptera: Curculionidae). En Aragón, A. y J. F. López-Olguín (Eds). Métodos para la generación de tecnología de punta.
- Riess, C. M., S. Flores. 1976. Catálogo de plagas y enfermedades de la caña de azúcar en México. Comisión Nacional de la Industria Azucarera. Instituto para el Mejoramiento de la Producción de azúcar. México.
- Rodríguez del Bosque, L. A., M. A. Morón. 2011. Plagas del suelo. Mundi Prensa. México D. F. 416 p. ISBN-078-100-07-769906-04
- Villalobos, F. J., A. Romero-López, M. E. Núñez-Valdez. 2001. Diagnóstico del problema causado por gallina ciega en cultivos de maíz del Estado de Morelos. En Memorias del 1er Simposium de Manejo Integrado de Plagas del Estado de Morelos. UAEM, Morelos, México. 27 p.

APÉNDICE 1

Imágenes de las estructuras diagnosticas más relevantes de las especies de *Phyllophaga* de la zona cañera de Morelos, México.

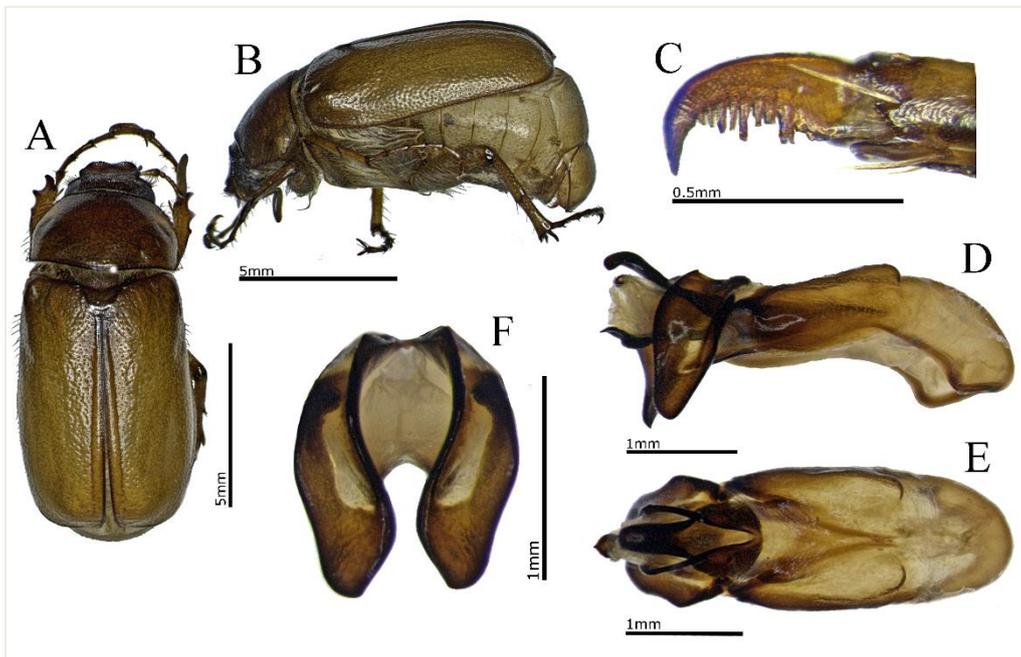


Figura 1. *P. riverana* macho, A) vista dorsal, B) vista lateral, C) vista lateral de la uña protarsal, D) vista lateral de la genitalia, E) vista dorsal de la genitalia, F) aspecto distal de los parámetros.

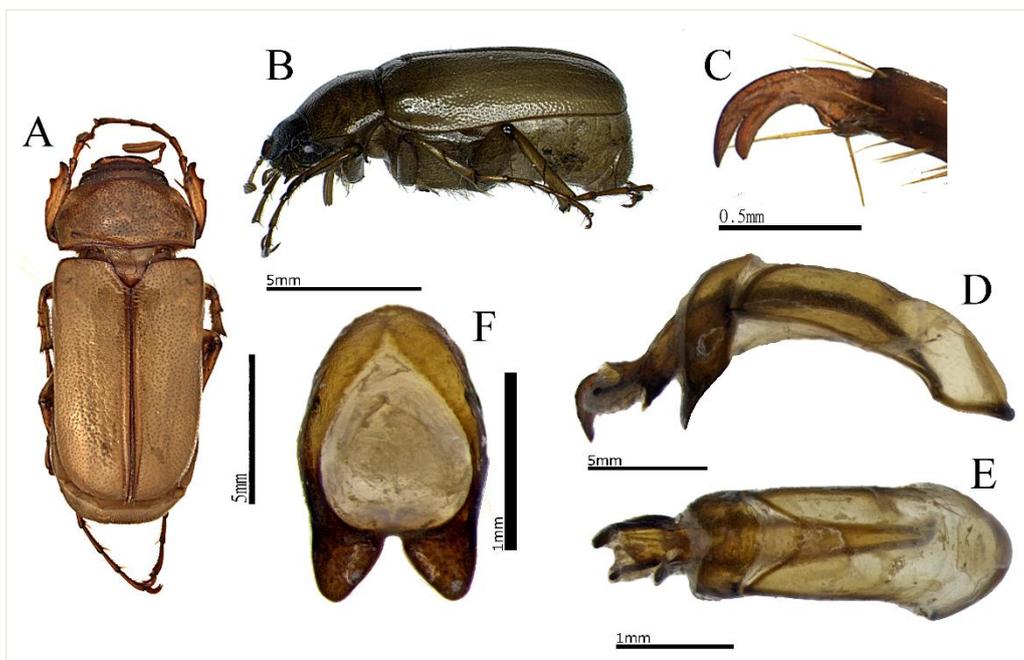


Figura 2. *P. rzedowskiana* macho, A) vista dorsal, B) vista lateral, C) vista lateral de la uña protarsal, D) vista lateral de la genitalia, E) vista dorsal de la genitalia, F) aspecto distal de los parámetros.

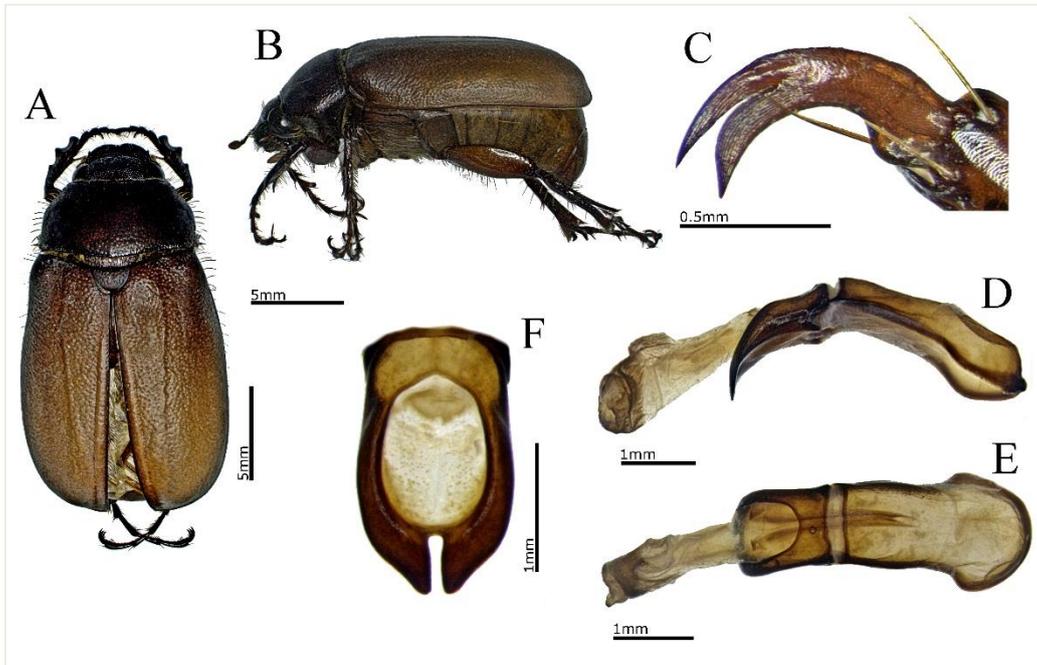


Figura 3. *P. hoogstraali* macho, A) vista dorsal, B) vista lateral, C) vista lateral de la uña protarsal, D) vista lateral de la genitalia, E) vista dorsal de la genitalia, F) aspecto distal de los parámetros.

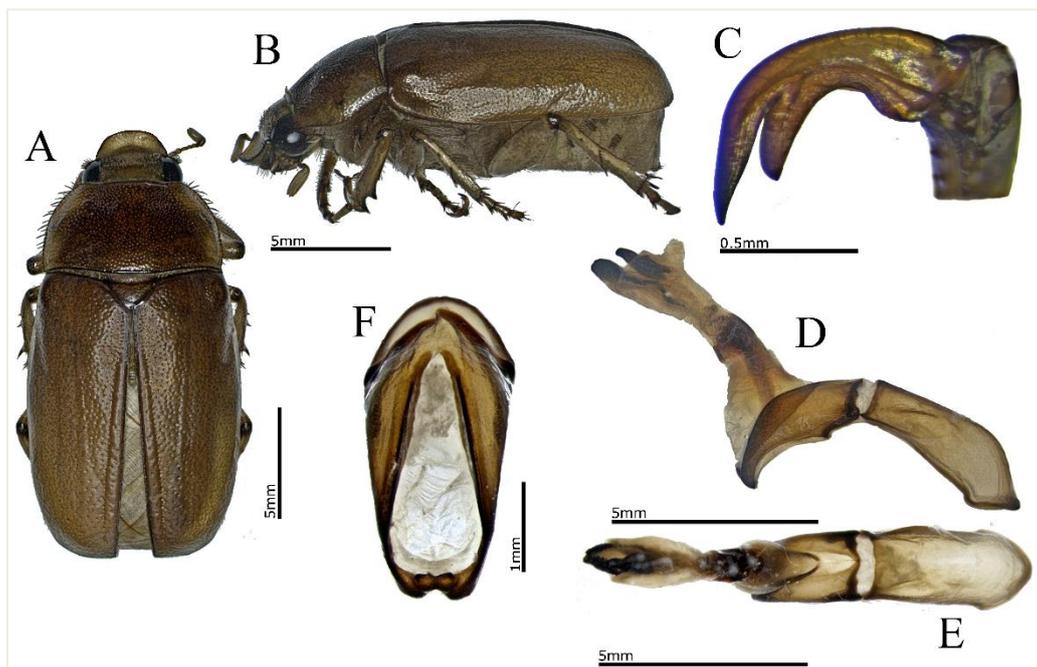


Figura 4. *P. batillifer* macho, A) vista dorsal, B) vista lateral, C) vista lateral de la uña protarsal, D) vista lateral de la genitalia, E) vista dorsal de la genitalia, F) aspecto distal de los parámetros.

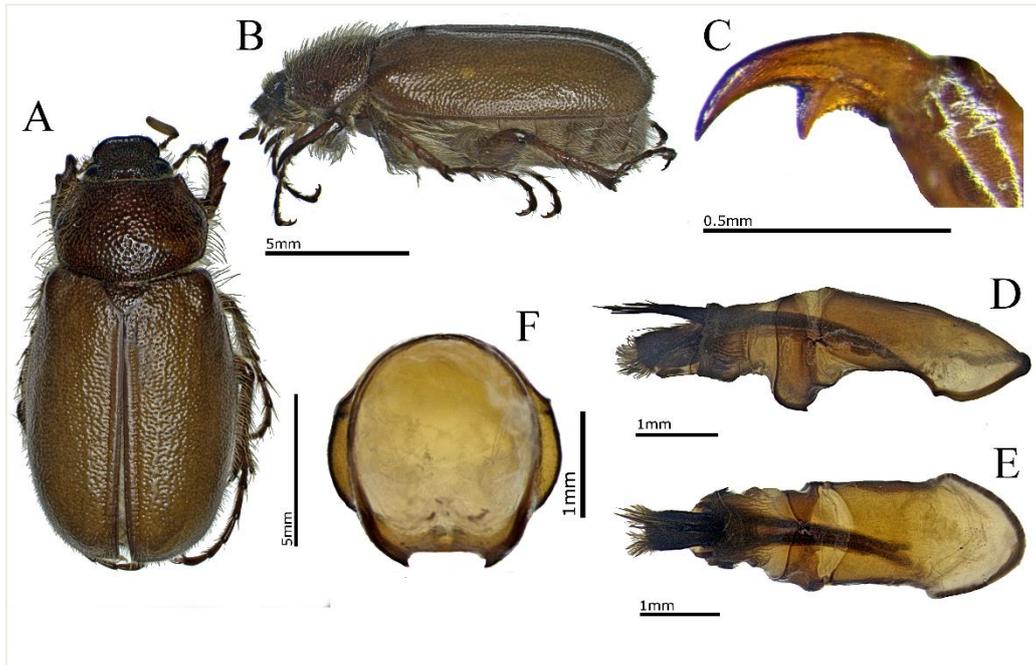


Figura 5. *P. porodera* macho, A) vista dorsal, B) vista lateral, C) vista lateral de la uña protarsal, D) vista lateral de la genitalia, E) vista dorsal de la genitalia, F) aspecto distal de los parámetros.

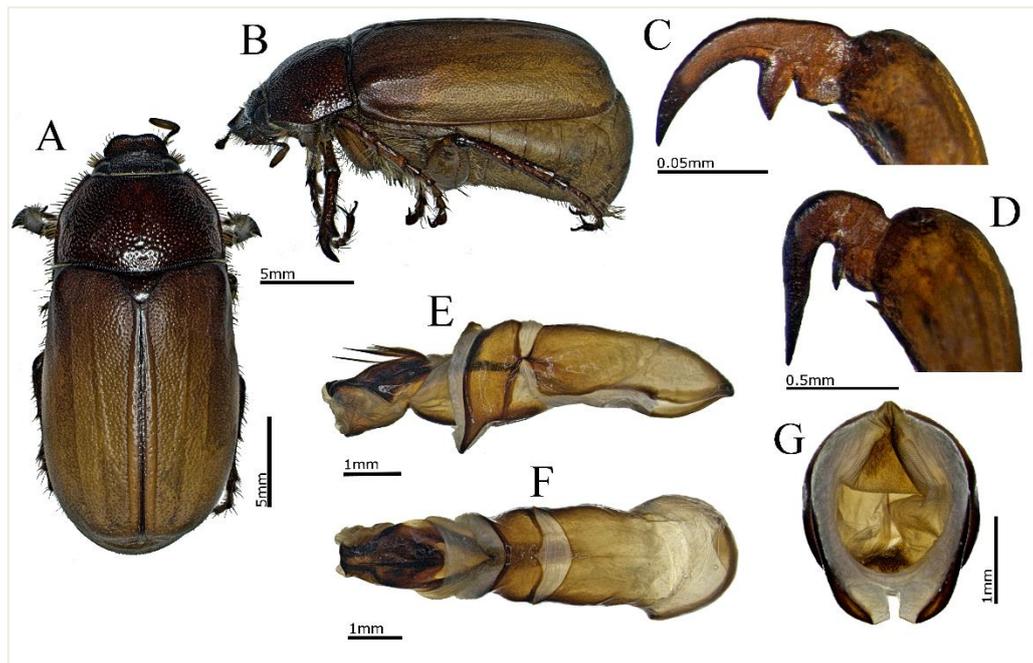


Figura 6. *P. fulviventris* macho, A) vista dorsal, B) vista lateral, C) vista lateral de la uña protarsal, D) vista lateral de la uña mesotarsal, E) vista lateral de la genitalia, F) vista dorsal de la genitalia, G) aspecto distal de los parámetros.

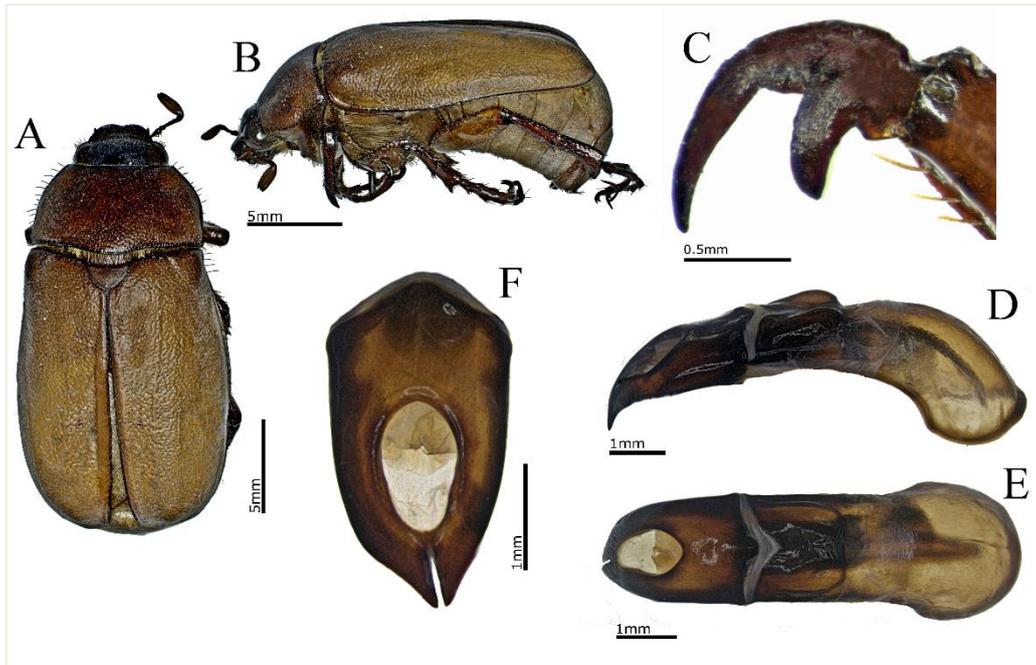


Figura 7. *P. martinezpalaciosi* macho, A) vista dorsal, B) vista lateral, C) vista lateral de la uña protarsal, D) vista lateral de la genitalia, E) vista dorsal de la genitalia, F) aspecto distal de los parámetros.

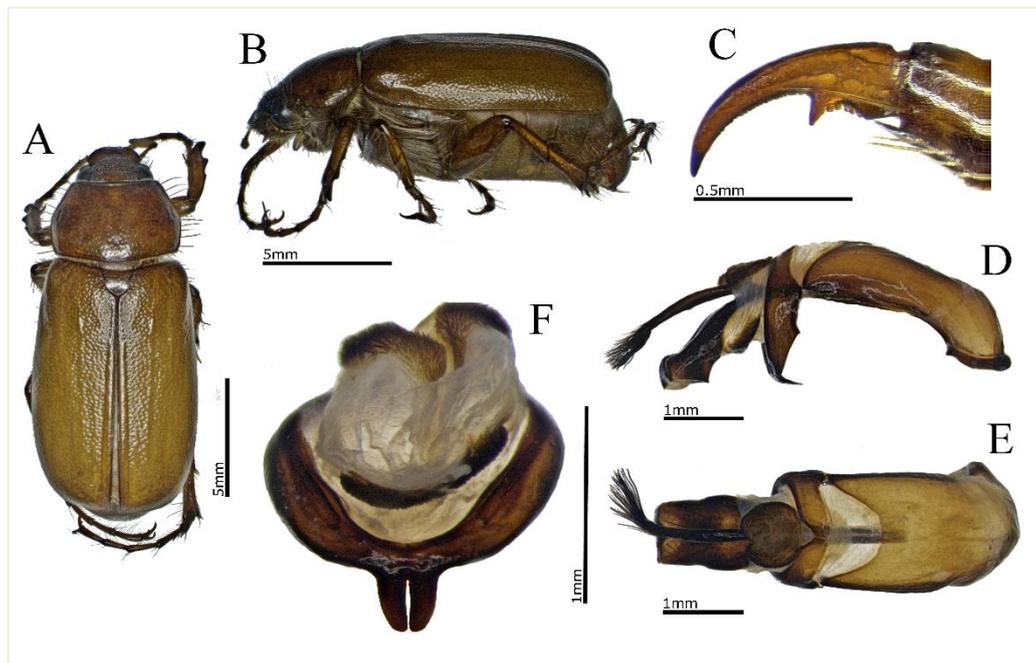


Figura 8. *P. ilhuicaminai* macho, A) vista dorsal, B) vista lateral, C) vista lateral de la uña protarsal, D) vista lateral de la genitalia, E) vista dorsal de la genitalia, F) aspecto distal de los parámetros.

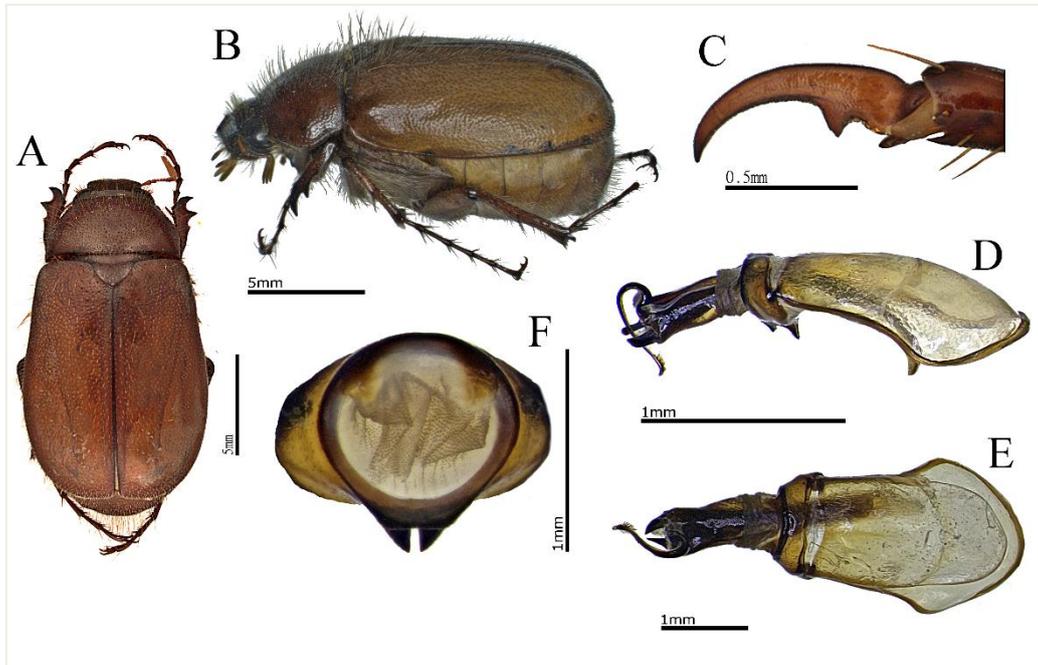


Figura 9. *P. lenis* macho, A) vista dorsal, B) vista lateral B) vista lateral de la uña protarsal, D) vista lateral de la genitalia, E) vista dorsal de la genitalia, F) aspecto distal de los parámetros.

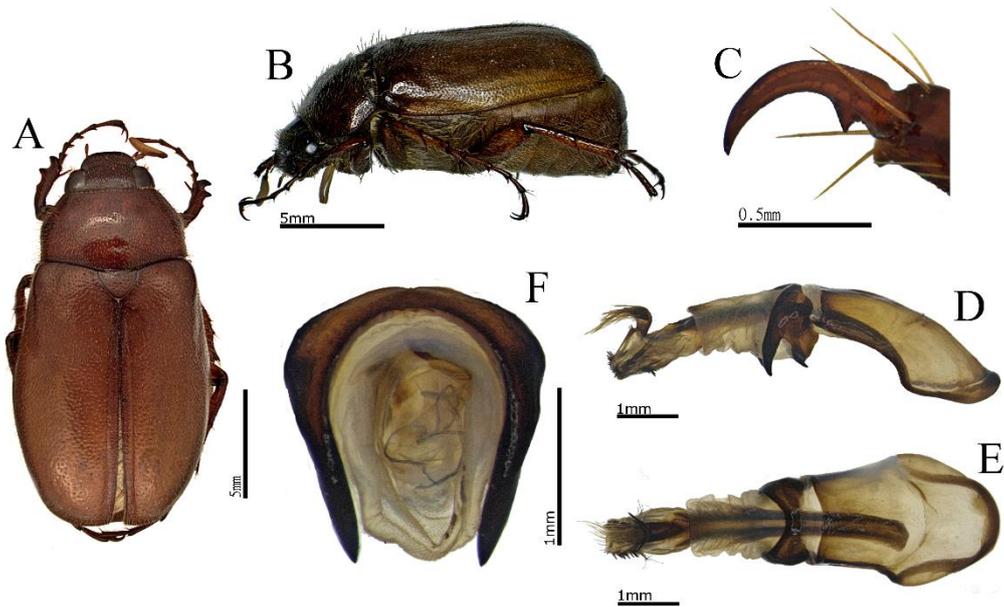


Figura 10. *P. brevidens* macho, A) vista dorsal, B) vista lateral, C) vista lateral de la uña protarsal, D) vista lateral de la genitalia, E) vista dorsal de la genitalia, F) aspecto distal de los parámetros.

CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES COI Y Cyt B DE LA MITOCONDRIA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Phyllophaga* (COLEOPTERA: MELOLONTHIDAE) DE MORELOS, MÉXICO

Resumen. La identificación del complejo gallina ciega se basa en características morfológicas de machos, por lo que una herramienta que facilita la identificación de estados inmaduros es la amplificación de fragmentos del genoma. Con el objetivo de identificar y generar secuencias de los genes Citocromo Oxidasa I (COI) y Citocromo B (Cyt B) de la mitocondria que permitan la identificación de estados inmaduros y adultos de siete de diez especies de *Phyllophaga*, colectadas en la zona de abasto del Ingenio Emiliano Zapata, Morelos, se realizaron colectas de adultos del género *Phyllophaga* con trampas de luz blanca y colectas manuales en el periodo marzo-julio, 2013-2015. Las especies se determinaron morfológicamente, se realizó la extracción de DNA de cada una de las especies y se amplificaron y secuenciaron los genes COI y Cyt B de siete especies. Los resultados señalan que de los genes analizados, el gen Citocromo B (Cyt B), soporta la filogenia morfológica a nivel de género y subgénero, no así el gen Citocromo Oxidasa I (COI).

2.1 Introducción

La identificación del complejo *Phyllophaga* (*sensu lato*) es compleja y se basa en características morfológicas exteriores y genitalia de machos adultos (Luginbill y Painter, 1953), que realizan taxónomos expertos en el grupo, características que limitan la identificación práctica de éstas especies; esto se complica más en estados inmaduros, por la similitud en la morfología de las larvas y falta de caracteres morfológicos distintivos, que permitan la separación de especies, para la implementación de estrategias de manejo. Por lo anterior, el uso de pequeños fragmentos del genoma se utilizan para este propósito, como una herramienta valiosa en la identificación de individuos (Hebert *et al.* 2003) y ha sido ampliamente aplicada para el estudio de las relaciones filogenéticas de organismos (Baker *et al.* 1996; Teletchea *et al.*, 2008). Hebert *et al.* (2003) señala que el uso de un fragmento del ADN mitocondrial de la región del gen citocromo oxidasa subunidad I (COI), constituye un instrumento útil para un sistema de bio-identificación global, además el fragmento del COI ha sido elegido como una herramienta estandarizada para taxonomía

molecular e identificación de especies (Hebert *et al.* 2003), debido a que este marcador molecular es relativamente fácil de amplificar, contiene fuertes regiones conservadas y es altamente variable debido a su elevada tasa de mutación (Galtier *et al.* 2009). Este gen ha sido utilizado por Doskocil *et al.* (2008) para la identificación de adultos y larvas de diversas especies de *Phyllophaga* en Estados Unidos, en tanto que otros autores han utilizado el gen COII para determinar la relación de filogenia de *Prodontria* spp, un género de escarabajos estrechamente relacionado con *Phyllophaga* (Emerson y Wallis 1995). Otro gen mitocondrial que se ha utilizado como marcador molecular para análisis filogenéticos en coleópteros es el gen Citocromo B (Cyt B) componente indispensable en la cadena respiratoria de la mitocondria (Mitchell, 1976), debido a la variabilidad que exhibe a diferentes niveles taxonómicos (Irwin *et al.* 1991). Meyer *et al.* (1994) menciona al gen Cyt B como útil para la separación de complejos de especies y especies morfológicamente similares. Su uso en la sistemática y filogenia de insectos está documentada para otros coleópteros (Romero-Nápoles *et al.* 2015). Por lo anterior, el propósito de la presente investigación es caracterizar los genes COI y Cyt B de las especies de *Phyllophaga*, que se encuentran en la zona de abasto del ingenio Emiliano Zapata, en el estado de Morelos, y proporcionar una base de datos molecular que permita una rápida identificación de los estados inmaduros de estas especies.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Características del área de estudio. La colecta de insectos del género *Phyllophaga* se realizó durante los meses de marzo-julio 2013-2015, con el uso de trampas tipo embudo de luz blanca (16 watts) y colectas manuales, en cuatro municipios del estado de Morelos, los cuales se ubican en la zona de abasto del ingenio Emiliano Zapata en Morelos, México, con climas cálidos, húmedos y subhúmedos, con temperaturas media anual de 23.5 a 25.5°C (Cuadro 2). Los insectos capturados se conservaron en refrigeración (-4°C) hasta su determinación y análisis molecular.

Cuadro 2. Localización del área de estudio.

Localidad	Municipio	Ubicación	Temperatura anual en °C	Precipitación anual en mm	Clima
Santa Rosa Treinta	Tlaltizapan	18°43' 06.6" N; 99°10' 50.2" W	23.5	840	Subhúmedo
Lagunillas	Tlalquitenango	18°42' 38.5" N; 99° 10' 46.5"W	24	800-1000	Subhúmedo
Galeana	Jojutla	18° 37' 26.4"N 99°13' 00.7" W	25	927	Cálido
Pedro Amaro	Jojutla	18° 35' 45.6"N 99°10'14.4"W	25.3	927	Cálido
Xochitepec	Xochitepec	18°48' 41.1" N; 99° 11' 17.5W	23.5	840	Cálido húmedo

(INEGI, 2010).

2.2.2 Identificación taxonómica. La determinación taxonómica de las especies se realizó con base en la morfología externa y genitalia de machos, siguiendo la clave dicotómica para las especies de *Phyllophaga* del estado de Morelos (Zaragoza-Ortega *et al.* 2016) y criterios descritos por Morón (1986-2004).

2.2.3 Extracción de ADN genómico. La extracción total del ADN se obtuvo individualmente después de la identificación morfológica de las especies: *P. riverana* Morón, *P. rzedowskiana* Aragón y Morón, *P. hoogstraali* Saylor, *P. batillifer* (Bates), *P. porodera* (Bates), *P. fulviventris* (Moser), *P. martinezpalcios* Morón, *P. ilhuicaminai* Morón, *P. lenis* (Horn) y *P. brevidens* (Bates). El tórax y las patas de cada especie se maceraron con nitrógeno líquido, posteriormente la extracción de DNA se realizó con el método del bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB 2%) elaborado por Murray y Thompson (1980) y publicado en 1987, por Wagner y sus colaboradores (Wagner *et al.* 1987). El DNA genómico se visualizó en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, la cuantificación de la concentración de DNA se realizó con el Nanodrop (Thermo scientific®).

2.2.4 Amplificación de los genes COI y Cyt B. Para la identificación molecular se obtuvo la secuencia parcial del gen Citocromo oxidasa I (COI) y el gen citocromo B (Cyt B) para uno o cinco ejemplares de cada una de las especies identificadas morfológicamente. La amplificación del gen COI se realizó con los iniciadores LCO1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') y HCO2198

(5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') los cuales amplifican un fragmento de 658 pb (Hebert *et al.* 2003). El gen Cyt B se amplificó con los oligonucleótidos CB1 (5'-TAT GTA CTA CCA TGA GGA CAA ATA TC-3') y CB2 (5'-ATT ACA CCT CCT AAT TTA TTA GGA AG-3') los cuales amplifican un fragmento de 460 pb (Delobel *et al.* 2003). La PCR se realizó para ambos genes individualmente en una reacción de 25 μ L, que contenía 12.5 μ L de Gotaq Mastermix 2X (Promega®), 2.5 μ L, de cada iniciador (Forward, Reverse) 10 μ M y 1.5 μ L de DNA templado [100ng/ μ L] ajustando el volumen con agua grado biología molecular. La amplificación se realizó en el termociclador (Thermo scientific®). Para el gen COI el programa fue: un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 2 min, 30 ciclos de 30 seg a 95°C, alineamiento a 51°C por 50 seg y extensión a 72°C por 1 min y un ciclo de extensión final a 72°C durante 5 min. Para el gen Cyt B, se modificó la temperatura de alineamiento a 50°C. Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1% en TBE 1X teñido con bromuro de etidio. Los productos amplificados positivos se enviaron a la compañía MacroGen (Korea) para su secuenciación en ambos sentidos con los oligonucleótidos empleados en la amplificación inicial.

2.2.5 Análisis de secuencias. Las secuencias obtenidas fueron ensambladas con el programa Sequencher 5.4.1 (2016) Gene Codes y alineadas con el programa Clustal W implementado en el programa MEGA 6.06 (Tamura *et al.* 2015). La comparación con otras secuencias se realizó a través de un BLASTN (The Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos NCBI (Nucleotide) por género y gen analizado, de donde se obtuvieron 29 secuencias de especies de *Phyllophaga* de la región de código de barras del gen COI para la reconstrucción filogenética y una secuencia como outgroup. Se realizó la lectura de nucleótidos y aminoácidos de las secuencias COI y Cyt B, empleando el código genético de la mitocondria de invertebrados, posteriormente se ejecutó una prueba de modelos de sustitución de nucleótidos en MEGA 6.06. La reconstrucción de la filogenia de cada gen se realizó con el método de Máxima verosimilitud (ML) el modelo de sustitución de nucleótidos que se obtuvo para el gen COI fue el General Tiempo Reversible con distribución gama y sitios invariables (GTR+G+I), en tanto que para el gen Cyt B fue el General Tiempo Reversible más distribución gama (GTR+G). El modelo de sustitución de aminoácidos para el gen COI fue Jones Taylor Thornton y distribución gama (JTT+G), en tanto que para el Cyt B fue Hasegawa Kishino Yano y sitios invariables (HKY + I).

En ambos casos se realizaron 500 repeticiones de bootstrap (Felsenstein, 1985). Los árboles para ambos casos se generaron con raíz, utilizando a la especie *Caryedon gonagra* con número de acceso KP216604 (GEN COI) y KP226600 (Cyt B).

2.3. Resultados y Discusión

2.3.1 Identificación taxonómica. De las colectas realizadas durante tres años (2013-2015) en la zona de abasto del Ingenio Emiliano Zapata, se determinó la presencia de un complejo de diez especies del género *Phyllophaga*: *P. riverana* Morón, *P. rzedowskiana* Aragón y Morón, *P. hoogstraali* Saylor, *P. batillifer* (Bates), *P. porodera* (Bates), *P. fulviventris* (Moser), *P. martinezpalcios* Morón, *P. ilhuicaminai* Morón, *P. lenis* (Horn) y *P. brevidens* (Bates), representantes de cuatro subgéneros: *Phyllophaga*, *Chlaenobia*, *Phytalus* y *Listrochelus*.

2.3.2 Estudio molecular. El análisis comparativo entre las secuencias que se obtuvieron y las que están depositadas en la base de datos de NCBI de los dos genes estudiados en el presente estudio para el género *Phyllophaga* señala que el gen Citocromo Oxidasa I es el que se encuentra mejor representado. De esta región se encontraron 160 secuencias que corresponden a 27 especies con una cobertura aproximada del 90% y 84% de similitud. La mayoría de las especies registradas en el banco de genes no se encuentran reportadas para México y ninguna de las especies analizadas de Morelos presentó similitud mayor al 90%. Por otro lado, no se encontraron secuencias del gen Cyt B para este género. El grupo de comparación para la reconstrucción filogenética de ambos genes fue la especie *Caryedon gonagra* (Coleóptera: Bruchidae).

En el caso del gen COI, las secuencias resultantes de este estudio comparadas con las del banco de genes (NCBI) presentan 289 sitios variables y 411 sitios conservados a nivel de nucleótido, en tanto que a nivel de aminoácidos es de 207 sitios variables y 25 sitios conservados.

Para el gen Cyt B, las secuencias resultantes para las siete especies analizadas en este estudio, presentan 201 sitios variables y 269 sitios conservados a nivel de nucleótidos, en tanto que para aminoácidos presentan 44 sitios variables y 112 sitios conservados a nivel de aminoácidos.

El modelo de sustitución de nucleótidos para el gen COI del grupo de datos analizados fue GTR+G+I (General Tiempo Reversible + distribución gama + sitios invariables) con un valor del parámetro gama de 0.70, que resultó con un score de 9398.239 (BIC). En tanto que para aminoácidos el modelo de sustitución fue JTT+G (Jones Taylor Thornton y distribución gama) con un valor del parámetro gama de 1.32 y score resultante de 10132.256 (BIC).

El modelo de sustitución de nucleótidos para el gen Cyt B del grupo de datos analizados fue GTR+G (General Tiempo Reversible + distribución gama) con un valor del parámetro gama de 0.27, que resultó con un score de 3641.081 (BIC). En tanto que para aminoácidos el modelo de sustitución fue HKY+ I (Hasegawa Kishino Yano + sitios invariables) con un valor de sitios invariables de 0.56 y score resultante de 3639.519 (BIC).

La reconstrucción filogenética para el gen COI con el método de Máxima verosimilitud para nucleótidos y aminoácidos no soporta la identidad morfológica de las especies del género *Phyllophaga* estudiadas, obteniendo valores bootstrap por debajo del 75% (Fig.11-12), El análisis para nucleótidos agrupa las especies de México no así el de aminoácidos.

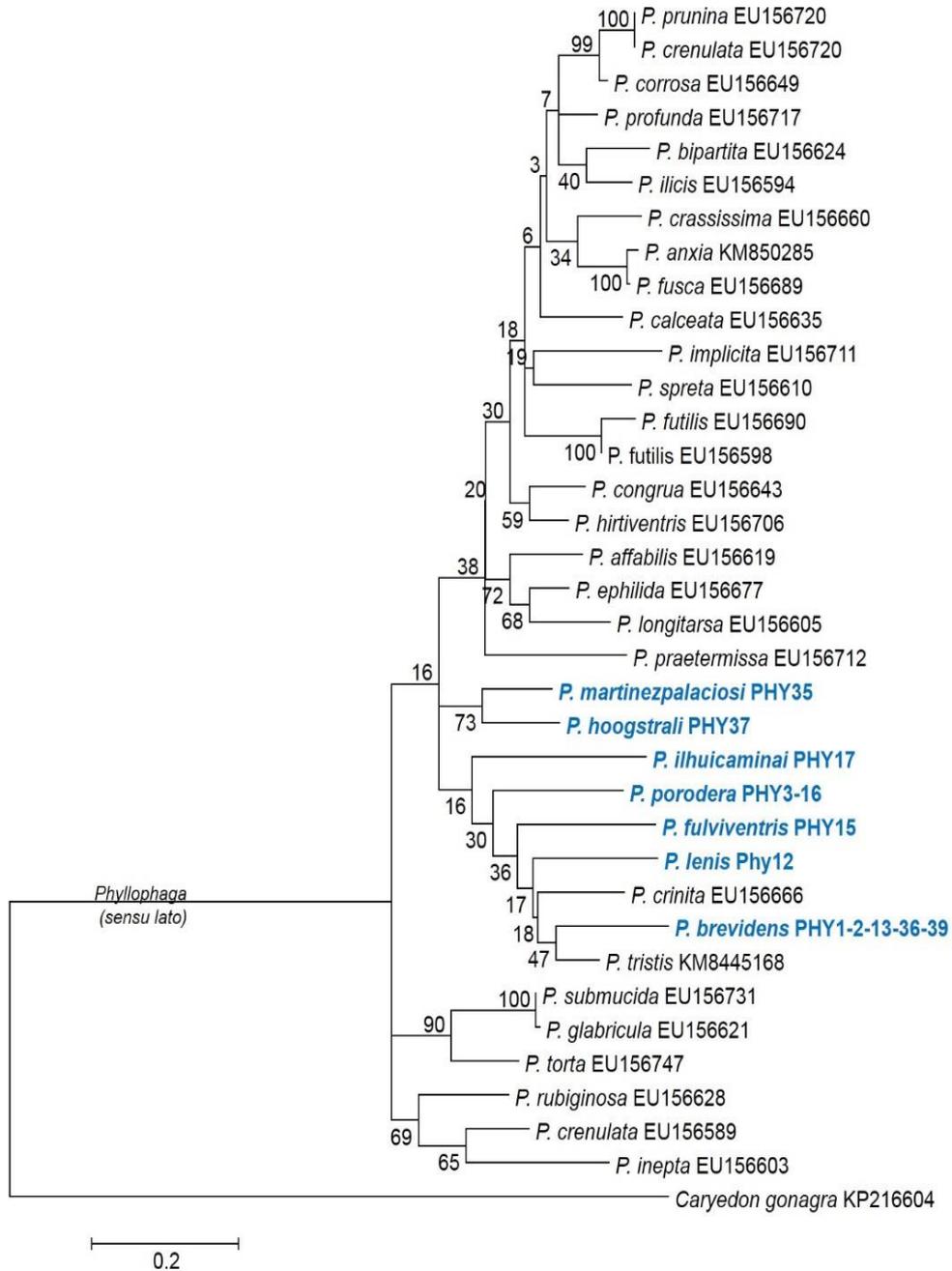


Figura 11. Reconstrucción filogenética de *Phyllophaga* de la región Citocromo Oxidasa I (COI) (nucleótidos), con el método de Máxima verosimilitud, modelo General Tiempo Reversible, distribución gama y sitios invariables (GTR+ G+ I) y 500 repeticiones de Bootstrap. Árbol construido con raíz. Literal S=subgénero, G=grupo.

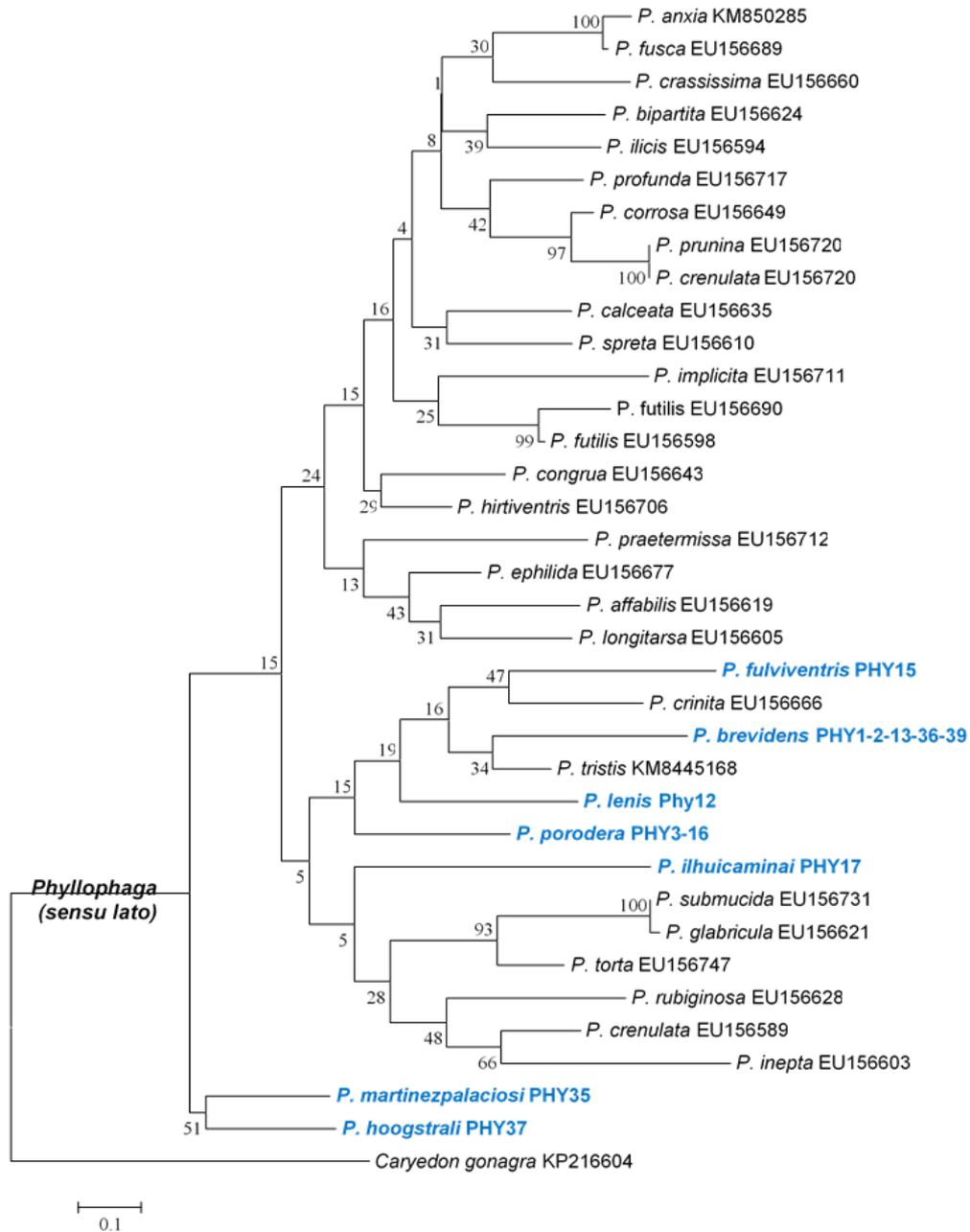


Figura 12. Reconstrucción filogenética de *Phyllophaga* de la región Citocromo Oxidasa I (COI) (aminoácidos), con el método de Máxima verosimilitud, modelo Jones Taylor Thornton y distribución gama (JTT + G) y 500 repeticiones de Bootstrap. Árbol construido con raíz. Literal S=subgénero, G=grupo.

La reconstrucción filogenética para el gen Cyt B (Fig. 13-14) con Máxima verosimilitud para nucleótidos y aminoácidos soportan la identidad morfológica en algunos grupos con niveles $\Rightarrow 70\%$ de bootstrap, que señalan que los grupos son reales, en el sentido de que agrupa las especies a nivel de subgénero y grupos de *Phyllophaga* (*sensu lato*), coincidiendo con la clasificación taxonómica propuesta por Móron (1986) para las especies de *Phyllophaga* de México y respalda lo que señala

Meyer *et al.* (1994), al señalar al gen Cyt B es un marcador útil para la separación de complejos de especies y especies morfológicamente similares. Es importante señalar que éste gen fue más fácil de amplificar en comparación con el COI por lo que podría ser considerado como una opción la identificación de subgéneros, grupos y especies de *Phyllophaga*.

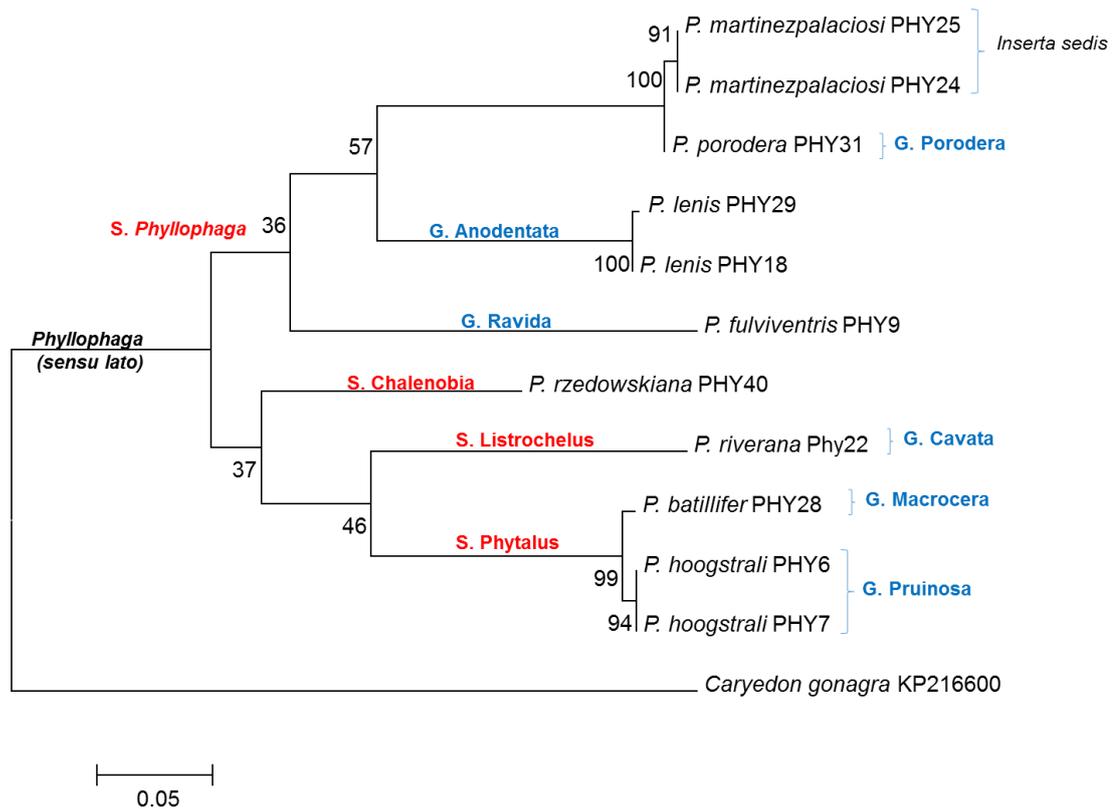


Figura 13. Reconstrucción filogenética de *Phyllophaga* de la región Cyt B (nucleótidos), con el método de Máxima verosimilitud, modelo General Tiempo Reversible y distribución gama (GTR + G) y 500 repeticiones de Bootstrap. Árbol construido con raíz. Literal S=subgénero, G=grupo.

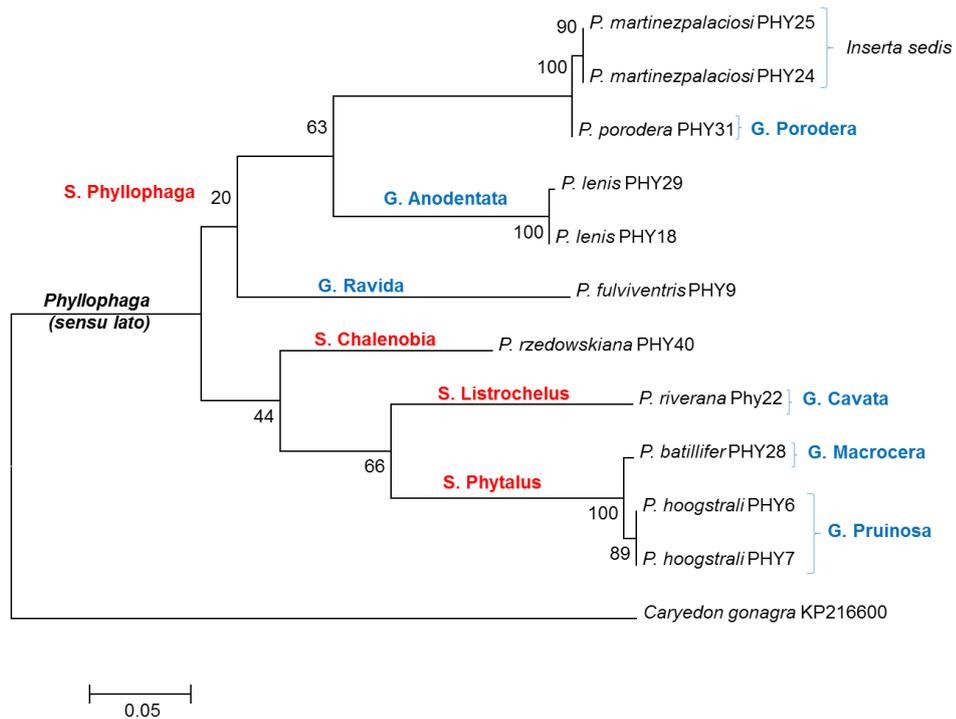


Figura 14. Reconstrucción filogenética de *Phyllophaga* de la región Cyt B (aminoácidos), con el método de Máxima verosimilitud, modelo Hasegawa Kishino Yano y sitios invariables (HKY+I) y 500 repeticiones de Boostrap. Árbol construido con raíz. Literal S=subgénero, G=grupo.

La información que se tiene hasta el momento de los genes COI (código de barras) y Cyt B no permite el uso de la base de datos existente para la identificación de las especies presentes en México, por lo que es importante continuar este tipo de trabajos para construir una base de datos que sea una base para la identificación de las especies de del género *Phyllophaga* presentes en México.

La principal contribución de este trabajo es la base de datos molecular de las secuencias que se encuentran en proceso de ser depositadas en base de datos NCBI, que permitirá la identificación molecular de adultos e inmaduros de estas especies, usando los genes COI y Cyt B de la mitocondria.

Finalmente para dilucidar la filogenia del grupo *Phyllophaga*, se sugiere el uso del gen Cyt B en un mayor número de especies, para saber si a mayor número de taxon los grupos taxonómicos se mantienen e incrementan su nivel de confianza.

2.4 Referencias Citadas

- Baker, C.S., F. Cipriano, S. R. Palumbi. 1996. Molecular Genetic Identification of Whale and Dolphin Products from Commercial Markets in Korea and Japan. *Mol. Ecol.* 5(5):671-685.
- Delobel A., M. Sembéne, G. Fédière, D. Roguet. 2003. Identity of the groundnut and tamarind seed-beetles (Coleoptera: Bruchidae: Pachymerinae), with the restoration of *Caryedon gonagra* (F.). *Ann. Soc. Entomol. Fr. (n.s.)* 39 (3): 197-206.
- Doskoncil, J. P., N. R. Walker, G. E. Bell, S. M. Marek, J. A. Reinert, and T. A. Royer. 2008. Species Composition and Seasonal Occurrence of *Phyllophaga* (Coleoptera: Scarabaeidae) Infesting Intensely Managed Bermudagrass in Oklahoma. *J. Econ. Entomol.* 101(5): 1624-1632
- Emerson, B. C., and G. P. Wallis. 1995. Phylogenetic relationships of the *Prodontria* (Coleoptera; Scarabaeidae; subfamily Melolonthinae), derived from sequence variation in the mitochondrial cytochrome oxidase II gene. *Mol. Phylogenet. Evol.* 4 (4):433-447
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Galtier, N., B. Nabholz, S. Glémin, G. D. Hurst. 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Mol. Ecology.* 18 (22): 4541-50.
- Hebert P. D. N, A. Cywinska, S. L. Ball, J. R. Dewaard. 2003, Biological Identifications through DNA Barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 270(1512):313-321.
- INEGI. 2010. División municipal, Morelos. Consultado en Diciembre 2015, en línea http://www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/mor/territorio/div_municipal.aspx?tema=me&e=17
- Irwin D.M., T. D. Kocher, A. C, Wilson. 1991. Evolution of the cytochrome b gene in mammals. *J. Mol. Evo.* 32: 128-144.

- Luginbill, P., Sr., and H. R. Painter. 1953. Maybeetles of the United States and Canada. U.S. Dep. Agric. Washington, DC. Tech. Bull. No. 1060. Washington, DC.
- Meyer, A. 1994. Shortcomings of the Cytochrome b gene as a molecular marker. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 278-280.
- Mitchell, P. 1976. Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. *J. Theor. Biol.* 62 (2): 327-367
- Morón, M. A. 1986. El género *Phyllophaga* en México. Morfología, distribución y sistemática supraespecífica (Insecta: Coleoptera). Publicación 20. Instituto de Ecología, México. 344 p. ISBN-968-7213-02-7
- Morón, M. A. 1986. El género *Phyllophaga* en México. Morfología, distribución y sistemática supraespecífica (Insecta: Coleoptera). Publicación 20. Instituto de Ecología, México. 344 p. ISBN-968-7213-02-7
- Morón, M. A., B. C. Ratcliffe, C. Deloya. 1997. Atlas de los escarabajos de México. Coleoptera: Lamellicornia Vol. I Familia Melolonthidae Subfamilias Rutelinae, Dynastinae, Cetoniinae, Trichinae, Valginae y Melolonthinae. Sociedad Mexicana de Entomología. Veracruz, México. pp. 205-264. ISBN-9680-7801-00-X
- Morón, M. A. 2004. Revision of the *cavata* group of *Phyllophaga* (*Listrochelus*) Blanchard (Coleoptera: Melolonthidae: Melolonthinae) *Ann. Entomol. Soc. Am.* 91: 77-96.
- Romero-Nápoles, J., y O. L. Segura-León. 2015. Estatus Taxonómico de *Caryedon serratus* (Olivier) en México. *Southwestern Entomologist*, 40(2):387-396.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. 2015. MEGA 6.06 Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.

- Teletchea, F. J. Bernillon, M. Duffraisie, V. Laudet, C. Hänni. 2008. Molecular Identification of Vertebrate Species by Oligonucleotide Microarray in Food and Forensic Samples. *J. Appl Ecol.* 45 (3): 967-975.
- Wagner, D. B., G. R. Furnier, M. A. Saghay-Marroof, S. M. Williams, B. P. Dancik, y R. W. Allard. 1987. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 84, 2097–2100.
- Zaragoza-Ortega, M., J. Hernández-Cruz, M. A. Moron, J. M. Valdez-Carrasco, S. Sánchez-Soto, O. L. Segura-León. 2016. *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae) en la Zona Cañera de Morelos, México. *Soutwestern Entomologist*. En prensa.

CAPÍTULO III. CAPTURA DE ESPECIES DE *Phyllophaga* (COLEOPTERA: MELOLONTHIDAE) CON METHYL 2-(METHYLTHIO)-BENZOATE Y LUZ EN EL CULTIVO DE CAÑA DE AZÚCAR, MORELOS, MÉXICO

Resumen. Se evaluó el compuesto Methyl 2-(methylthio)-benzoate, atrayente sexual de algunas especies de *Phyllophaga* (F), en combinación con la luz led (L), para determinar su capacidad de captura dentro del cultivo de caña de azúcar. Se evaluaron cuatro tratamientos F, F+L, L y testigo sin atrayente y sin luz (T), con tres repeticiones, distribuidos bajo un diseño completamente al azar en 1 ha de cultivo, de marzo a julio de 2014 y 2015, en San Miguel Treinta, Tlaltizapan, Morelos. En cada tratamiento se evaluó el número de insectos y especies capturadas así como la capacidad de atracción de hembras y machos. El total de individuos capturados por tratamiento fueron: F= 53, F+L= 280, L= 16, y T= 0. Dos especies del género *Phyllophaga* respondieron al compuesto en diferentes proporciones, *P. brevidens* (Bates) y *P. lenis* (Horn). La primera fue la más abundante con 271 individuos, y de la segunda se capturaron 55 ejemplares, las cuales difieren de las señaladas por otros autores. Además en las trampas con F+L se registró un mayor número de hembras que la luz sola. Los resultados señalan que la combinación de Methyl 2-(methylthio)-benzoate y luz led, puede ser un método selectivo para el manejo de estas especies de importancia agrícola, al tener la capacidad de atracción de hembras y machos.

3.1 Introducción

Los coleópteros del género *Phyllophaga* (*sensu lato*), conocidos comúnmente como mayates de mayo o gallinas ciegas en estado larvario, constituyen una plaga importante en varios cultivos. Los adultos atacan el follaje de numerosos cultivos, aunque los estados inmaduros tienen mayor importancia económica, puesto que se alimentan de la raíz y ocasionan marchitamiento y muerte de las plantas (Morón, 1986, Riees y Flores, 1976). Los reportes de daños más severos ocasionados por gallinas ciegas se citan para las zonas productoras de maíz y caña de azúcar. En Tamaulipas se reportan pérdidas que alcanzan el 48% de la producción de maíz (Villalobos, 1998), en tanto que en Morelos las pérdidas son equivalentes al 32% en el mismo cultivo (Villalobos *et al.* 2001; Núñez-Valdez *et al.* 2002). Por esto, es necesario realizar un manejo integrado, en donde el control etológico puede ser una

alternativa prometedora para el manejo de esta plaga. Ésta técnica aprovecha el comportamiento de los insectos en respuesta a la presencia de un estímulo de naturaleza física, química o mecánica (Wood-Gush, 1983).

La comunicación química por feromonas y atrayentes para coleópteros es ampliamente reconocida, y hay una gran diversidad de compuestos, basados principalmente en derivados isopropenoides, ácidos grasos y aminoácidos (Tillman *et al.* 1999). En particular para el género *Phyllophaga* la base de datos de feromonas y semioquímicos (Pherobase) cita 20 compuestos, entre ellos los ácidos palmítico, linoleico y esteárico; además de 1- octadecanol, 11-n-deciltetracosano (Romero-López, 2003), ester metil de L- isoleucina (Zhang *et al.* 1997; Leal *et al.* 2003, Nojima *et al.* 2003), y Methyl 2-(methylthio)-benzoate (Robbins *et al.* 2003, Robbins *et al.* 2006, Robbins *et al.* 2011, Morales-Rodríguez *et al.* 2011).

Por otro lado el uso de trampas de luz es una técnica ampliamente conocida para la captura de melolonthidos adultos (Alcazar- Ruiz *et al.* 2003, Aragón-García *et al.* 2008, Lugo-García *et al.* 2011, Hernández- Cruz *et al.* 2014); sin embargo, este tipo de trampas está asociado a corriente eléctrica o al tiempo de duración de las baterías, lo que dificulta su uso en campo, donde comúnmente se carece de energía eléctrica y el uso de baterías requiere de cambios diarios, lo que incrementa los costos de operación. Por lo anterior el uso de trampas de luz donde la fuente de energía son celdas solares, pueden ser una alternativa económica, práctica y ecológicamente viable para la captura de estos insectos de interés económico y ecológico. Por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue evaluar el atrayente sexual Methyl 2-(methylthio)-benzoate y luz led generada por una celda solar de manera independiente y en combinación para la captura de especies del género *Phyllophaga*, en el cultivo caña de azúcar.

3.2 Material y Métodos

3.2.1 Características del área de estudio. La investigación se realizó en la localidad de San Miguel Treinta, Tlaltizapan, Morelos, ubicado geográficamente en 18° 43' 06.6" N; 99° 10' 50.2" W, a una altitud de 990 msnm, con clima cálido

subhúmedo, temperatura media anual de 23.5°C, una precipitación pluvial de 840 milímetros anuales y el periodo de lluvias es de junio a octubre (Fig. 1) (INEGI, 2010).

3.2.2 Tratamientos. Las trampas que se utilizaron en el estudio se elaboraron con bandejas de plástico de 5 L y de 35 cm de diámetro, sobre las cuales se colocaron tapas de plástico de similar diámetro sostenidas con tiras de aluminio de 2.5 cm de ancho que permitieron una separación entre estas de 20 cm. En la parte central de las tapas se perforó un círculo de 6 cm de radio, en donde se insertó la lámpara led de (1.2 volts) con una celda solar de 5.4 x 4 cm. En las trampas cebadas con el atrayente sexual, el liberador se colocó en la parte inferior de la tapa (Fig. 15).



Figura 15. Sistema para la captura de *Phyllophaga* F+L.

Para las trampas cebadas se emplearon liberadores de caucho rojo con 1 mg de Methyl 2-(methylthio)-benzoate (Santa Cruz Biotechnology). Los liberadores se guardaron en bolsas de polietileno a -20°C, hasta el momento de su uso. Durante el periodo de colecta se colocó agua con detergente en la tina para retener los ejemplares colectados.

Los tratamientos que se evaluaron fueron: Methyl 2-(methylthio)-benzoate, atrayente sexual de *Phyllophaga* (F), luz (L), F+L y testigo sin atrayente y sin luz (T). La variable evaluada fue el número de *Phyllophaga* adultos colectados por especie. La muestra colectada se conservó en alcohol para su separación morfoespecífica, montaje y determinación específica. El atrayente sexual se cambió cada 30 días. Se realizó un diseño completamente al azar, con cuatro tratamientos y tres repeticiones evaluados en dos periodos de marzo-julio 2014-2015 con ocho fechas cada uno, en una hectárea de cultivo de caña de la variedad MY 55-14. Los datos obtenidos se

sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) con 95% de confiabilidad ($\alpha=0.05$), y comparación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$), en el programa SAS version 9.0.

3.3 Resultados y Discusión

Durante los dos años de colecta en el área de estudio se obtuvo un total de 349 adultos del género *Phyllophaga*; el 6.6% fueron hembras y el 93.4% machos. Las especies capturadas fueron *P. brevidens* y *P. lenis* (Horn) (Bates), ambas del género *Phyllophaga*, subgénero *Phyllophaga*, grupo anodontata (Zaragoza-Ortega *et al.* 2016). El marcado predominio de la primera especie citada puede notarse en el anexo 2. El número de capturas por año, tratamiento, especie y sexo fueron variables. En 2014 se capturaron 255 ejemplares; de éstos, 205 fueron de *P. brevidens*, 35 de *P. lenis* machos y 15 hembras no determinadas hasta el momento (nd), mientras que en 2015 se obtuvieron 94 adultos; 66 fueron de *P. brevidens*, 20 *P. lenis*, y 8 hembras nd.

Las capturas por tratamiento fueron: F=53 (46 *P. brevidens* y 7 *P. lenis*), F+L=280 (216 *P. brevidens*, 47 *P. lenis* y 17 hembras nd), L=16 (9 *P. brevidens*, 1 *P. lenis*, y 6 hembras nd), T= 0 (Fig. 16-17).

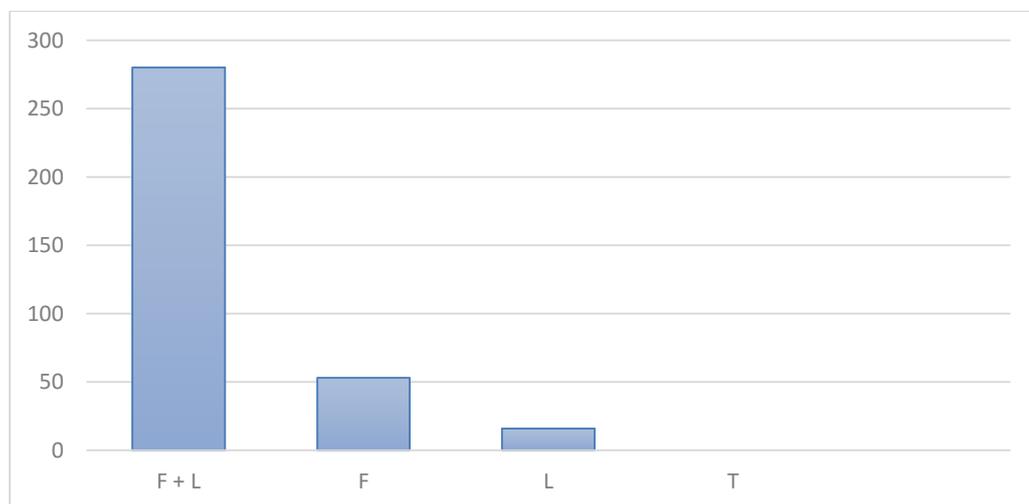


Figura 16. Capturas totales de *Phyllophaga* (*sensu lato*) por tratamiento en Tlaltizapan, Morelos.

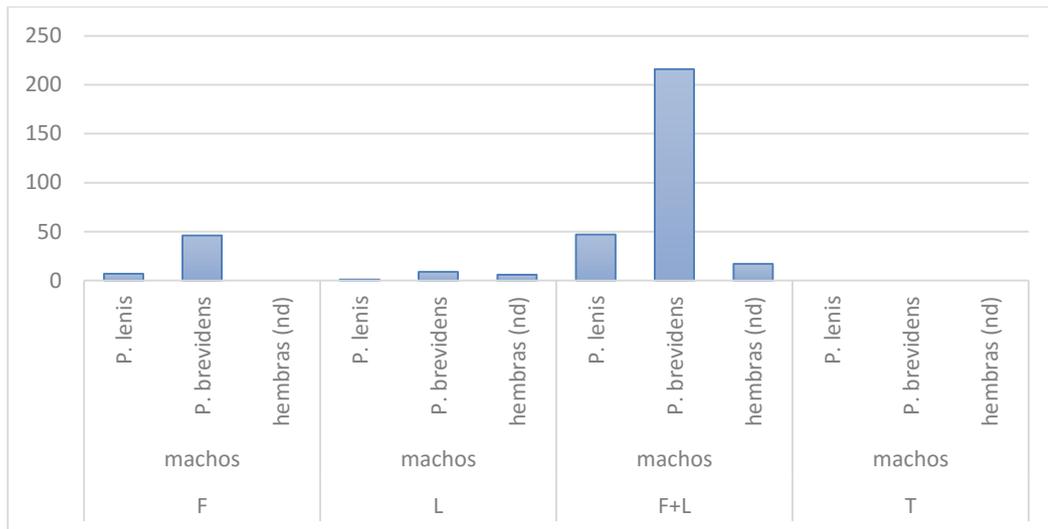


Figura 17. Capturas totales de *Phyllophaga* por especie, sexo y tratamiento en Tlaltizapan, Morelos.

El análisis de varianza (ANOVA) señala diferencias significativas al $P < 0.05$ entre tratamientos. En donde el tratamiento con F+L (atrayente sexual + luz) resultó ser el más eficiente de todos los tratamientos evaluados para la captura de *Phyllophaga*. En tanto que la L, F y T fueron estadísticamente iguales (Cuadro 3).

Cuadro 3. Análisis de varianza entre tratamientos de capturas de *Phyllophaga* en los periodos de muestreo (marzo-julio 2014, 2015), en Tlaltizapán, Morelos.

Tratamiento	Media	r	Agrupación Tukey
F+ L	5.833	48	A
F	1.104	48	B
L	0.333	48	B
T	0.000	48	B

Literal mayúscula distinta en la misma columna son diferentes ($p < 0.05$)

Los resultados de los tratamientos evaluados señalan que Methyl 2-(methylthio)-benzoate es un compuesto de atracción exclusivo de machos del género *Phyllophaga*. Esto coincide con los resultados obtenidos por Robbins *et al.* (2011) y Morales-Rodríguez *et al.* (2011), que señalan que este compuesto tiene capacidad de atracción para más de una especie. Las especies capturadas en el estado de Morelos, *P. brevidens* y *P. lenis*, son diferentes a las citadas en otras regiones de América, en

donde con el mismo compuesto se capturaron a *P. crinita* en Dallas, Texas, especie de la cual se identificó el compuesto (Robbins *et al.* 2003), *P. tristis* en Greensburg, Kansas, *P. apicata* de Gainesville, Texas en Estados Unidos (Robbins *et al.* 2011), y a *P. menetriesi* y *P. lissopyge* en Sudamerica (Morales-Rodríguez *et al.* 2011), todas pertenecientes al género *Phyllophaga* y la mayor parte de las especies citadas aquí están incluidas en el grupo anodentata.

Estos resultados hasta el momento señalan que el compuesto Methyl 2–(methylthio)-benzoate puede ser utilizado como una alternativa de captura selectiva, para la detección de *P. brevidens* y *P. lenis*. Por otro lado, la fototaxis positiva para la captura de adultos de gallina ciega está ampliamente documentada para melolónthidos (Alcazar-Ruiz *et al.* 2003, Aragón-García *et al.* 2008, Lugo-García *et al.* 2011, Hernández- Cruz *et al.* 2014), aunque, el uso de trampas de luz con lámparas led donde la energía es abastecida con celdas solares en combinación con atrayentes sexuales no se han reportado para este grupo. Durante los dos años evaluados, se observó que la combinación de Methyl 2–(methylthio)-benzoate con luz led muestran un efecto sinérgico, con un notable incremento en el número de capturas con respecto a los dos tratamientos independientes. La capacidad de captura del atrayente sexual y la luz se multiplicó 5.2 veces en comparación con el uso exclusivo del atrayente y 17.5 veces usando luz. Resultados similares con ésta metodología se han observado en otros insectos (Monserrat, 2008). Por otro lado la capacidad de captura de hembras se incrementó con respecto a la luz led sola, por lo que el uso de F+L puede ser una alternativa selectiva, ecológica, económica y de fácil manejo de estas especies, reportadas como plagas potenciales para el cultivo de caña de azúcar y maíz (Rodríguez del Bosque y Morón, 2011), debido a que en el estudio sobre las especies de *Phyllophaga* en la misma zona cañera de Morelos y durante los mismos años señalan mayor diversidad de especies de *Phyllophaga* presentes en la zona (Zaragoza-Ortega *et al.* 2016).

En conjunto los resultados derivados de la investigación, señalan que el atrayente sexual y la luz led tienen mayor capacidad de captura. La combinación de ambos métodos permite no solo la colecta de machos de dos especies de importancia agrícola, sino también la de hembras, por lo que su uso con fines de manejo puede tener una mayor eficiencia.

Finalmente, la respuesta de más de una especie de *Phyllophaga* en diferentes regiones geográficas a Methyl 2-(methylthio)-benzoate, pudiera proporcionar información útil para conocer el proceso de diversificación de las especies de este grupo (Coca- Abia and Robbins, Robbins *et al.* 2011), ya que la filogenia de éste género es complicada.

3.4 Referencias citadas

- Alcazar- Ruiz, J. A., A. Morón- Riós, M. A. Morón. 2003. Fauna de Coleóptera Melolonthidae, de Villa de las Rosas, Chiapas, México. Acta Zoológica Mexicana (Nueva serie) 88. 59-86 pp.
- Aragón- García, A., C. D. Nochebuena-Trujillo, M. A. Morón, y J. F. Lopez-Olguín. 2008. Uso de trampas de luz fluorescente para el manejo de gallina ciega (Coleoptera: Melolonthidae) en maíz (*Zea mays* L.). Agrociencia 48 (2).
- Coca-Abia, M. M and P. S. Robbins. 2006. Taxonomy and phylogeny of a new Central American beetle genus *Catrachia* (Coleoptera: Scarabaeidae). Revista de Biología Tropical. 54 (2): 519-529
- Hernández- Cruz, J., M. A. Morón, J. Ruiz-Vega, J. A. Sánchez-García, L. Martínez-Martínez, y R. Pérez-Pacheco. 2014. Bionomía de las especies de *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae) en Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México. Acta Zoologica Mexicana 30(1): 144-160.
- INEGI. 2010. División municipal, Morelos. Consultado en diciembre 2015, en línea http://www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/mor/territorio/div_municipal.aspx?tema=me&e=17
- Leal, W. S., A. C. Oehlschlager, P. H. G. Zarbin, E. Hidalgo, P.J. Shannon, y. Murata, L. González, R. Andrade and M. Ono. 2003. Sex pheromone of the scarab beetle *Phyllophaga elenans* and some intriguing minor components. Journal of Chemical Ecology, 29: 15-25.
- Lugo-García G. A., M. A. Morón, A. Reyes-Olivas, A. Aragón-García, L. D. Ortega-Arenas, H. Cota-Sánchez. 2011. Riqueza de escarabajos con hábitos nocturnos (Coleoptera: Scarabaeoidea) en islas de las bahías de Ohuira y Navachiste, Sinaloa, México. Dugesiana 18(1): 1-10
- Montserrat, D. A. 2008. La Palomilla del tomate, "*Tuta absoluta*" en la región de Murcia: bases para su control. Consejería de Agricultura y agua, Región de Murcia. 74pp. Consultado en diciembre 2015, en línea

http://archives.eppo.int/MEETINGS/2011_conferences/tuta/Monserrat_Murcia_monografia_Tuta.pdf

Morales-Rodríguez, A., D. C. Peck, P. S. Robbins. 2011. First Record of the Scarab Beetle, *Phyllophaga lissopyge* from South America, with Descriptions of Adult Seasonal Activity and Male Response to Sex Attractants. *Journal of Insect Science*: 11: 23.

Morón, M. A. 1986. El género *Phyllophaga* en México. Morfología, distribución y sistemática supraespecífica (Insecta: Coleoptera). Publicación 20. Instituto de Ecología, México. 344 p. ISBN-968-7213-02-7

Nojima, S., P.S. Robbins, G.A. Salsbury, B.D. Morris, W.L. Roelofs and M. G.Villani. 2003. L-leucine methyl ester: the female-produced sex pheromone of the scarab beetle *Phyllophaga lanceolata*. *Journal of Chemical Ecology*, 29: 2439-2446.

Núñez-Valdez. M. E., A. Romero, R. Arzuffi, A. L. Llanos, M. E. Valdés, R. Figueroa y F. J. Villalobos. 2002. Agrobiotecnología aplicada al manejo integrado de plagas subterráneas: un enfoque promisorio para el manejo de la gallina ciega (Coleoptera: Scarabaeidae) y el picudo negro del nardo y agave (Coleoptera: Curculionidae). En Aragón, A. y J. F. López-Olguín (Eds). Métodos para la generación de tecnología de punta.

Pherobase. 2016. Consultado en enero 2016, en línea <http://www.pherobase.com/>

Riess, C. M., S. Flores. 1976. Catálogo de plagas y enfermedades de la caña de azúcar en México. Comisión Nacional de la Industria Azucarera. Instituto para el Mejoramiento de la Producción de azúcar. México.

Robbins, P.S., R. L. Crocker, S. Nojima, B. D. Morris, W.L. Roelofs and M.G. Villani. 2003. Methyl 2-(methylthio) benzoate: the unique sulfur-containing sex pheromone of *Phyllophaga crinita*. *Naturwissenschaften*, 90: 517-520.

Robbins, P. S., S. R. Alm, C. Amstrong, A. L. Averill, T. C. Baker, R. J. Bauernfiend, F. P. Baxendale, S. K. Braman, R. L. Brandenburg, D. B. Cash, G. J. Couch, R. S. Cowles, R. L. Cocker, Z. D. DeLmar, T. G. Dittl, S. M. Fitzpatrick, K. L. Flanders, T. Forgatsch, T. J. Gibb, B. D. Gill, D. O. Gilrein, C. S. Gorsuch, A.

- M. Hammond, P. D. Hastings, D. W. Held, P. R. Heller, R. T. Hiskes, J. L. Holliman, W. G. Hudson, M. G. Klein, V. L. Krischik, D. J. Lee, C. E. Linn Jr., N. J. Luce, K. E. MacKenzie, C. M. Mannion, S. Polavarapu, D. A. Potter, W. L. Roelofs, B. M. Royals, G. A. Salsbury, N. M. Schiff, D.J. Shetlar, M. Skinner, B. L. Sparks, J. A. Sutschek, T. P. Sutschek, S. R. Swier, M. M. Sylvia, N. J. Vickers, P. J. Vittum, R. Weidman, D. C. Weber, R. C. Williamson, and M. G. Villani. 2006. Trapping *Phyllophaga* spp. (Coleoptera: Melolonthidae) in the United States and Canada using sex attractants. *Journal of Insect Science*, 6(39):1-124.
- Robbins, P.S., G. A. Salsbury, R. E. Woodruff, S.L. Lapointe and C. E. Linn, Jr. 2011. Methyl 2-(methylthio) benzoate: A sex attractant for the June beetles, *Phyllophaga tristis* and *P. apicata*. *Journal of Insect Science*: 11. 108
- Rodríguez del Bosque, L. A., M. A. Morón. 2011. *Plagas del suelo*. Mundi Prensa. México D. F. 416 p. ISBN-078-100-07-769906-04
- Romero-López, A. A., R. Arzuffi, F.J. Villalobos y M.A. Morón. 2003. Comportamiento sexual de *Phyllophaga obsoleta*. (Coleoptera: Melolonthidae). pp. 197-202. In: Romero-Nápoles, J., E. G. Estrada y A. Equihua (eds.). *Entomología Mexicana*.
- Sas Institute. 2014. *V 9.0. Statistical Analysis Systems*, Colegio de Postgraduados, Montecillos, Estado de México, México.
- Tillman, J.A., S.J. Seybold, R.A. Jurenka and G.J. Blomquist. 1999. Insect pheromones and overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 481-514.
- Villalobos, F. J. 1998. Bioecology and sustainable management of white grubs (Coleoptera: Melolonthidae) pest of corn in el Cielo biosphere reserve, Tamaulipas, México. In. M. A. Morón y A. Aragón (eds). *Avances en el estudio de la diversidad, Importancia y Manejo de los Coleópteros Edafícolas Americanos*. Pub. Esp. de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y la Sociedad Mexicana de Entomología. Puebla. México. pp 173-184
- Villalobos, F. J., A. Romero-López, M. E. Núñez-Valdez. 2001. Diagnóstico del problema causado por gallina ciega en cultivos de maíz del Estado de Morelos.

En Memorias del 1er Simposium de Manejo Integrado de Plagas del Estado de Morelos. UAEM, Morelos, México. 27 p.

Wood-Gush, D. G. M. 1983. Elements of ethology. A text book for agricultural and veterinary students. ISBN: 978-94-009-5931-6

Zaragoza-Ortega, M., J. Hernández-Cruz, M. A. Moron, J. M. Valdez-Carrasco, S. Sánchez-Soto, O. L. Segura-León. 2016. *Phyllophaga* (Coleoptera: Melolonthidae) en la Zona Cañera de Morelos, México. Soutwestern Entomologist. En prensa.

Zhang, A., P.S. Robbins, W.S. Leal, C.E. Linn JR., M. G. Villani and W. L. Roelofs. 1997. Essential amino acid methyl esters: major sex pheromone components of the cranberry white grub, *Phyllophaga anxia* (Coleoptera: Scarabaeidae). Journal of Chemical Ecology, 23: 231-245.

Anexo 2.

Resultados de las capturas de *Phyllophaga* durante el muestreo marzo-julio 2014, 2015 en Tlaltizapan, Morelos.

Año	No. de muestreo	Fecha de muestreo	T1 FEROMONA		T2 LUZ		T3 FEROMONA + LUZ			T4 TESTIGO		Total	
			<i>P. lenis</i>	<i>P. brevidens</i>	<i>P. lenis</i>	<i>P. brevidens</i>	Hembras (nd)	<i>P. lenis</i>	<i>P. brevidens</i>	Hembras (nd)	<i>P. lenis</i>		<i>P. brevidens</i>
2014	1	21 de marzo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	255
	2	4 de abril	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	
	3	18 de abril	0	10	0	6	4	0	19	0	0	0	
	4	08 de mayo	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
	5	22 de mayo	0	5	0	0	0	3	18	4	0	0	
	6	29 de mayo	2	13	0	1	0	2	90	3	0	0	
	7	05 de junio	1	8	1	0	1	6	17	3	0	0	
	8	19 de junio	4	2	0	0	0	16	12	0	0	0	
	9	11 de junio	0	1	0	0	0	2	5	0	0	0	
	10	16 de junio	0	3	0	0	1	13	41	7	0	0	
2015	11	24 de junio	0	3	0	0	0	3	7	0	0	0	94
	12	29 de junio	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
	13	6 de julio	0	0	0	1	0	2	3	0	0	0	
	14	13 de julio	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
	15	23 de julio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	16	30 de julio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Conclusiones generales

1. El género *Phyllophaga* en la zona de abasto del Ingenio Emiliano Zapata, Morelos está compuesto por un complejo de diez especies: *P. riverana*, *P. rzedowskiana*, *P. hoogstraali*, *P. batillifer*, *P. porodera*, *P. fulviventris*, *P. martinezpalciosi*, *P. ilhuicaminai*, *P. lenis* y *P. brevidens*, representantes de cuatro subgéneros: *Phyllophaga*, *Chlaenobia*, *Phytalus* y *Listrochelus*, las cuales se caracterizaron morfológicamente y para cuya identificación se incluyó una clave dicotómica ilustrada de machos.
2. La reconstrucción filogenética para el gen COI, con el método de Máxima verosimilitud para nucleótidos y aminoácidos no soporta la identidad morfológica de las especies del género *Phyllophaga* estudiadas, obteniendo valores bootstrap por debajo del 70%, en tanto que para el gen Cyt B, usando el mismo método para nucleótidos y aminoácidos, soportan la identidad morfológica en algunos grupos con niveles superiores al 70% de bootstrap.
3. El compuesto Methyl 2-(methylthio)-benzoate, en combinación con la luz led, permitió capturar adultos de dos especies del género *Phyllophaga* (*P. brevidens* y *P. lenis*) en el cultivo de caña de azúcar, por lo que este tipo de trampas puede ser utilizado como una alternativa de captura selectiva y para la detección de estas dos especies de importancia agrícola.