

RESPUESTA DE MACHOS *Macroductylus mexicanus* Burmeister (COLEOPTERA: MELOLONTHIDAE) EN PRUEBAS DE OLFATÓMETRO Y EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS CON POSIBLES IMPLICACIONES QUÍMICO-ECOLÓGICAS

Sarai Cristina García-Canales✉ y Angel Alonso Romero-López

Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Boulevard Capitán Carlos Camacho Espíritu, Edificio 112- A, Ciudad Universitaria, Col. Jardines de San Manuel, Puebla, C. P. 72570, Puebla, México.

✉Autor de correspondencia: saraicgc.ac@yahoo.com

RESUMEN. Se construyó un olfatómetro de dos vías para la ejecución de bioensayos de preferencia. Se evaluó la respuesta de machos de *Macroductylus mexicanus* (Burmeister) hacia la cámara genital con glándulas accesorias de la hembra, hacia hembras y machos vivos, así como a hembras prefabricadas con material sintético. Los machos mostraron una preferencia significativa ($p < 0.05$) por las cámaras genitales con glándulas accesorias y por las hembras vivas, lo que permite sugerir que en estos eventos se encuentran involucrados estímulos químicos antes que estímulos de tipo visual. Posteriormente, a partir de extracciones directas con hexano, se obtuvieron muestras de las cámaras genitales con glándulas accesorias de hembras de esta especie. Los extractos se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), logrando obtenerse un perfil de los compuestos químicos presentes en dichas estructuras, los cuales podrían estar implicados en la comunicación química de esta especie..

Palabras clave: Comunicación química, bioensayos de preferencia, perfil químico, CG-EM.

Male response of *Macroductylus mexicanus* Burmeister (Coleoptera: Melolonthidae) in olfactometer tests and extraction of compounds with possible chemical-ecological implications

ABSTRACT. A two-way olfactometer was developed for the performance of choice bioassays. The male response of *Macroductylus mexicanus* (Burmeister) towards the female's genital chamber with accessory glands, to alive females and males, as well as to females made of synthetic material were evaluated. Males showed a significant preference ($p < 0.05$) for genital chambers with accessory glands and for alive females. This suggests that these events involve chemical stimuli rather than visual stimuli. Subsequently, were obtained extractions from the genital chambers with accessory glands of females using hexane as a solvent. The extracts were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), obtaining a profile of the chemical compounds present in these structures, which could be involved in the chemical communication of this species.

Keywords: Chemical communication, choice bioassays, chemical profile, GC-MS.

INTRODUCCIÓN

El estudio de la comunicación química de cualquier insecto, como en el caso de los miembros de la familia Melolonthidae (Cherman y Morón, 2014), ofrece información relevante acerca de su biología asociada a respuestas a estímulos de su entorno, entre ellos, los relacionados con la reproducción (Romero-López, 2016). Los sitios productores de feromonas pueden variar entre los insectos; sin embargo, el abdomen indica ser el sitio clave en muchas especies de Coleoptera (Tillman *et al.*, 1999). Diversos trabajos enfocados a la comunicación química de diferentes melolontidos han revelado que algunas de las estructuras que forman parte del aparato reproductor de las hembras están involucradas en la producción de atrayentes sexuales (Romero-López *et al.*, 2010, 2011). En el caso particular de *M. mexicanus*, se sabe que las hembras poseen una organización anatómica del aparato reproductor muy similar a la de otros melolontidos. La cámara genital y las glándulas accesorias de las hembras de *M. mexicanus* presentan un epitelio glandular secretor característico de sitios productores de atrayentes químicos (Benítez-Herrera *et al.*, 2015).

En el caso de la composición química de los atrayentes y feromonas de algunos integrantes de los Melolonthidae se han identificado derivados de ácidos grasos, de aminoácidos y terpenoides (Leal, 1998), así como derivados fenólicos (Hoyt *et al.*, 1971; Zarbin *et al.*, 2007; Romero-López y Arzuffi, 2010) y del colesterol (Romero-López, 2016) como componentes principales. La extracción e identificación de estas sustancias se efectúa con disolventes y consiste en depositar el tejido del insecto en pequeños viales con hexano o cloruro de metileno, durante un tiempo determinado para su posterior análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) (Malo y Rojas, 2012). La confirmación de la actividad biológica de los compuestos extraídos de las estructuras de las hembras de estos coleópteros se realiza por medio de bioensayos de preferencia, como son los fundamentados en la electroantenografía (Romero-López y Arzuffi, 2010; Subaharan *et al.*, 2013) y el olfatómetro (Romero-López y Arzuffi, 2010; Chakravarthy *et al.*, 2014). Todos ellos resultan de enorme utilidad para evaluar la libre elección de los insectos para dirigirse hacia los diferentes estímulos químicos. Sin embargo, en la mayoría de los casos estos dispositivos son costosos o de complejo armado y manipulación (Dal Bello y Padín, 2006).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la preferencia de machos *M. mexicanus* hacia la cámara genital con glándulas accesorias de la hembra, hacia hembras y machos vivos, así como a hembras “artificiales” con la finalidad de probar la atracción de dichos estímulos en un modelo de olfatómetro de dos vías. Asimismo, con el fin de obtener un perfil químico, se analizaron los extractos de las estructuras genitales consideradas como sitios de producción de atrayentes de esta especie.

MATERIALES Y MÉTODO

Diseño y fabricación del olfatómetro. Con base en la propuesta de Dal Bello y Padín (2006) se fabricó un olfatómetro con una sola pieza de acrílico, el cual consistió en un conducto cuadrangular de 30 cm de largo y 3.5 cm de cada lado, el cual se encuentra conectando dos recipientes cúbicos en cada extremo con dimensiones de 5.5 cm por lado. Cada uno de estos recipientes incluye compuertas para colocar cada estímulo a probar. El conducto conector fue perforado de manera equidistante a las dos cajas de los extremos para permitir el ingreso de los ejemplares a evaluar en cada bioensayo (Fig. 1).

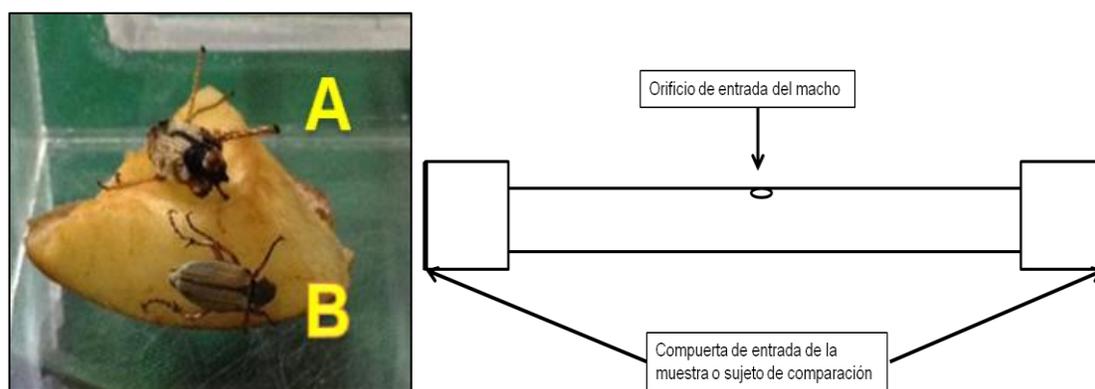


Figura 1. Izquierda: A. Hembra artificial prefabricada. B. Hembra viva. Derecha: Representación esquemática del olfatómetro de dos vías basado en la propuesta de Dal Bello y Padín (2006).

Insectos. Se recolectaron manualmente individuos adultos de *M. mexicanus* en plantas de azumiate (*Baccharis salicifolia* R. y P.) y en cultivos de maíz (*Zea mays* L.), manzana (*Malus*

domestica L.), pera (*Pyrus communis* L.) y capulín (*Prunus* spp.), en la localidad de Manzanillo perteneciente al municipio de Las Vigas de Ramírez, Veracruz (Longitud Este 699309 y Latitud Norte 217234, UTM zona 14 N), entre junio y agosto de 2016. Los insectos fueron trasladados al “Laboratorio de Infoquímicos y otros productos bióticos” de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, para su manutención y manejo experimental. Todo el material recolectado se identificó taxonómicamente de acuerdo a los criterios establecidos por Arce-Pérez y Morón (2000).

Estandarización de bioensayos. Los bioensayos se llevaron a cabo en condiciones controladas de temperatura (24 ± 2 °C), humedad ($65 \% \pm 5$ °C) e iluminación (60 w), entre las 11:00 y las 14:00 hrs, horario en que se observa en campo que los adultos llevan a cabo sus actividades alimentarias y sexuales. Se evaluaron las respuestas por parte de los machos *M. mexicanus* hacia estructuras del aparato reproductor de la hembra, hacia individuos vivos del mismo sexo y del sexo opuesto, así como a hembras “artificiales” prefabricadas. Para lo anterior, se programaron tres bioensayos. En el bioensayo I se comparó la respuesta de los machos hacia la cámara genital con glándulas accesorias (CG-GA), contrastándola con la terminalia abdominal de la hembra sin dichas estructuras (TA). Se emplearon doce CG-GA y doce TA ($n = 12$). Al momento de cada experimento se diseccionaron hembras vivas y se separaron las CG-GA y TA. Para el bioensayo II se comparó la respuesta hacia hembras vivas (HV) con la respuesta hacia hembras artificiales (HA), manufacturadas con hilo y papel filtro. El bioensayo III consistió en evaluar la respuesta de machos ($n = 12$) hacia hembras ($n = 12$) y hacia machos vivos ($n = 12$). Cada macho a evaluar (“receptor”) se introdujo en el orificio equidistante a ambos extremos del olfatómetro. Se registró el tiempo de respuesta y dirección a cualquiera de las cajas durante 10 min, contados a partir de la introducción de cada individuo al olfatómetro. Se consideró una respuesta positiva en el momento en que “el receptor” permaneció por lo menos 30 s sobre el estímulo probado.

Análisis estadístico. Dado que en cada bioensayo hubo solo uno de dos resultados posibles y estos eran independientes entre sí, se decidió analizar los datos obtenidos mediante tablas de distribución binomial (Pagano, 2006), usando el paquete estadístico GraphPad Prism versión 6.01 para Windows (GraphPad Software, 2012).

Extracción directa con hexano. Se emplearon treinta y seis hembras de *M. mexicanus* seleccionadas al azar. La extracción de la cámara genital con las glándulas accesorias, consistió en apretar ligeramente el cuerpo de la hembra, de manera que quedaran expuestos los últimos segmentos abdominales y se aislaron dichas estructuras del resto. Las estructuras aisladas se organizaron en seis viales con 1 ml de hexano ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$, SIGMA-ALDRICH, CROMASOLV®, for HPLC, ≥ 97 %, CG.), cada uno con seis CG-GA (6 equivalentes hembra), los cuales se almacenaron en el congelador a 4 °C hasta el momento de su análisis por CG-EM.

Identificación química El análisis de las muestras se efectuó en un CG-EM (MODELO VARIAN CP 3800/320 MS), utilizando una columna ZEBRON ZB-semi-volátiles, 5 %-polysilarylene-95 %-polisiloxanodimethyl. El inyector se trabajó en modo splitless, pulsado a 55 psi/min y a una temperatura de 250°C. El programa de temperaturas del horno consistió en 28°H1 (5°/m)-75°H2 (8°/m) -250°H2 (9°/m) -300°H2 (10°/m) -325°H2, empleándose helio como gas acarreador con flujo de 1.2 ml/min. Se inyectaron los extractos obtenidos en cada repetición por lo que se analizaron seis muestras diferentes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioensayos. En el Bioensayo I, las respuestas positivas de los machos hacia las CG-GA fueron mayores y estadísticamente significativas con respecto a las observadas con las TA ($p < 0.05$) (Fig. 2A); once de los doce machos (91.6 %) se dirigieron hacia la CG-GA. Esto respalda a los estudios

anatómicos e histológicos de Benítez-Herrera *et al.* (2015), en el sentido de que la cámara genital y las glándulas accesorias de esta especie se caracterizan por estar conformadas por epitelios especializados en la producción de atrayentes químicos. Cabe señalar que están en proceso los estudios de este tipo para la terminalia abdominal. En el caso del Bioensayo II, se observó que diez de los doce machos evaluados (83.3 %) prefirieron a las HV con respecto a las HA, mostrando respuestas significativas estadísticamente ($p < 0.05$) (Fig. 2B). La preferencia hacia las HA podría explicarse por la atracción de un individuo hacia otro del sexo opuesto que a su vez puede ser mediada no solo por señales químicas, si no también visuales o acústicas (Chapman, 1998; Romero-López, 2016). El Bioensayo III que consistió en comparar la respuesta de los machos hacia hembras y machos; aunque no se detectaron diferencias estadísticamente significativas, es evidente la tendencia de que la mayoría de los machos evaluados se dirigen preferentemente hacia las HV y no a los machos, pues nueve de doce las prefirieron (75 %) (Fig. 2C).

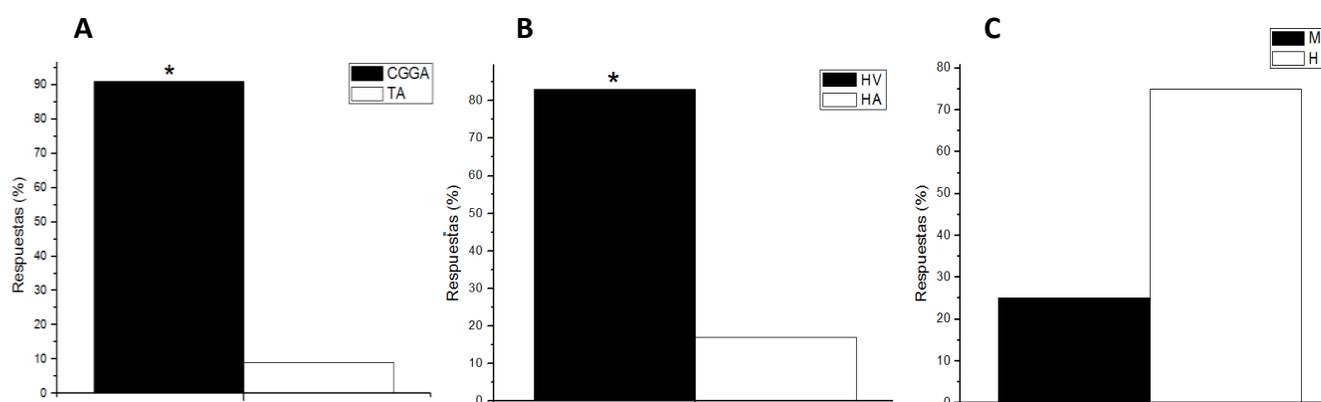


Figura 2. Gráficos de barras indicando la proporción de respuestas de los machos *M. mexicanus* hacia los diferentes estímulos, en cada bioensayo. A. Bioensayo I, cámara genital con glándulas accesorias contra terminalia abdominal. B. Bioensayo II, hembras vivas contra hembras artificiales. C. Bioensayo III, hembras vivas contra machos vivos. CGGA = cámara genital con glándulas accesorias; TA = terminalia abdominal; HV = hembras vivas; HA = hembras artificiales; H = hembras; M = machos.

Obtención del perfil químico. De las CG-GA analizadas, se extrajeron e identificaron veinte compuestos químicos, los cuales en su mayoría son ácidos grasos, aldehídos, metil ésteres y ácidos carboxílicos (Fig. 3, Cuadro 1). De todos los compuestos encontrados, el ácido n-hexanoico el ácido octadecanoico y el ácido oleico fueron los más abundantes. La revisión realizada por Vuts *et al.* (2014) señala al ácido n-hexanoico como un aleloquímico vegetal con efecto atrayente para *Macroductylus nigripes* (Bates). La presencia del ácido n-hexanoico en extractos de la cámara genital, podría explicarse por la dieta y la posición del intestino, inmerso en la cámara genital de esta especie. Además, durante observaciones realizadas en campo se ha detectado que las hembras al momento de su “llamado sexual”, secretan una sustancia oscura y viscosa (posiblemente parte de sus desechos) que parece atraer a los machos. El resto de los compuestos encontrados no han sido reportados como infoquímicos para integrantes Melolonthidae. Sin embargo, el ácido octadecanoico y el ácido oleico han sido reportados como precursores de feromonas, principalmente en lepidópteros (Roelofs y Wolf, 1988; Anaya-Lang, 2003). La producción de cada componente en una feromona es dependiente de reacciones químicas específicas que toman lugar en células secretoras en el insecto que las produce, la clave de la biosíntesis son enzimas que pueden convertir materiales como el ácido oleico en una feromona o que producen compuestos únicos a

partir del ácido mevalónico o acetato (Roelofs, 1995) por lo que es posible que estos compuestos mayoritarios formen parte de un atrayente sexual en *M. mexicanus*.

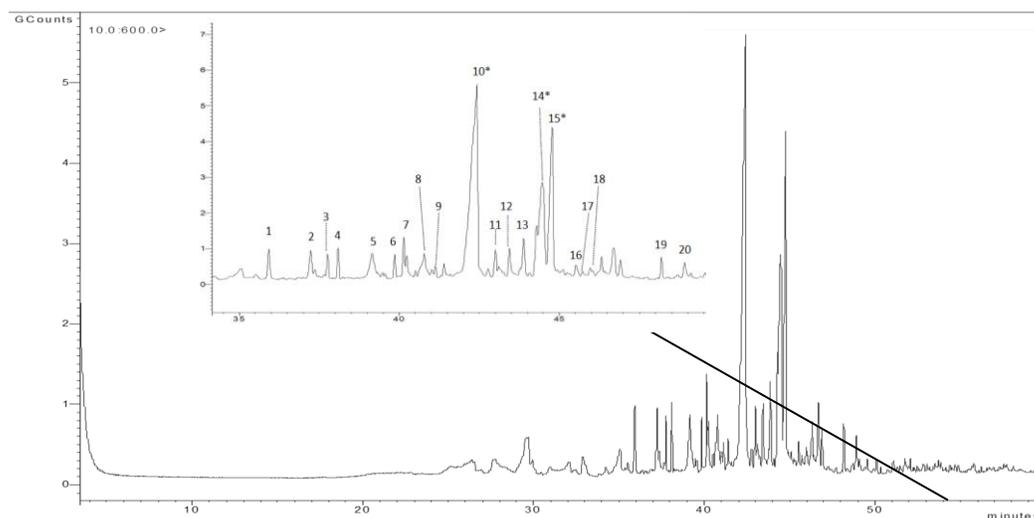


Figura 3. Cromatograma obtenido de las extracciones de la cámara genital y glándulas accesorias de hembras de *Macroductylus mexicanus*. En el recuadro se muestran los picos más abundantes, enumerados.

Cuadro 1. Características químicas de los compuestos identificados por CG-GA extraídos de las cámaras genitales con glándulas accesorias de hembras de *Macroductylus mexicanus*.

| No. Pico | 1 | 2 | 3 |
|----------|--|--|---|
| IUPAC | 3-ácido hidroxidodecanoico | tetradecanal | 7-1,4-isopropil-dimetil azuleno C ₁₅ H ₁₈ |
| Fórmula | C ₁₂ H ₂₄ O ₃ | C ₁₄ H ₂₈ O | |
| TR (min) | 35,534 | 35,935 | 37,237 |
| Área | 9.201 e+8 | 4.04 e+9 | 3.623 e+9 |
| No. pico | 4 | 5 | 6 |
| IUPAC | 2-pentadecanona | ácido tetradecanoico | octadecanal |
| Fórmula | C ₁₅ H ₃₀ O | C ₁₄ H ₂₈ O ₂ | C ₁₈ H ₃₆ O |
| TR (min) | 37,760 | 39,151 | 39,855 |
| Área | 2.384 e+9 | 7.279e+9 | 2.299e+9 |
| No. pico | 7 | 8 | 9 |
| IUPAC | 3,7,11,15-2-1tetrametil hexadecenol | [(Z)-7-8-metiltetradecenil] acetato | 2-heptadecanona |
| Fórmula | C ₂₀ H ₄₀ O | C ₁₇ H ₃₂ O ₂ | C ₁₇ H ₃₄ O |
| TR (min) | 40,141 | 40,779 | 41,132 |
| Área | 3.303e+9 | 5.736e+9 | 9.492e+8 |
| No. pico | 10 * | 11 | 12 |
| IUPAC | ácido n-hexanoico | ácido eicosanoico | ácido heptadecanoico |
| Fórmula | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | C ₂₀ H ₄₀ O ₂ | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ |
| TR (min) | 42,424 | 43,005 | 43,439 |
| Área | 7.094e+10 | 2.883e+9 | 3.303e+9 |
| No. pico | 13 | 14 * | 15* |
| IUPAC | 9-ácido hexadecenoico | ácido oleico | ácido octadecanoico |
| Fórmula | C ₁₆ H ₃₀ O ₂ | C ₁₈ H ₃₄ O ₂ | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ |
| TR (min) | 43,282 | 44,47 | 44,772 |
| Área | 6.181e+9 | 1.720e+10 | 2.769e+10 |

Cuadro 1. Continuación

| No. pico | 16 | 17 | 18 |
|----------|--|--|-----------------------------------|
| IUPAC | (Z)-8-9-ácido-metiltetradecenoico | [(Z)-7-8-metiltetradecenil] acetato | E,E-12-2,13-1metil-octadecadienol |
| Fórmula | C ₁₅ H ₂₈ O ₂ | C ₁₇ H ₃₂ O ₂ | C ₁₉ H ₃₆ O |
| TR (min) | 45,517 | 45,729 | 45,966 |
| Área | 1.793e+9 | 3.464e+8 | 1.564e+9 |
| No. pico | 19 | 20 | |
| IUPAC | 2-ácido hexanoico, etildióster, tetraetilen glicol | 2-monopalmitina | |
| Fórmula | C ₂₄ H ₄₆ O ₇ | C ₁₉ H ₃₈ O ₄ | |
| TR (min) | 48,183 | 48,911 | |
| Área | 2.241e+9 | 2.284e+9 | |

CONCLUSIÓN

Los machos de *M. mexicanus* mostraron preferencia por las HV y por las CG-GA en los bioensayos en olfatómetro. Las evidencias sobre las características histológicas y funcionales de la cámara genital y las glándulas accesorias, junto con las evidencias de los bioensayos llevados a cabo en este trabajo, permiten sugerir que las hembras son las productoras y emisoras del atrayente sexual en estas interacciones intraespecíficas. Es necesario probar la actividad biológica de cada uno de los compuestos encontrados en el olfatómetro empleado en el presente estudio, el cual resultó adecuado para los bioensayos propuestos. También se sugieren pruebas en bioensayos activos y electroantenografía, así como pruebas en campo para poder validarlos como atrayentes sexuales de esta especie.

Agradecimientos

Al Centro Universitario de Vinculación y Transferencia Tecnológica de la BUAP (CUVyTT) por el apoyo con el equipo y los recursos necesarios para el análisis químico y en especial al Quím. José Alejo Zárate por el aporte técnico para la culminación de este trabajo.

Literatura citada

- Anaya-Lang, A. L. 2003. *Ecología química*. Universidad Autónoma de México. Plaza y Valdés Editores. Disponible en: https://books.google.es/books?id=H6j8zaDYSYEC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false. (Fecha de consulta: 1-I-2017).
- Arce-Pérez, R. y M. A. Morón. 2000. Taxonomía y distribución de las especies de *Macroductylus* Latreille (Coleoptera: Melolonthidae) en México y Estados Unidos de América. *Acta Zoológica Mexicana (n. s.)*, 79: 123–239.
- Benítez-Herrera, L. N., Martínez-Martínez, I. y A. A. Romero-López. 2015. Anatomía del aparato reproductor de *Macroductylus mexicanus* (Coleoptera: Scarabeoidea: Melolonthidae) y su posible participación en su comunicación química sexual. *Southwestern Entomologist*, 40(1): 189–198.
- Chakravarthy, A. K., Chandrashekharaiyah, M., Kandakoor, S. B. and D. N. Nagaraj. 2014. Efficacy of aggregation pheromone in trapping red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus* Olivier) and rhinoceros beetle (*Oryctes rhinoceros* Linn.) from infested coconut palms. *Journal of Environmental Biology*, 35(3): 479–84.
- Chapman, R. F. 1998. *The Insects: structure and function*. Cambridge University Press. New York, 760 pp.
- Cherman, M. y M. A. Morón. 2014. Validación de la familia Melolonthidae Leach, 1819 (Coleoptera: Scarabaeoidea). *Acta Zoologica Mexicana (n. s.)*, 30: 201–220.
- Dal Bello, G. y S. Padín. 2006. Olfatómetro simple para evaluar la actividad biológica de aleloquímicos vegetales de *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenerionidae). *Agrociencia*, 10(2): 23–26.

- GraphPad Software. 2012. *Versión 6.01 para Windows*, San Diego, California, USA. Disponible en: www.graphpad.com.
- Hoyt, C. P., Osborne, G. O. and A. P. Mulcock. 1971. Production of an insect sex attractant by symbiotic bacteria. *Nature*, 230(5294): 472–473.
- Leal, W. S. 1998. Chemical Ecology of phytophagous scarab beetles. *Annual Review of Entomology*, 43: 39–61.
- Malo, E. A. y J. C. Rojas. 2012. Métodos de investigación en semioquímicos, Pp. 17–45. In: J. C Rojas y E. A. Malo (Eds.). *Temas Selectos en Ecología Química de Insectos*. Colegio de la Frontera del Sur. México.
- Pagano, R. R. 2006. *Estadística para las ciencias del comportamiento*. Thomson editores. Mexico, 564 pp.
- Roelofs, W. L. 1995. The chemistry of sex attraction. Pp. 103–118. In: E. Thomas and M. Jerrold (Eds.) *Chemical Ecology*, National Academy of Science, Washington D. C.
- Roelofs, W. L. and Wolf, W. A. 1988. Pheromone biosynthesis in Lepidoptera. *Journal of Chemical ecology*, 4: 2019–2031.
- Romero-López, A. A. y R. Arzuffi. 2010. Evidencias sobre la producción y liberación de compuestos bioactivos de la feromona sexual de un melolóntido mexicano. Pp. 204–222. In: L. A. Rodríguez del Bosque y M. A. Morón (Eds.). *Ecología y control de plagas edafícolas*, Publicación especial del INECOL.
- Romero-López, A. A., Martínez, M. I. y M. A. Morón. 2010. Morphology of the genital chamber and accessory glands of *Phyllophaga opaca* Moser (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae) females. *World Journal of Zoology*, 3: 210–216.
- Romero-López, A. A., Arzuffi, R., Valdez, J., Sánchez-Espíndola, E. and M. A. Morón. 2011 Tissues involved in sex pheromone production in *Phyllophaga obsoleta* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae). *Annals of Entomological Society of America*, 104(5): 960–965.
- Romero-López, A. A. 2016. Comunicación química en coleópteros Melolonthidae: a una década de distancia. *Dugesiana*, 23(1): 59–73.
- Subaharan, K., Kumar, A. R. V. and P. Ganiger. 2013. Electrophysiological responses of chafer beetle, *Holotrichia serrata* (F.) (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 12(2): 155–159.
- Tillman, J. A., Seybold, S. J., Jurenka, R. A. and G. J. Blomquist. 1999. Insect pheromones, an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect biochemistry and Molecular Biology*, 29(6): 481–514.
- Vuts, J., Imrei, Z., Birkett, M. A., Pickett, J. A., Woodcock, C. M. and M. Tóth. 2014. Semiochemistry of the Scarabaeoidea. *Journal of Chemical Ecology*, 40(2): 190–210.
- Zarbin, P. H. G., Leal, W. S., Ávila, C. J. and L. J. Oliveira. 2007. Identification of the sex pheromone of *Phyllophaga cuyabana* (Coleoptera: Melolonthidae), *Tetrahedron Letters*, 48(11): 1991–1992.