



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

TESIS

**Estudios e identificación de volátiles cuticulares y en
excretas emitidos por larvas de *Cyclocephala barrerai*
Martínez (Coleoptera: Melolonthidae) y su efecto de
atracción hacia sus adultos**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

Presenta

FERNANDA ALEJANDRA CAMACHO ZAMUDIO

DIRECTOR

DR. ALFREDO JIMÉNEZ PÉREZ

MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO, JULIO DEL 2026.



Mineral de la Reforma, Hgo., a 9 de julio de 2026

Número de control: ICBI-D/1315/2026

Asunto: Autorización de impresión.

MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH

Con Título Quinto, Capítulo II, Capítulo V, Artículo 51 Fracción IX del Estatuto General de nuestra Institución, por este medio, le comunico que el Jurado asignado a la egresada de la Licenciatura en Biología **Fernanda Alejandra Camacho Zamudio**, quien presenta el trabajo de titulación **"Estudios e identificación de volátiles cuticulares y en excretas emitidos por larvas de *Cyclocephala barrera* Martínez (Coleoptera: Melolonthidae) y su efecto de atracción hacia sus adultos"**, ha decidido, después de revisar fundamento en lo dispuesto en el Título Tercero, Capítulo I, Artículo 18 Fracción IV; dicho trabajo en la reunión de sinodales, **autorizar la impresión del mismo**, una vez realizadas las correcciones acordadas.

A continuación, firman de conformidad los integrantes del Jurado:

Presidente: Dra. Liliana Mireya Aguilar Castro

Secretario: Dr. Juan Márquez Luna

Vocal: Dr. Alfredo Jiménez Pérez

Suplente: Dr. Ignacio Esteban Castellanos Sturemark

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"

Dr. Gabriel Vergara Rodríguez
Director del ICBI



GVR/MMM

"Amor, Orden y Progreso"



Ciudad del Conocimiento, Carretera Pachuca-Tulancingo
Km. 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo,
México. C.P. 42184
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 40001
direccion_icbi@uaeh.edu.mx, vergara@uaeh.edu.mx

uaeh.edu.mx

Dedicatoria

A mis padres Miguel y Cony, quienes me apoyaron para seguir mis sueños, que me sostuvieron con esfuerzo. Les agradezco el haber confiado en mí, el alentarme a seguir adelante aun con las dificultades. Por todo el amor que me han dado, esta tesis se las dedico principalmente a ustedes.

A Osi y Benito, mis mascotas, quienes fueron mis compañeros durante largas noches de desvelos, siempre conmigo, aún en las frías madrugadas, y aunque hoy ya no están aquí, los llevo en mi corazón.

Agradecimientos

A el Doctor Alfredo, por tenerme tanta paciencia y por confiar en mí, por ayudarme a hacer posible esta investigación, por motivarme a seguir estudiando y por ser mi ejemplo a seguir.

A mis sinodales, el Dr, Juan, el Dr, Ignacio y la Dra. Lili, por todo su apoyo durante este proceso, por sus sugerencias y sus comentarios que me ayudaron a hacer mejor mi trabajo.

A Abraham, por asesorarme, por tus consejos, por todo el conocimiento y el aprendizaje que obtuve de ti, por todas las risas, por todo el apoyo, por tu amistad y por ser mi confidente.

A Ángel, por ser mi amigo en CEPROBI, por que tu amistad me ayudó a tener días muy divertidos durante mi estadía, por escucharme sin juzgarme, por hacer menos pesado trabajar en laboratorio.

Al personal de CEPROBI, por hacer mi estancia maravillosa, por ser siempre tan amables y dispuestos a compartir sus conocimientos.

A Pame, porque me sostuviste en mis momentos más vulnerables, por tantos años de amistad, tanto apoyo y tantos consejos.

A mi querida Anel, por enseñarme a bajar las armas, por motivarme a continuar con la tesis y a no rendirme, por sostener mi mano y ser mi calma en medio de la tempestad, te amo infinitamente.

ÍNDICE

ÍNDICE	4
ÍNDICE DE CUADROS.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
Resumen.....	8
1. Introducción	9
2. Antecedentes	10
2.1 Taxonomía e identificación de <i>Cyclocephala barrerae</i>	10
2.1.1 Taxonomía	10
2.1.2 Identificación de adultos de <i>C. barrerae</i>	10
2.1.3 Identificación de larvas L3 de <i>C. barrerae</i>	13
2.1.3.1 Desarrollo ontogénico de Coleoptera: Scarabaeoidea	15
2.2 Distribución de <i>Cyclocephala</i>	15
2.3 Plantas hospederas	16
2.4 Hábitos alimenticios y ciclo de vida	16
2.5 Sistema digestivo en insectos y microflora intestinal	17
2.6 Cutícula de los insectos.....	18
2.7. Métodos de control de <i>Cyclocephala barrerae</i>	19
2.7.1 Químico	19
2.7.2 Biológico.....	20
2.8 Plaga reglamentada según la NIMF 5	20
2.9. Ecología química de insectos.....	21
2.9.1 Ecología química de Melolonthidae	21

2.9.2 Ecología química de <i>Cyclocephala</i>	22
2.10. Bases de la cromatografía de gases	22
2.10.1 Obtención de volátiles mediante técnica de Inmersión	22
2.10.2 Obtención de volátiles mediante técnica de Headspace	23
2.11 Espectrometría de masas y fundamentos de la histología	23
2.11.1 Espectrometría de masas (MS)	23
2.11.2 Fundamentos de la histología y microscopía	24
2.12 Microscopía Electrónica de barrido	24
2. Justificación	25
4. Hipótesis	25
5. Objetivos	25
5.2 Objetivos específicos	26
6. Materiales y métodos	26
6.1 Obtención, cría y reproducción de adultos de <i>Cyclocephala barrerae</i>	26
6.2 Obtención de volátiles cuticulares y de excretas de larvas L3 mediante el método de inmersión	28
6.2.1 Obtención de volátiles en excretas de larvas L3 mediante el método de inmersión	28
6.2.2 Identificación de volátiles cuticulares y en excretas de larvas L3 mediante GC-MS	28
6.3. Obtención de volátiles mediante el método Headspace	29
6.3.1 Preparación del equipo	29
6.3.2. Obtención de volátiles por Headspace	30
6.3.3. Identificación de volátiles de larvas L3 extraídos por Headspace en CG-EM	30
6.4. Bioensayos sobre la respuesta conductual de adultos <i>C. barrerae</i> ante la presencia de larvas conespecíficas en etapa L3	31

6.5. Microscopía.....	34
7. Resultados.....	34
7.1 Obtención de compuestos volátiles de larvas L3 por el método de inmersión..	34
7.1.1. Identificación de compuestos químicos cuticulares y en excretas de larvas L3 extraídos por inmersión en Cromatografía de Gases con Espectrometría de Masas.....	35
7.2. Identificación de volátiles de larvas L3 extraídos por Headspace en CG-EM .	38
7.2.1. Compuestos detectados en eluciones de metanol en las muestras 1,2,3,4,5 y 8 en CG-EM extraídos por Headspace de larvas L3 de <i>Cyclocephala barrera</i>	39
7.2.2 Compuestos identificados en eluciones de hexano en las muestras 1,2,3,4,5 y 8 en CG-EM extraídos por Headspace de larvas L3 de <i>Cyclocephala barrera</i>	40
7.3. Respuesta comportamental de adultos a L3 y excretas.....	42
7.4. Microscopía.....	42
8. Discusión de resultados.....	43
9. Conclusiones	47
10. Referencias bibliográficas	48

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Identidad propuesta de compuestos volátiles de cutícula de larvas L3 <i>Cyclocephala barrera</i> extraídos por inmersión	36
Cuadro 2. Propuesta de compuestos volátiles en excretas de larvas L3 <i>Cyclocephala barrera</i> extraídos por inmersión	38
Cuadro 3. Propuesta de compuestos identificados en eluciones de metanol en las muestras 1,2,3,4,5 y 8 en CG-EM extraídos por Headspace de larvas L3 de <i>Cyclocephala barrera</i>	40
Cuadro 4. Propuesta de compuestos identificados en las eluciones de hexano en las muestras 1,2,3,4,5 y 8 en CG-EM extraídos por Headspace de larvas L3 de <i>Cyclocephala barrera</i>	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfometría de <i>Cyclocephala barrerai</i> .	11
Figura 2. Vista de distintos ángulos de un macho adulto de <i>Cyclocephala barrerai</i> .	12
Figura 3. Edeago de <i>Cyclocephala barrerai</i> visto en diferentes posiciones.	12
Figura 4. Estructuras diagnosticas de larvas L3 de <i>Cyclocephala barrerai</i> .	14
Figura 5. Ciclo de vida del coleóptero <i>Cyclocephala barrerai</i> .	17
Figura 6. Esquema del sistema digestivo de un insecto adulto.	18
Figura 7. Estructura histológica de la cutícula de un insecto.	19
Figura 8. Obtención de cría de <i>Cyclocephala barrerai</i> .	27
Figura 9. Configuración experimental del equipo de Headspace.	30
Figura 10. Arena de experimentación.	32
Figura 11. Evidencia conductual de la respuesta de atracción positiva del adulto de <i>Cyclocephala barrerai</i> hacia la larva L3.	33
Figura 12. Respuesta de atracción positiva del adulto de <i>Cyclocephala barrerai</i> hacia la larva L3.	33
Figura 13. Ausencia de respuesta de atracción del adulto de <i>Cyclocephala barrerai</i> hacia la larva L3.	34
Figura 14. Cromatograma de compuestos volátiles en cutícula de larvas L3 <i>Cyclocephala barrerai</i> extraídos por inmersión.	35
Figura 15. Cromatograma de compuestos volátiles identificados en excretas de larvas L3 <i>Cyclocephala barrerai</i> extraídos por inmersión.	37
Figura 16. Cromatograma de compuestos volátiles identificados en eluciones de metanol en las muestras 1,2,3,4,5 y 8 en CG-EM extraídos por Headspace de larvas L3 de <i>Cyclocephala barrerai</i> .	39
Figura 17. Cromatograma de compuestos volátiles identificados en las eluciones de hexano en las muestras 1,2,3,4,5 y 8 en CG-EM extraídos por Headspace de larvas L3 de <i>Cyclocephala barrerai</i> .	41
Figura 18. Micrografía electrónica de barrido de la superficie epicuticular de larva L3 de <i>Cyclocephala barrerai</i> .	43
Figura 19. Micrografía electrónica de barrido de la superficie epicuticular de un adulto de <i>Cyclocephala barrerai</i> .	43

Resumen

El estudio de la ecología química y la comunicación Inter etapa en coleópteros es fundamental para comprender los mecanismos evolutivos y de comportamiento en especies de importancia agrícola y ecológica. En este trabajo se evaluó la respuesta comportamental de adultos de *Cyclocephala barrerae* Martínez (Coleoptera: Melolonthidae) ante la presencia de larvas de tercer estadio (L3), con el objetivo de identificar posibles interacciones mediadas por señales químicas. Los ensayos etológicos revelaron una atracción sexual selectiva y unidireccional por parte de los machos adultos hacia las larvas L3, registrándose patrones de cortejo específicos que no se presentaron en el caso de las hembras adultas. Con el fin de determinar las posibles vías anatómicas de emisión de estas señales, el tegumento de L3 se sometió a un análisis ultraestructural mediante Microscopía Electrónica de Barrido. Los estudios microscópicos revelaron que, a diferencia de los ejemplares adultos, las larvas L3 de *C. barrerae* carecen por completo de poros cuticulares o estructuras glandulares exócrinas superficiales, descartando a la epidermis como la vía de liberación de compuestos químicos. Esta ausencia de especializaciones anatómicas guarda una correlación directa con la baja abundancia y diversidad de compuestos detectados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). El análisis del perfil químico molecular a través del estudio de muestras de volátiles obtenidas de L3 por la técnica de Headspace y eluciones de las larvas sugiere la presencia de compuestos volátiles alifáticos de cadena corta y media, específicamente fenol, 1-hexanol y 1-undecanol y nonanal, sin mostrar coincidencias de hidrocarburos cuticulares pesados en el perfil químico de las hembras adultas según la literatura comparada. Se concluye que estas señales químicas no poseen un origen glandular propio de la larva, sino que pueden provenir de la actividad metabólica secundaria de enterobacterias simbiotes como *Morganella morganii*, *Klebsiella oxytoca* y *Citrobacter freundii*.

Palabras clave: *Cyclocephala barrerae*, ecología química, microbiota simbiote, volátiles alifáticos, microscopía electrónica.

1. Introducción

En México, se han catalogado más de mil especies de coleópteros denominados comúnmente como mayates, de este grupo, cerca de 600 especies, agrupadas en 12 géneros, conforman el complejo “gallina ciega” (Morón, 1997). Los principales géneros considerados plagas son *Phyllophaga*, *Anomala*, *Popillia* y *Cyclocephala*, que presentan una distribución cosmopolita en climas tropicales y templados (Díaz Mederos et al., 2006).

Las larvas del complejo “gallina ciega” son morfológicamente similares, abundantes y tienen hábitos fosoriales. Se alimentan de materia orgánica en descomposición, estiércol, restos de vegetales y raíces; por ello, algunas especies son clasificadas como benéficas y otras son consideradas dañinas (Morón et al., 2016). En México, este complejo está ampliamente distribuido, con presencia destacada en los estados de Baja California, Sonora, Zacatecas, Coahuila, Chihuahua, Oaxaca, Chiapas, Puebla, Jalisco, Michoacán, Veracruz y Estado de México (Díaz Mederos et al., 2006).

Guzmán-Vásquez et al. (2017), señalan que los adultos del género *Cyclocephala* actúan como polinizadores asociados a más de 160 especies de angiospermas; no obstante, en su etapa larval, son considerados como una de las plagas principales de diversos cultivos. Específicamente, la especie *Cyclocephala barrerae* Martínez es considerada una plaga reglamentada, ya que en su estadio larval consume principalmente raíces de pastizales ornamentales como agrícolas, provocando importantes pérdidas económicas (Morón et al., 2016).

De acuerdo con Tamaki (1985), es típico en los coleópteros y en otros insectos la atracción sexual conespecífica mediante liberación de feromonas; un ejemplo es el registro en hembras de *C. lurida*, las cuales producen una feromona sexual que atrae y estimula a los machos. Estudios de campo indican que las larvas de esta especie también pueden emitir volátiles que atraen a los adultos, quienes exhiben conductas de apareamiento hacia ellas. Este fenómeno es recurrente dentro del género *Cyclocephala* (Haynes y Potter, 1995), por lo que genera gran interés determinar el motivo de dicha conducta y evaluar si las larvas, en su estadio previo a la metamorfosis, producen compuestos volátiles capaces de evocar una respuesta sexual en adultos.

La clase Insecta posee una estructura endurecida denominada integumento, la cual constituye la pared exterior del cuerpo. Esta estructura, conocida también como cutícula, regula la pérdida de agua por transpiración, sirve como cubierta protectora de los órganos vitales, actúa como soporte y estructura del sistema muscular y previene la deshidratación y el daño por la exposición a rayos UV (Becerril González, 2020).

En la capa cerosa de la epicutícula se encuentran hidrocarburos cuticulares (HC) los cuales presentan variaciones dependientes de la edad, el sexo y el estado reproductivo del individuo; entre sus funciones destacan la protección contra la desecación, la participación en sistemas de comunicación química y la diferenciación taxonómica entre especies (Salazar-

Escobar et al., 2021). Asimismo, el estudio de Sanchez-Cruz (2020), demuestra la presencia de simbiontes en el tracto digestivo de *C. barrerai* y *C. lunulata* que participan en la producción de compuestos volátiles.

El estudio de los compuestos volátiles presentes en la cutícula y excretas de larvas de *C. barrerai* permite comprender mejor la naturaleza etológica de estos insectos, estableciendo una nueva línea de investigación orientada a identificar los “infoquímicos” de la especie, con el fin de facilitar su identificación taxonómica y proponer alternativas de manejo integrado. Este trabajo reporta la ultraestructura de la cutícula en el tercer estadio larval, la caracterización de los diferentes compuestos químicos encontrados en larvas L3 de *C. barrerai* y sus excretas, así como el efecto biológico de dichos HC en los adultos de esta especie.

2. Antecedentes

2.1 Taxonomía e identificación de *Cyclocephala barrerai*

El género *Cyclocephala* pertenece a la familia Melolonthidae, subfamilia Dynastinae Dejean, 1821 (Guzmán-Vásquez et al., 2017). Los individuos de este género, conocidos comúnmente como mayates, presentan una metamorfosis holometábola. Sus larvas forman parte del complejo “gallina ciega” y se desarrollan en el suelo durante un periodo que oscila entre tres meses y un año, según la especie (Morón et al., 2016).

2.1.1 Taxonomía

La especie *Cyclocephala barrerai* fue descrita por Martínez en 1969, su ubicación taxonómica se detalla a continuación:

Reino: Animal

Filo: Arthropoda

Clase: Insecta

Orden: Coleoptera

Familia: Melolonthidae

Subfamilia: Dynastinae

Género: *Cyclocephala*

Especie: *Cyclocephala barrerai*

2.1.2 Identificación de adultos de *C. barrerai*

Los ejemplares adultos del género *Cyclocephala* Dejean, se reconocen fácilmente por los siguientes caracteres taxonómicos: frente y pronoto convexos, sin tubérculos, carinas o depresiones, borde anterior del clípeo redondeado o sinuado, antenas con ocho a diez artejos, meso y metatibias con ápices rectos, no ensanchados. A diferencia de las hembras los machos

presentan lo protarsos engrosados y la uña interna más grande que la externa, por lo que el dimorfismo sexual se considera acentuado (Morón et al., 1997) (Figura 1).

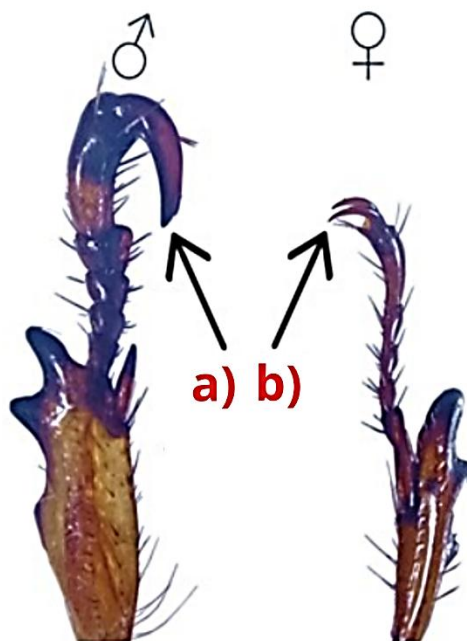


Figura 1. Morfometría de *Cyclocephala barrerai*. Se observan garras tarsales del primer par de patas, a) macho (izquierda) y b) hembra (derecha). Adaptado de Sanchez-cruz, et al., (2025).

Los adultos de *C. barrerai* se caracterizan por presentar pronoto y élitros testáceos, sin manchas contrastantes, con una maza antenal masculina más larga que los artejos precedentes y una longitud corporal 11 a 14 mm (Aragón et al., 2001) (Figura 2).

El edeago presenta una coloración pardo-rojiza, con una longitud de 2.66 x 1.06 mm, con aspecto glabro, exhibiendo parámetros largos y triangulares en un ángulo de 135° con respecto a la falobase. Los parámetros cuentan con un ápice con simetría ovalada y son más cortos en comparación con la falobase. El *spiculum gastrale* presenta forma de “T”, con un tamaño de 1.95 mm por la proyección de los brazos separados y con una posición basal curva (Villalobos, 2018) (Figura 3).

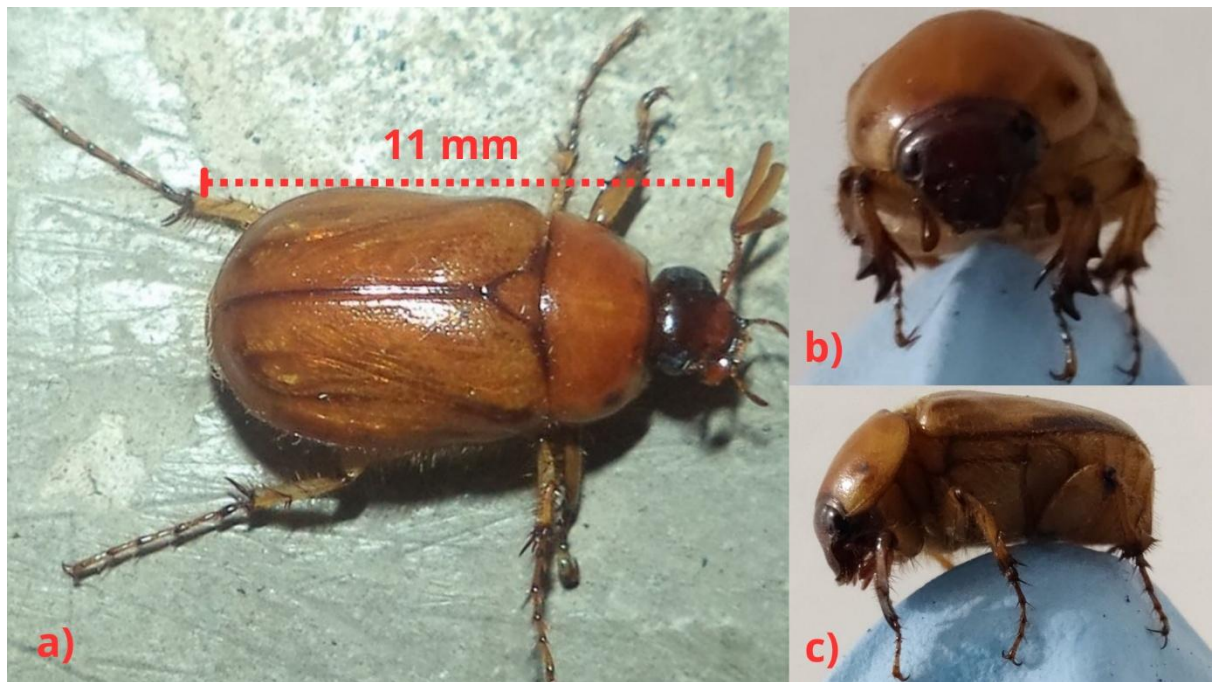


Figura 2. Vista de distintos ángulos de un macho adulto de *Cyclocephala barrerae*. Se observa a) vista dorsal, b) vista frontal y c) vista lateral. Fotografía a) adaptado de iNaturalist, (autor: Alfredo Eloisa, 2015); fotografías b) y c) del autor.

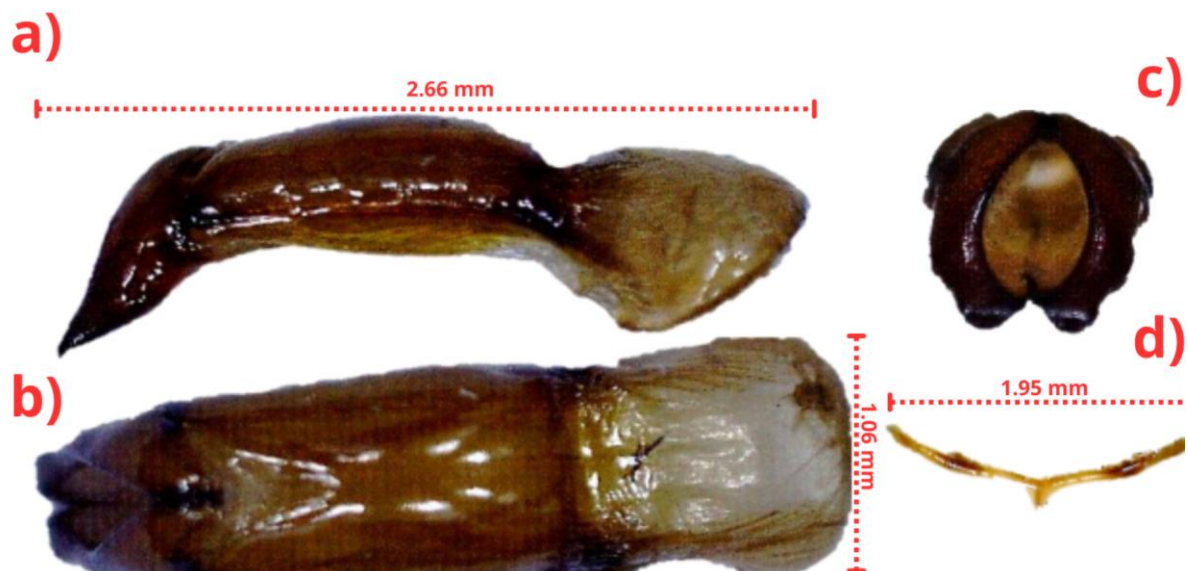


Figura 3. Edeago de *Cyclocephala barrerae* visto en diferentes posiciones. Se observa a) Edeago en posición lateral, b) Edeago en posición ventral, c) Parámetros en posición distal, G) *Spiculum gastrale*. Adaptado de Villalobos, (2018).

2.1.3 Identificación de larvas L3 de *C. barrerai*

A diferencia de otras larvas de Dynastinae, el género *Cyclocephala* se puede distinguir por los siguientes caracteres: cráneo con superficie reticulada, ligeramente rugosa, coloración amarilla claro a marrón rojizo anaranjado. Estematas presentes (ocelos larvales). Los márgenes laterales del labro están redondeados o ligeramente angulados en la región posterior. El proceso haptomeral tiene una muesca corta que forma dos dientes desiguales. Margen interno de la mandíbula con o sin diente. Maxila con una hilera de dientes estridulatorios truncados y romos. Último antenómero con dos manchas sensoriales dorsales. Raster con un teges formado por un número variable de setas en forma de gancho. Labio anal inferior con setas en forma de gancho. Ausencia de palidia. Garras con dos setas en cada una (Ritcher, 1966; Morelli y Alzugaray, 1994, como se citó en Morón et al., 2014).

De acuerdo con Morón et al., (2014), el tercer estadio de *C. barrerai* se puede diferenciar de otras larvas del género *Cyclocephala* por el conjunto de caracteres descritos a continuación (Figura 4): Cabeza (1). Ancho de la cápsula cefálica: 4,0–4,2 mm. Superficie del cráneo rugosa, de color amarillo anaranjado. Frente sin setas frontales externas, con 2 setas frontales posteriores, 1 seta frontal anterior, 1 seta angular anterior, 2–3 setas dorso-epicraniales, 3 setas epicraneales a cada lado y 5–7 setas detrás de cada soporte antenal. Clípeo sin seta central, con 1 seta lateral a cada lado. Labro simétrico con márgenes laterales redondeados, 3–4 setas posteriores, 1–2 setas centrales y 1–2 setas laterales a cada lado. Estematas presentes.

Epifaringe (2) 1,3–1,6 mm de ancho, 1,2–1,5 mm de largo, *epizygum* y *zygum* fusionados como una placa irregular, alargada y de color marrón rojizo oscuro. Haptomerum elevado con una ligera muesca; plegmatia y proplegmatia ausentes. Cada acanthoparia con 7–8 setas espinosas. *Dexiophoba* y *laeophoba* ausentes. *Dexiotorma* estrechada, alargada y casi recta. *Laeotorma* alargada y estrechada. *Haptolachus* ausente. Placa esclerotizada larga y estrecha. *Crepis* ausente. *Chaetoparia* izquierda con 34–39 setas espinosas y robustas mixtas. *Chaetoparia* derecha con 36–41 setas largas y robustas. Mandíbulas (3 a 5) con área estridulatoria ventral; área tijera en ambas mandíbulas con hoja distal afilada. Mandíbula derecha con 1 diente pequeño en el margen interno y lóbulo distal (M1) del área molar bien desarrollado; *brustia* escasamente setosa. Mandíbula izquierda con lóbulo distal débilmente desarrollado, margen interno simplemente curvado. *Calx* prominente, *brustia* con pocas setas.

Maxilas. Mala con 1 uncus en el ápice de la galea, 2 unci fusionados rodeados por 7–9 heli robustos en el ápice de la *lacinia*; área estridulatoria con 8–10 dientes pequeños. Escleroma hipofaríngeo (9) asimétrico con lado derecho prominente. Último antenómero con 2–3 manchas sensoriales dorsales ovadas (6) y 2–3 puntos sensoriales ventrales (7).

Tórax. Placas respiratorias de color amarillo claro, uniformemente curvadas, en forma de "C" (11) 0,18–0,30 mm de longitud, 0,12–0,16 mm de ancho, bulla redondeada, distancia entre lóbulos menor que el diámetro dorsoventral de la bulla. Escleroma lateral del pronoto alargado, amarillo claro, con setas largas y delgadas. *Pro-prescutum* con 10–11 setas largas

distribuidas regularmente; *pro-scutum* con 5–6 setas largas y delgadas; *meso-prescutum* con hilera transversal de 6–7 setas largas; *meso-scutum* sin setas; *meso-scutellum* con hilera de 5–6 setas largas y delgadas; *meta-prescutum* con hilera transversal de 3–4 setas mixtas cortas y largas; *metascutum* sin setas; *meta-scutellum* con hilera transversal de 9–10 setas mixtas cortas y largas. Garras pro- y meso-tarsales largas, puntiagudas, con 1 seta interna prebasal y 1 seta externa lateral (10); garra metatarsiana puntiaguda pero más corta que las precedentes.

Abdomen. Placas respiratorias de color amarillo claro, curvadas regularmente, en forma de "C"; en los segmentos I–VI con diámetro similar, 0,18–0,27 mm de longitud, 0,12–0,16 mm de ancho; las placas en los segmentos VII–VIII son ligeramente más grandes, 0,20–0,30 mm de longitud, 0,14–0,18 mm de ancho. Dorso de los segmentos abdominales I–VII cada uno con numerosas setas cortas en forma de espina y una hilera transversal de pocas setas largas; dorso de los segmentos VIII–IX con hileras transversales de 11–13 setas largas y delgadas. *Venter* de los segmentos abdominales I–VII con hileras transversales de 9–11 setas largas y delgadas; *venter* de los segmentos VIII–IX con hileras transversales de 3–5 setas mixtas cortas y largas. *Raster* (12) sin *palidia*; *tegilla* con 43–46 setas ganchosas cortas y robustas con puntas curvas; *campus* con 4–6 setas largas y delgadas; *barbula* moderadamente setosa. Labio anal dorsal con 16–18 setas ganchosas cortas y robustas. Labio anal ventral con 30–32 setas cortas y robustas con puntas curvas. Hendidura anal casi transversal. Longitud media del cuerpo dorsal 24 mm (2,2–3,4 mm).

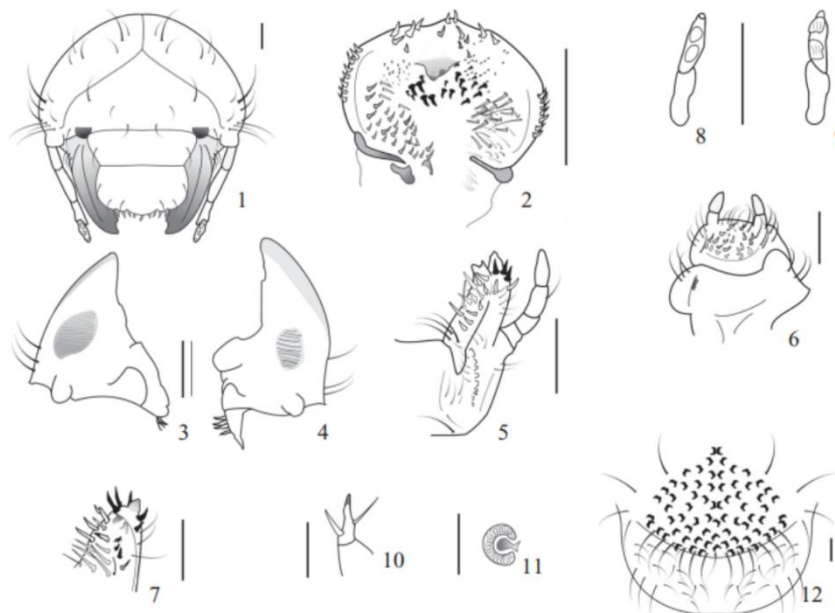


Figura 4. Estructuras diagnosticas de larvas L3 de *Cyclocephala barrerai*. Se observa: 1, Cabeza, vista frontal. 2, Epifaringe. Mandíbulas, vista ventral: 3, izquierda. 4, derecha. 5, Maxila derecha, vista dorsal. Último antenómero: 6, dorsal. 7, ventral. 8, Ápice de la maxila derecha, vista mesal. 9, Labio e hipofaringe. 10, Uña protarsal. 11, Placa respiratoria protorácica. 12, Ráster. Escalas: 1 mm, excepto figs. 6, 7, 10–11 = 0,5 mm. Tomado de Morón, et al., (2014).

2.1.3.1 Desarrollo ontogénico de Coleoptera: Scarabaeoidea

Identificar el sexo en larvas de insectos es un proceso complejo que varía según la especie, ya que la gran mayoría lucen idénticas a simple vista. El carácter primario más confiable para determinar el sexo en larvas de escarabajos (Coleoptera: Scarabaeoidea), particularmente durante el tercer estadio larval, es la presencia o ausencia del Órgano de Herold o ampolla terminal (Underwood, 1994).

La identificación en machos en tercer estadio larval consiste en una invaginación cuticular localizada en la región esclerotizada de la superficie ventral del noveno segmento abdominal. Macroscópicamente, se observa a través de la cutícula como una pequeña cicatriz o estructura de forma ovalada a arriñonada, rodeada de tejido mesodérmico (Mattos et al., 2015).

Mientras que las larvas en tercer estadio presuntamente hembras carecen por completo de esta estructura en el noveno esternito abdominal, presentando una superficie lisa y continua en esa región (Mattos et al., 2015).

Durante el desarrollo ontogénico, la ampolla terminal es el esbozo anatómico del tracto reproductivo masculino (específicamente, el primordio del conducto eyaculador y el edeago). Aunque comienza a formarse desde el primer estadio, es hasta el tercer estadio larval cuando su tamaño y diferenciación permiten una identificación visual clara, incluso sin necesidad de disección anatómica (Martínez y Lumaret, 2005).

En Coleoptera Scarabaeidae, el tercer estadio larval es el periodo de mayor duración y asimilación de biomasa en el ciclo de vida de los coleópteros edafícolas. Durante esta fase crítica, comienza a gestarse el dimorfismo sexual de tamaño (Sanchez-Cruz et al., 2025).

Aunque las tasas de crecimiento instantáneo pueden ser similares entre ambos sexos al inicio, los machos de muchas especies de la subfamilia Dynastinae y de la tribu Cyclocephalini tienden a prolongar su periodo de alimentación rápida o a presentar variaciones en el tiempo de desarrollo prepupal (Vendl et al., 2016).

Esta divergencia metabólica en el tercer estadio es la responsable de las diferencias de masa corporal que posteriormente sustentarán los caracteres sexuales secundarios y el tamaño general de los imagos.

2.2 Distribución de *Cyclocephala*

Morón et al. (2014) reportan registros de este género en Argentina, Bolivia, Brasil, Canadá, Centroamérica, Colombia, Ecuador, Estados Unidos, Guayana, México, Paraguay, Perú, Trinidad y Tobago y Venezuela. Para el 2017, se contabilizaban 350 especies a nivel mundial, de las cuales 62 especies se encuentran en México. El género *Cyclocephala* presenta una amplia distribución que abarca desde América del Norte hasta Sudamérica (Guzmán-Vásquez et al., 2017).

2.3 Plantas hospederas

Los adultos del género *Cyclocephala* han sido reportados con frecuencia en proximidad a plantas de la familia Araceae y epifitas (Guzmán-Vásquez et al., 2017), así como en el follaje de arbustos y árboles de los géneros *Acacia* y *Parkinsonia* (Morón et al., 2014). De acuerdo con Weppler (2008, como se citó en SENASICA, 2023) Es común encontrarlos en una variedad de pastos y cultivos agrícolas que incluyen granos, frijol, maíz, soja, trigo y centeno.

En México, *C. barrerae* se alimenta de pastos ornamentales ampliamente utilizados en campos de golf debido a su resistencia a enfermedades, bajo requerimiento hídrico y capacidad de formar césped. Entre estas especies de pastos destacan los géneros *Paspalum spp.*, *Lolium spp.*, además de *Agrostis stolonifera*, *Poa pratensis*, y *Cynodon dactylon* (Márquez, 2023).

2.4 Hábitos alimenticios y ciclo de vida

En regiones subtropicales semiáridas, los adultos de *Cyclocephala* se localizan frecuentemente en el follaje de arbustos y, ocasionalmente, pueden alimentarse de frutos (Morón et al., 2014). No obstante, se ha documentado que los adultos de *C. barrerae* son afágicos, por lo que su actividad se centra exclusivamente en la reproducción, dependiendo de las reservas energéticas acumuladas durante su etapa larval (Sanchez-Cruz et al., 2022).

El ciclo de vida de *C. barrerae* transcurre predominantemente bajo el suelo. Durante la temporada de lluvias, los adultos emergen para buscar pareja y copular; una vez realizado el apareamiento, los individuos retornan al sustrato. Las hembras fecundadas excavan cámaras en el suelo, a una profundidad de entre 5 y 15 cm, para depositar sus huevos. La oviposición ocurre en grupos de 10 a 20 unidades durante un periodo de 2 a 4 días; tras concluir este proceso, la hembra requiere un nuevo apareamiento para iniciar un ciclo de puesta subsecuente (King, 1994).

Los huevos son ovoides, de color blanco opaco. Al momento de la oviposición miden aproximadamente 2 mm de largo por 1 mm de ancho, alcanzando los 2.5 mm por 1.25 mm tras las primeras 24 horas (King, 1994). Tras la eclosión, la larva atraviesa tres estadios de desarrollo (L1, L2 y L3). Durante este periodo, incrementa su tamaño hasta seis veces, aunque la duración exacta de estas etapas bajo condiciones de campo permanece indeterminada.

Morfológicamente, las larvas son de tipo escarabeiforme (en forma de 'C'), con un cuerpo robusto y tres pares de patas bien desarrolladas. Se distinguen por presentar la gálea y la licinia maxilar fusionadas, mandíbulas robustas de orientación hipognata, y antenas y palpos maxilares compuestos por cuatro artejos; en las antenas, el último artejo es conspicuo y posee amplias áreas sensoriales (Cuate-Mozo et al., 2019). Las larvas poseen hábitos fosoriales y se alimentan de humus, restos vegetales y raíces de gramíneas (Morón et al., 2014).

Al finalizar el estadio L3, la larva inicia su preparación para la pupación expulsando el contenido intestinal y construyendo una celda de pupación en el suelo. En este refugio, entra

en un estado de reposo denominado diapausa como prepupa. Tras aproximadamente 30 días, el adulto emerge de la pupa, permaneciendo inactivo dentro de la celda hasta que las precipitaciones estimulan su salida a la superficie (King, 1994) (Figura 5).

Los adultos de *Cyclocephala* se caracterizan por presentar, en vista dorsal, los extremos de las mandíbulas visibles, además de un pronoto y cabeza convexos y lisos. Existe un dimorfismo sexual notable en los machos, quienes poseen una de las uñas anteriores engrosadas, torcida o bífida (Cibrián, 2013). Debido a que los registros de *C. barrerai* provienen mayoritariamente de observaciones de campo, los tiempos precisos de cada etapa biológica aún no han sido determinados con exactitud.



Figura 5. Ciclo de vida del coleóptero *Cyclocephala barrerai*. Se observan los estados y estadios del ciclo de vida de *C. barrerai*: 1) huevo, 2) larva L1, 3) larva L2, 4) larva L3, 5) prepupa y 6) pupa y 7) adulto. Fotografías del autor. Nota: Imágenes no a escala, para una referencia de tamaño favor de ver la sección 2.4 Hábitos alimenticios y ciclo de vida.

2.5 Sistema digestivo en insectos y microflora intestinal

El sistema digestivo de los insectos está constituido fundamentalmente por el canal alimenticio, ciegos gástricos, túbulos de Malpighi y glándulas salivales. Durante el desarrollo larval, los componentes del canal alimenticio crecen principalmente por elongación y no por división celular, siendo la región media la única que conserva capacidad mitótica. Morfológicamente, se distinguen tres regiones principales en el tubo digestivo: el intestino

anterior (estomodeo), el intestino medio (mesenterón) y el intestino posterior (proctodeo) (De la Cruz, 2006) (Figura 6).

Como señala Douglas (2009), existe una amplia diversidad de registros sobre la microbiota intestinal en diversos órdenes de insectos, tales como Hymenoptera, Diptera y Coleoptera. En muchos casos, la relación con estos microorganismos simbioses es esencial para que el hospedero obtenga nutrientes específicos que de otro modo serían inaccesibles.

En el caso de los coleópteros, se ha documentado (especialmente en insectos descortezadores) que los microorganismos simbioses del tracto digestivo son capaces de biosintetizar compuestos volátiles, tales como hidrocarburos, cetonas, alcoholes y derivados de azufre (Shultz et al., 2006; Audrain et al., 2015). Estos compuestos son utilizados por el hospedero como infoquímicos, los cuales pueden ser secretados a través de la cutícula o emitidos mediante las excretas (Hunte y Borden, 1990). La función principal de estas sustancias es la transmisión de información química que regula interacciones intra e interespecíficas.

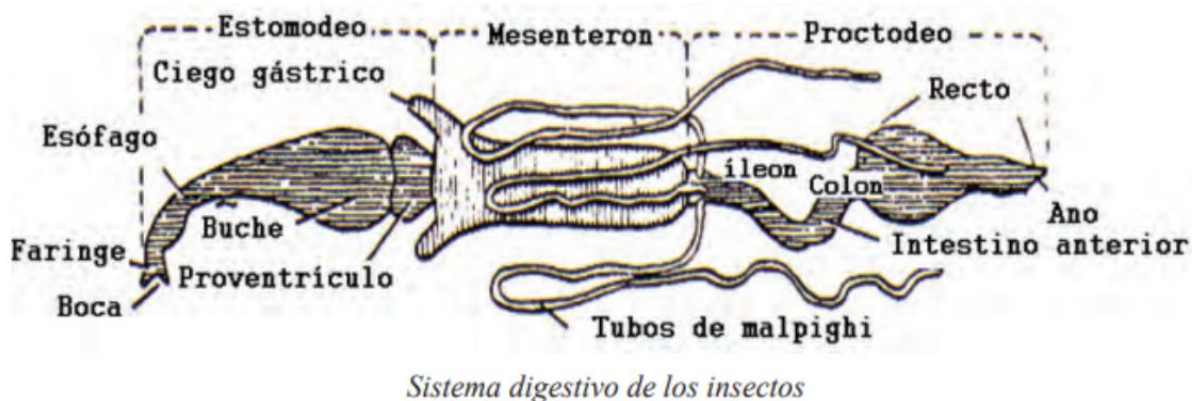


Figura 6. Esquema del sistema digestivo de un insecto adulto. Tomado de Jiménez y Sandino (2009).

2.6 Cutícula de los insectos

De acuerdo con Salazar-Escobar et al. (2021) una de las particularidades diagnósticas de la clase Insecta, es la envoltura endurecida denominada integumento. Este constituye la pared exterior del cuerpo y conforma un órgano complejo, cuya función primordial es regular la pérdida de agua por transpiración, servir como cubierta protectora de los órganos vitales y actuar como soporte mecánico al sistema muscular.

De la Cruz (2005) menciona que en los estadios inmaduros la cutícula suele ser flexible, membranosa y elástica (particularmente en diversas larvas o ninfas); estas propiedades mecánicas son fundamentales durante el desarrollo juvenil, ya que facilitan el incremento de biomasa y las mudas sucesivas durante la metamorfosis. En contraste, en los insectos adultos la cutícula es generalmente rígida e inelástica debido a un proceso de endurecimiento

bioquímico llamado esclerotización. Este proceso origina una serie de placas engrosadas denominadas escleritos, clasificados según su posición en: *tergitos* (dorsales), *esternitos* (ventrales) y *pleuritos* (laterales). Asimismo, la invaginación de la cutícula forma estructuras endoesqueléticas llamadas apodemas, donde se inserta la musculatura motora de los artrópodos.

El estudio de Villalobos-Moreno et al. (2011) sobre el integumento de la abeja *Apis mellifera* Linnaeus, 1758, describe los tres componentes básicos de esta estructura: la membrana basal, la epidermis y la cutícula. La epidermis consiste en una capa de células de apariencia sincitial, mientras que la cutícula propiamente dicha está compuesta por estratos de quitina asociados a proteínas, compuestos fenólicos y pigmentos. Estos componentes varían en proporción según la región corporal y el estrato cuticular específico: epicutícula, exocutícula y endocutícula (Figura 7).

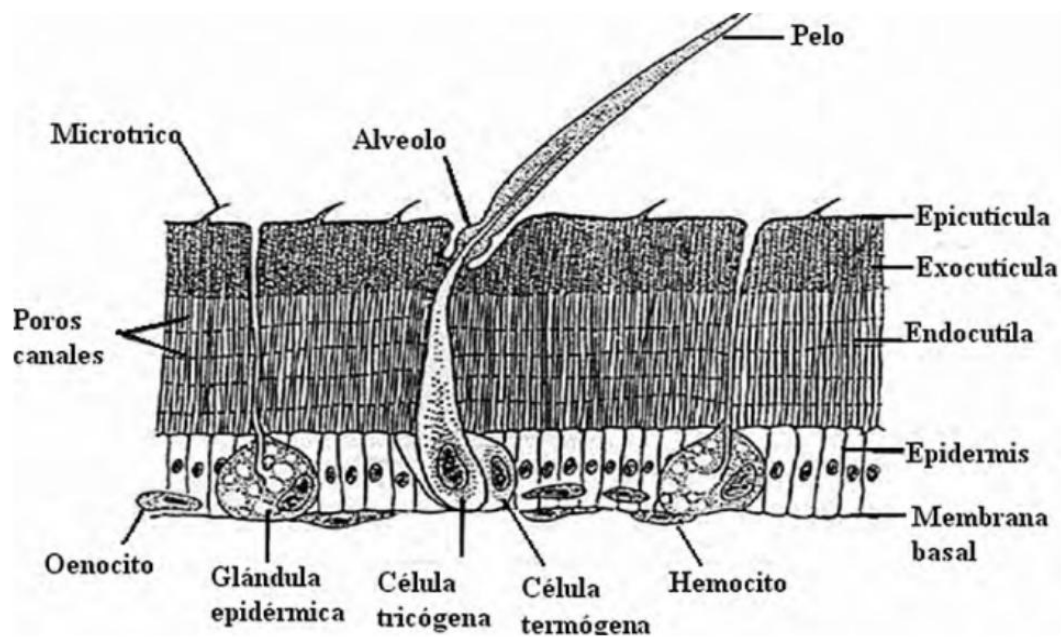


Figura 7. Estructura histológica de la cutícula de un insecto. Adaptado de Jiménez y Sandino (2009).

2.7. Métodos de control de *Cyclocephala barrerai*

2.7.1 Químico

En México, una estrategia preventiva común para el control químico de las poblaciones de *C. barrerai*, especialmente en áreas con alta incidencia, es la aplicación de insecticidas granulados en el suelo durante la siembra. Los productos más utilizados incluyen Carbofuran, Terbufos, Teflutrina, Clorpirifos e Imidacloprid. Estos compuestos se incorporan al suelo y mediante riego, se facilita su transporte hacia los horizontes edáficos inferiores donde se localizan las larvas. Particularmente, el Imidacloprid presenta alta solubilidad, lo que

permite su aplicación directa a través del sistema de irrigación (Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, 2006).

No obstante, al ser sustancias que se aplican directamente en el suelo, su uso conlleva desventajas ambientales significativas. Entre los riesgos principales destacan la lixiviación y contaminación de mantos acuíferos subterráneos, la baja especificidad (que provoca la intoxicación de insectos benéficos, aves, mamíferos y organismos acuáticos), así como la bioacumulación en los tejidos de la fauna local. Además, estos productos representan un riesgo alto para la salud humana debido a la posibilidad de inhalación o contacto directo durante su manejo (Cárdenas, 1989; Dennis, et al, 1991; Chemos solutions through service. 2020).

2.7.2 Biológico

El control biológico de plagas consiste en el uso de enemigos naturales (Nicholls, 2008). Estos agentes de control pueden ser bacterias, hongos, virus, nemátodos y protozoarios, parasitoides y depredadores, los cuales poseen la ventaja de actuar de forma específica sobre el organismo de interés, minimizando el impacto en la fauna no objetivo y presentando, en muchos casos, un alto potencial para la producción a gran escala (Badi, et al., 2006).

De acuerdo con el Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (2006), el uso de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, junto con bacterias como *Bacillus popilliae* y el nematodo *Heterorhabditis bacteriophora*, resulta viable para el combate de larvas del complejo “gallina ciega”, durante sus primeros estadios de desarrollo. Estos microorganismos infectan al hospedero al entrar en contacto con su cutícula o ser ingeridos; una vez dentro, proliferan utilizando los tejidos del insecto como sustrato nutricional, lo que eventualmente conduce a la muerte del individuo.

Para optimizar la eficacia de estos agentes, es fundamental seleccionar cepas con virulencia comprobadas e incorporarlas al suelo durante la preparación del terreno o mediante sistemas de riego por subirrigación (Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, 2006).

Adicionalmente, se han documentado interacciones de parasitismo en otros escarabeídos. Por ejemplo, en larvas de *C. signaticollis* se han registrado parasitoides del orden Diptera, destacando la especie *Mallophora ruficauda*, cuyo estadio larval es ectoparasitoide solitario; también se ha reportado que esta misma especie afecta a otros miembros de la familia Scarabaeidae (Zermoglio, 2018).

2.8 Plaga reglamentada según la NIMF 5

De acuerdo con la Norma Internacional para Medidas Fitosanitarias (NIMF) No. 8 “Determinación de la situación de una plaga en un área” (CIPF, 2017), el género *Cyclocephala* se encuentra catalogado en México bajo la categoría ‘Presente: sujeta a control oficial’. En consecuencia, conforme a la NIMF No. 5 “Glosario de términos fitosanitarios” (CIPF, 2020), se le clasifica como una plaga reglamentada. Esta denominación implica que el género posee una importancia económica para el área y que, aunque pueda tener presencia en el territorio, su

distribución no es amplia y se mantiene bajo medidas de control oficial para mitigar sus impactos negativos.

2.9. Ecología química de insectos

La ecología química se enfoca en la comprensión del origen, la función y la importancia de los compuestos químicos naturales que median las interacciones biológicas, tanto intraespecíficas como interespecíficas (Harborne, 2001).

Dentro de la entomología, este campo de estudio se ha consolidado al analizar las complejas interacciones entre las plantas e insectos, así como en los sistemas de comunicación mediada por feromonas (entre individuos de la misma especie) o aleloquímicos (entre individuos de distintas especies). Es importante resaltar que muchos de estos compuestos son biosintetizados y liberados con el apoyo de la microbiota intestinal del insecto (Sharon et al., 2011; Engel y Moran, 2013; Molina, 2013, como se citó en Poveda Arias, 2019).

Los aleloquímicos se clasifican en función al beneficio derivado de la interacción entre el emisor y el receptor (Sbarbati, et al. 2006):

- **Alelomonas.** Benefician al organismo que emite la señal (secreciones defensivas o repelentes).
- **Kairomonas.** Benefician al organismo receptor (compuestos emitidos por una presa que atraen a un depredador o parasitoide).
- **Sinomonas.** Benefician tanto al emisor como al receptor (compuestos emitidos por flores que atraen polinizadores).

Por su parte, Blomquist y Bagnères (2010) destacan que los hidrocarburos cuticulares desempeñan un papel fundamental en la comunicación intra e interespecífica, funcionando como feromonas, kairomonas, señales de reconocimiento de sexo y especies y, en insectos sociales, reconocimiento de colonias.

En conjunto, los avances en esta disciplina han permitido comprender cómo los insectos utilizan las señales químicas para garantizar su supervivencia y éxito reproductivo en diversos ecosistemas (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, 2020).

2.9.1 Ecología química de Melolonthidae

De acuerdo con Romero-López (2016), en la familia Melolonthidae se han documentado sistemas complejos de comunicación química sexual (CQS) y comunicación química alimentaria (CQA) (esta última dada por las interacciones entre los escarabajos y sus plantas hospederas) presentes en especies de los géneros *Phyllophaga*, *Macrodactylus*, *Cyclocephala* y *Paranomala* distribuidas en México. Estos estudios han permitido caracterizar los componentes básicos de la señalización química, identificando con precisión al emisor, el mensaje químico y el receptor.

Respecto a la CQS, Romero-López (2016) señala que las sustancias atractivas en las hembras de este grupo pueden originarse en tres sitios principales: 1) un epitelio secretor especializado ubicado en la cámara genital; 2) microorganismos endosimbióticos y 3) glándulas accesorias de tipo I y II. Asimismo, se dispone de información detallada sobre la anatomía y la electrofisiología del sistema olfativo de estos coleópteros. En este sentido, se han identificado diversos tipos y subtipos de quimiorreceptores en las antenas (específicamente sensilas placoideas y aurículas) los cuales desempeñan un papel crucial en la detección y respuesta a las feromonas de atracción sexual.

2.9.2 Ecología química de *Cyclocephala*

Haynes et al. (1992) documentaron que las hembras de *C. lurida* sintetizan una feromona sexual con el fin de atraer a los machos. Para validar este mecanismo, se realizaron bioensayos utilizando trampas cebadas con distintos estímulos: hembras adultas, larvas conespecíficas y extractos cuticulares de larvas obtenidos mediante inmersión en hexano.

Los resultados demostraron que una cantidad significativamente mayor de machos adultos fue atraída por las trampas que contenían extractos de hexano de hembras, en comparación con las trampas control. A partir de estos hallazgos, Haynes et al. (1992) concluyeron que la respuesta conductual de los machos adultos está mediada por compuestos volátiles producidos tanto por los estadios larvales como por las hembras adultas de la misma especie.

2.10. Bases de la cromatografía de gases

Como menciona Harvey (2000), la cromatografía de gases (GC) es una técnica analítica de alta resolución fundamental en química y bioquímica, empleada para la separación, identificación y cuantificación de componentes presentes en mezclas gaseosas o volátiles. El fundamento de esta técnica radica en la partición diferencial de los analitos entre una fase móvil (gas inerte) y una fase estacionaria (recubrimiento interno de la columna cromatográfica). La separación se fundamenta en las diferencias de afinidad química (polaridad) y volatilidad de los componentes, los cuales migran a velocidades distintas a través de la columna. Tras la separación, los analitos son detectados y cuantificados, generando un cromatograma que representa la intensidad de la señal en función del tiempo de retención. Esta técnica es muy útil en aplicaciones industriales y científicas, incluyendo el análisis de compuestos orgánicos volátiles (COV), la detección de contaminantes ambientales y el control de calidad en la industria farmacéutica y alimentaria.

2.10.1 Obtención de volátiles mediante técnica de Inmersión

La técnica de inmersión directa se utiliza para garantizar que el espécimen reciba una cobertura total y uniforme del compuesto evaluado a través de su barrera cuticular. Este método consiste en sumergir cortes de larvas de una edad y un estadio de desarrollo estrictamente

estandarizados en una solución o suspensión del solvente durante un tiempo predeterminado (Nault et al., 2006; Sabatini et al., 2001)

La viabilidad científica y el rigor estadístico de la técnica de inmersión directa dependen de una estandarización minuciosa de los parámetros biológicos del insecto y de las condiciones ambientales del laboratorio. Cualquier variación en la edad, el estado nutricional o las condiciones de incubación de las larvas puede introducir sesgos fisiológicos significativos en los resultados toxicológicos, alterando el cálculo de las métricas farmacodinámicas, lo que puede ser una desventaja (Nault et al., 2006)

2.10.2 Obtención de volátiles mediante técnica de Headspace

Como menciona Guerrero et al. (2020) el fundamento de esta técnica reside en la captación de la fracción volátil emitida por los insectos vivos. La obtención de volátiles en Headspace presenta una serie de ventajas respecto a la extracción por inmersión. Por un lado, es una técnica que no implica el sacrificio de los ejemplares o la manipulación de alguna de sus estructuras, por lo que permite prolongar el tiempo de la obtención de los volátiles, siempre y cuando los insectos reciban sustento para su mantenimiento. A su vez, es un método selectivo, debido a que únicamente son captados los compuestos volátiles emitidos por los insectos. Además, en algunas especies los compuestos feromonales no se acumulan en glándulas, sino que son sintetizados y emitidos inmediatamente y al realizar un seguimiento prolongado en el tiempo permite obtener una aproximación más precisa del perfil de volátiles emitidos por los insectos.

2.11 Espectrometría de masas y fundamentos de la histología

2.11.1 Espectrometría de masas (MS)

Mientras que la cromatografía de gases separa los componentes de una mezcla volátil, la espectrometría de masas (MS) es la técnica encargada de identificarlos. Tras la elución de la columna cromatográfica, los compuestos son conducidos a una fuente de ionización (típicamente impacto electrónico), donde las moléculas son bombardeadas con electrones, fragmentándose en iones con diferentes relaciones masa/carga (m/z) (Gutiérrez y Droguet, 2002).

Estos iones son separados por un analizador (como el cuadrupolo), lo que genera un espectro de masas. Cada compuesto posee un patrón de fragmentación único, el cual actúa como una huella dactilar química. La identificación computarizada de estos espectros obtenidos con bases de datos estandarizadas, como la del National Institute of Standards and Technology (NIST), permite determinar la identidad de los hidrocarburos y otros volátiles con un alto grado de confianza estadística. (Gutiérrez y Droguet, 2002).

2.11.2 Fundamentos de la histología y microscopía

Para comprender el origen biológico de los compuestos identificados, es necesario analizar la ultraestructura de los tejidos tegumentarios mediante técnicas histológicas y microscópicas. En el caso de *C. barrerai*, el uso de la microscopía electrónica de barrido resulta esencial, ya que permite la observación de la topografía superficial con gran resolución. A través de esta técnica, es posible identificar estructuras especializadas como sensilas (mecanorreceptores y quimiorreceptores), poros glandulares y aperturas epicuticulares. De acuerdo con Villalobos-Moreno et al. (2011), estos elementos histológicos constituyen las rutas anatómicas por las cuales los hidrocarburos y otros compuestos volátiles son secretados hacia el exterior, validando así la correspondencia entre la firma química obtenida mediante GC-MS y la capacidad morfológica del insecto para emitir dichos infoquímicos.

2.12 Microscopía Electrónica de barrido

El microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) es un instrumento de microscopía avanzado que se utiliza para observar y analizar la morfología de muestras a nivel microscópico y nanométrico. A diferencia de los microscopios ópticos convencionales, el SEM utiliza haces de electrones en lugar de luz visible para producir imágenes detalladas de la superficie de muestras sólidas. El haz de electrones barre la superficie de la muestra y produce una imagen tridimensional de alta resolución, lo que permite estudiar la topografía, textura y composición de diversos materiales (Goldstein et al., 2017 y Echlin, 2011).

El SEM se utiliza en una amplia variedad de campos, incluyendo la investigación científica, la industria, la metalurgia, la geología, la biología y la nanotecnología. Sus aplicaciones van desde el análisis de microestructuras en materiales hasta la caracterización de superficies celulares y partículas a nanoescala (Renau-Piqueras y Faura, 1985).

Entre sus principales ventajas destaca su extraordinaria resolución y profundidad de campo, herramientas indispensables para la nanotecnología y la biología estructural. No obstante, el sistema presenta desventajas críticas, como el elevado costo de adquisición y mantenimiento, la necesidad de operar en condiciones de alto vacío y la complejidad en la preparación de las muestras. Este último punto es especialmente relevante, ya que el procesamiento (fijación, deshidratación y recubrimiento) suele matar a los especímenes biológicos, imposibilitando la observación de procesos en vivo (Alberts et al., 2002).

2. Justificación

El estudio de los coleópteros de la familia Melolonthidae, particularmente del complejo “gallina ciega”, es fundamental debido a su dualidad funcional en los ecosistemas de México. Por un lado, muchas especies de este complejo son consideradas plagas rizófagas de alto impacto económico en cultivos básicos como el maíz, el frijol y diversas hortalizas, donde pueden reducir el rendimiento hasta en un 40% si no se manejan adecuadamente (Cuate-Mozo et al., 2025). Por otro lado, géneros como *Cyclocephala* actúan como "ingenieros del suelo", facilitando la aireación, la infiltración de agua y la descomposición de materia orgánica, procesos críticos para la salud del sustrato. Esta aportación ecológica concuerda con lo señalado por Pérez-Agis et al. (2014), quienes afirman que diversas especies benéficas dentro del "complejo gallina ciega" actúan como consumidoras de detritos, desempeñando un papel clave en la ecología del suelo y actuando como aliadas en los agroecosistemas.

Actualmente, la mayoría de los programas de manejo fitosanitario se basan en el uso indiscriminado de insecticidas de amplio espectro, debido a la incapacidad de distinguir entre especies plaga y especies saprófagas o benéficas en estado larval. Esta falta de especificidad no solo conlleva un gasto económico innecesario para los productores, sino que provoca un impacto ambiental severo, afectando la biodiversidad del suelo y la entomofauna no objetivo Pérez-Agis et al. (2014).

La presente investigación se justifica por la necesidad de generar conocimiento biológico y morfológico preciso sobre *C. barrerae*. Al documentar de manera detallada su estadio larval (L3), sus períodos de emergencia y su morfología diagnóstica. Esto es un paso indispensable para transitar de un manejo generalista a uno basado en el Manejo Integrado de Plagas (MIP), permitiendo que las intervenciones sean dirigidas y biológicamente justificadas.

Finalmente, este trabajo contribuye a la actualización de los registros biológicos de la especie en México. La información aquí generada servirá como base para futuras investigaciones sobre la ecología química y el comportamiento reproductivo de la especie, fortaleciendo el entendimiento de la biodiversidad edáfica nacional.

4. Hipótesis

Los coleópteros del sexo masculino de la especie *C. barrerae* en etapa adulta son atraídos por los volátiles que emiten las larvas L3.

5. Objetivos

Determinar el perfil de los compuestos volátiles emitidos por larvas L3 de *Cyclocephala barrerae*, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), la caracterización morfológica de su cutícula mediante microscopía electrónica de barrido y la evaluación de la respuesta conductual de los adultos, para analizar la posible

relación entre la composición química de las larvas y la atracción observada de individuos de la misma especie.

5.2 Objetivos específicos

- Identificar de manera tentativa los compuestos volátiles presentes en larvas L3 y sus excretas de *Cyclocephala barrerae* mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), con el fin de establecer su perfil química.
- Caracterizar la superficie cuticular de las larvas L3 mediante microscopía electrónica de barrido para identificar la presencia o ausencia de estructuras relacionadas con la posible liberación de compuestos volátiles.
- Evaluar la respuesta conductual de adultos de *Cyclocephala barrerae* frente a larvas L3 y sus excretas mediante bioensayos de atracción, para determinar la existencia de una respuesta diferencial entre machos y hembras.

6. Materiales y métodos

6.1 Obtención, cría y reproducción de adultos de *Cyclocephala barrerae*

Los ejemplares adultos de *C. barrerae* se recolectaron en el parque de béisbol ‘La Presa’, ubicado en la ciudad de Puebla, México (18°58'26.0" N 98°14'46.4" W), durante los meses de mayo y junio de 2020 (Sanchez-Cruz et al., 2022). El establecimiento, cría y reproducción de los insectos se realizó siguiendo el protocolo de Sanchez-Cruz, et al., (2025) en el Laboratorio de Ecología Química del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI-IPN) (Figura 8). Las condiciones ambientales se mantuvieron controladas en una cámara de cría a una temperatura de 26 ± 3 °C, una humedad relativa (HR) del $70 \pm 20\%$ y un fotoperiodo invertido de 12:12h (L:O).

A continuación, se describe de manera sucinta la metodología por Sanchez-Cruz y colaboradores (2025). Para obtener la primera generación de huevos, se establecieron unidades de apareamiento conformadas por tríadas (dos machos y una hembra sexualmente maduros). Cada unidad se colocó en un recipiente de polipropileno de 500 mL con 250 mL de sustrato nutritivo compuesto por hojarasca, madera triturada y suelo humedecido con agua destilada. Los recipientes se sellaron con malla de gasa fina y bandas elásticas para permitir el intercambio gaseoso.

Transcurridas las primeras 24 h, los huevos se recolectaron y transfirieron individualmente a recipientes de plástico de 500 mL con el sustrato nutritivo previamente descrito (Sanchez-Cruz, et al., 2024) Se realizó un monitoreo quincenal del desarrollo larval hasta alcanzar el estado de pupa; durante este periodo, el sustrato se renovó mensualmente y se mantuvo la humedad mediante la adición periódica de agua.

Al alcanzar el estado de pupa, los ejemplares se trasladaron individualmente a recipientes de 35 mL con 25 mL de sustrato húmedo. Estos se resguardaron en contenedores de polipropileno (15 x 10 x 5 cm) con ventilación superior protegida por gasa. Para prevenir la desecación, se mantuvo una lámina de agua de 25 mL en el fondo del contenedor externo. La emergencia de los adultos se monitoreó cada 24 h, manteniendo a cada individuo en aislamiento hasta su utilización en los bioensayos (Figura 8).



Figura 8. Obtención de cría de *Cyclocephala barrera*. Se observa: A) Contenedores de plástico para adultos de *C. barrera* en apareamiento procedentes del campo. B) Sala de cría. C) Recolección de huevos. D) Molino de martillos para moler hojas y madera para el sustrato. E) Mezcla del sustrato. F) Sustrato en horno de secado. G) Raíces de hierba. H) Cría de larvas en contenedores de plástico individuales. I) Celofán sobre los contenedores de cría de larvas. J) Contenedores de cría de larvas bajo luz roja. K) Pupas en contenedores de plástico. L) Contenedores de pupas colocados en una caja de plástico. Adaptado de Sanchez-Cruz et al., (2025).

6.2 Obtención de volátiles cuticulares y de excretas de larvas L3 mediante el método de inmersión

Para la obtención de los compuestos volátiles cuticulares, se seleccionaron ocho larvas del tercer estadio de *C. barrerae*. Los ejemplares fueron sacrificados mediante exposición a -4°C durante 40 minutos. Posteriormente, cada larva se sumergió de manera individual en un vial de vidrio ámbar de 2.5 ml de capacidad, conteniendo 1 mL de hexano grado HPLC, Marca: karal.

La mezcla se homogeneizó mediante un vortex (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, modelo G-560) durante 5 minutos para asegurar la extracción efectiva de los compuestos de la superficie cuticular. Tras el proceso, las larvas fueron retiradas de los viales. La solución se concentró a un volumen final de 200 µL bajo una corriente constante de nitrógeno gaseoso. Finalmente, los extractos se almacenaron en refrigeración a -4°C hasta su posterior análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

6.2.1 Obtención de volátiles en excretas de larvas L3 mediante el método de inmersión

Bajo condiciones de iluminación natural y dentro de una campana de extracción (sin flujo de aire para evitar la dispersión de volátiles), se colocaron grupos de diez larvas L3 en cajas Petri de vidrio estériles durante un periodo de una hora para la obtención de excretas. Transcurrido este tiempo, se recolectó 1g de excretas utilizando pinzas entomológicas previamente desinfectadas con hexano grado HPLC. Las muestras se depositaron en viales ámbar y se procesaron siguiendo la metodología de extracción por inmersión descrita en el apartado anterior. En total, se analizaron las excretas provenientes de seis grupos experimentales (n=6), conformados por 10 larvas cada uno.

6.2.2 Identificación de volátiles cuticulares y en excretas de larvas L3 mediante GC-MS

Para la identificación de los compuestos, se inyectaron 2 µL de cada extracto en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A acoplado al espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975C; Palo Alto, CA, USA.

Se utilizó una columna capilar no polar de sílice fundida SLB-5ms (SUPELCO Analytical; 30 m x 0.25 mm d.i., 0.25 µm de espesor de película). El puerto de inyección se operó en modo *split* (relación 1:25) a una temperatura de 250 °C, utilizando hidrógeno como gas portador con un flujo constante de 2 mL/min. El programa de temperatura del horno inició a 150 °C (mantenidos por 2 min), con una rampa de calentamiento de 5 °C hasta alcanzar los

308 °C, con un tiempo total de corrida de 33.06 min. La línea de transferencia (auxiliar) se mantuvo a 280 °C. El espectrómetro de masas se operó en modo de ionización electrónica (70 eV) y modo de adquisición *SCAN*, cubriendo un intervalo de masas de 29 a 400 unidades de masa atómica (uma) (Peralta-Falcón, et al., 2020).

6.3. Obtención de volátiles mediante el método Headspace

6.3.1 Preparación del equipo

- 1) **Limpieza y desinfección.** Se lavó el material con jabón para cristal (HYCEL, HYCLIN PLUS NEUTRO, México) y se enjuagó con agua destilada. Posteriormente fue secado en un horno (Riossa, 41 x 35 x 30 cm, México) durante 1h a 150° C.
- 2) **Preparación y configuración del equipo de aireación dinámica.** De acuerdo con la técnica de aireación dinámica de Heat et al., (1992):
 - a) Se utilizó una cámara de vidrio (30 cm de longitud y 4 cm de diámetro exterior), que en la entrada tiene adaptado un filtro de carbón activado (para limpiar el aire de la entrada) y en la salida un conector de vidrio, al cual se conectaron dos pipetas Pasteur (PP) (etiquetadas como Hexano 1 y metanol 1) para recoger los volátiles extraídos por Headspace. En cada una se introdujeron 2 cm de lana del vidrio y se comprimió a manera de tapón. Posteriormente se agregó 0.35 g de polímero adsorbente (HayeSepQPororus. Sigma-Aldrich) y se cubrió con 2 cm de lana de vidrio comprimida.
 - b) Previo a la captura de volátiles, se limpió el interior de las PP con 3 ml de metanol seguidos de 3 mL de hexano y se dejó evaporar el solvente. El procedimiento se repitió 3 veces.
 - c) Se conectaron las PP a 2 flujómetros (Cole Parmer), conectados a una bomba de doble flujo (Welch, no.2522 B-01 A, Monroe, Louisiana, USA) con un flujo de succión constante de 500 mL/min durante 4 h a 27 °C, haciendo revisiones cada 10 minutos (Figura 9).

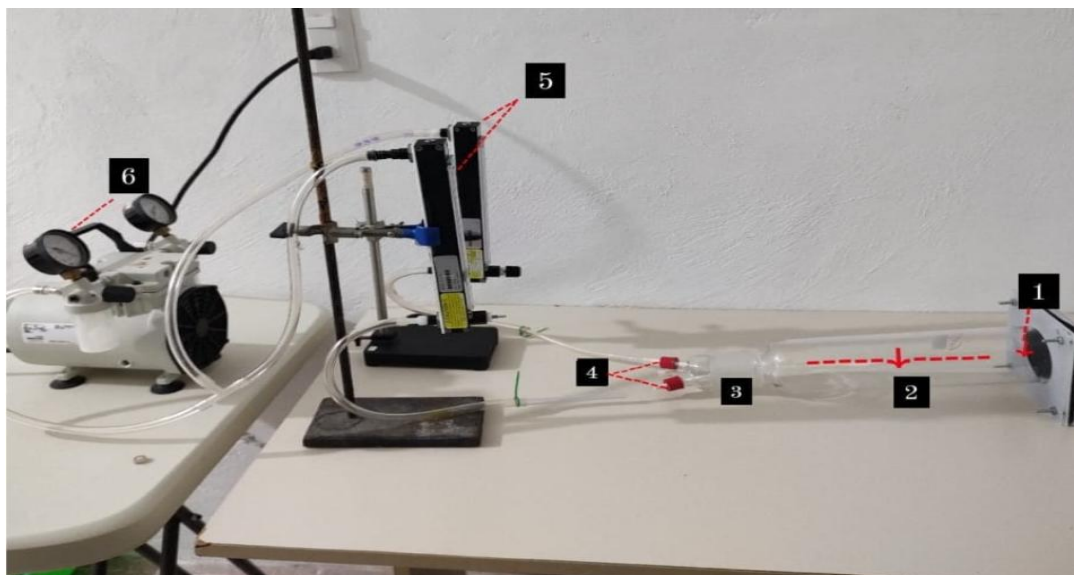


Figura 9. Configuración experimental del equipo de Headspace. Componentes: 1) filtro de carbón activado, 2) cámara de vidrio, 3) conector de vidrio, 4) pipetas Pasteur, 5) flujómetros y 6) bomba de doble flujo. Fotografía del autor.

6.3.2. Obtención de volátiles por Headspace

Dentro de la cámara de extracción se colocaron 10 larvas L3 de *C. barrerai*, se hicieron dos extracciones por aireación dinámica por Headspace con la cámara de vidrio vacía, como control. La extracción se realizó en rondas de 4 horas, de las 12:00 a 16:00 horas, dentro de un cuarto oscuro con temperatura de 23.8°C, 65 % de HR, haciendo revisiones cada 10 min para verificar que estuvieran vivas las larvas.

Al finalizar cada ronda, se devolvieron las larvas a su respectivo recipiente y con pinzas entomológicas se recolectaron las excretas en un vial ámbar con capacidad de 2.5 mL con 1.5 ml de hexano grado HPLC para analizar posteriormente el sobrenadante.

Después de cada ronda, se realizó una elución de cada PP con 2 ml de hexano y 2 ml de metanol (según su respectiva etiqueta) y fueron colectados individualmente en viales ámbar de 1.5ml (marca Agilent), los cuales fueron almacenados a -4° C, hasta su análisis.

6.3.3. Identificación de volátiles de larvas L3 extraídos por Headspace en CG-EM

De acuerdo con Sanchez-Cruz et al., (2020) los compuestos se eluyeron en 2 mL de hexano y se reconcentraron a 200 µL con una corriente de nitrógeno. Los resultados se

analizaron en el GC-MS descrito previamente, para la identificación de los volátiles capturados por Headspace.

El mismo procedimiento de elución y reconcentración con corriente de nitrógeno, se realizó con las muestras de metanol y excretas.

Se inyectaron 2 μ L de los extractos por GC-MS; temperatura de inicio del horno de 50 °C durante 2 min, aumentada a 220 °C en 8 °C/min y mantenida durante 2 min; el puerto de inyección funcionó en modo splitless 1:10 a una temperatura de 250 °C; con flujo fue de 2 ml/min de hidrógeno como gas portador. El EM trabajó con ionización electrónica (70 EV) en modo SCAN y un rango de masas de 35 a 550 UMA.

6.4. Bioensayos sobre la respuesta conductual de adultos *C. barrerai* ante la presencia de larvas conespecíficas en etapa L3

Para evaluar la respuesta conductual de los adultos *C. barrerai* ante la presencia de larvas conespecíficas en etapa L3, se realizó un bioensayo donde se colocó en una misma arena un adulto y una larva L3 de *C. barrerai* y se definieron parámetros para diferenciar una respuesta de atracción positiva de una respuesta de atracción negativa.

Los bioensayos se realizaron en un cuarto oscuro (completamente vacío, con las condiciones ya descritas en el apartado 2.3.1) durante el periodo de activación de los adultos de *C. barrerai*, de 12:30 a 16:00 horas aprox (Ciclo inverso correspondiente a 00:30 a 4:00 am.), sobre una mesa blanca, con el área despejada, para descartar que la respuesta de los individuos fuera influenciada por algún estímulo visual, como la presencia de objetos coloridos.

Previo a introducir los ejemplares (Adulto y larva L3 de *C. barrerai*) al cuarto oscuro, se desinfectó la mesa con alcohol etílico (al 90%). Los ejemplares adultos de *C. barrerai*, fueron tomados de la cámara de cría, sólo cuando se activaron (es decir, que salían de la tierra, buscando aparearse).

Como arena se utilizó un cristalizador de vidrio de 250ml de capacidad (10 cm de diámetro y 5 cm de altura), que contiene una caja petri (3.5 cm de diámetro por 1 cm de altura,) y una larva L3 de *C. barrerai*. La caja Petri se mantuvo cerrada con una malla y una liga para sujetar el trozo de tela y proteger a la larva. Después se introdujo al cristalizador un ejemplar adulto de *C. barrerai* y se tapó el cristalizador con una tapa de cristal (Figura 10).

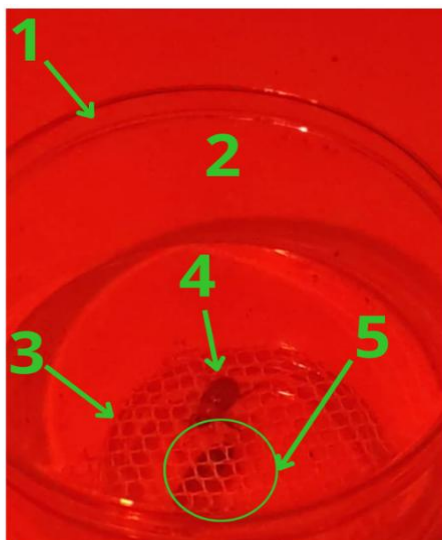


Figura 10. Arena de experimentación diseñada para evaluar la respuesta conductual de adultos de *Cyclocephala barrerae* ante larvas conespecíficas en estadio L3. Componentes: 1) tapa de vidrio, 2) cristalizados, 3) caja de Petri con malla, 4) adulto de *C. barrerae* y 5) larva en estadio L3. Fotografía del autor.

Para registrar el comportamiento tanto de la larva como el adulto de *C. barrerae*, dentro del cuarto se instaló una videocámara a color, con visión nocturna (marca Sony, visor electrónico Blanco y negro, pantalla LCD de 2.5", óptica 25x y 700 digital zoom, imagen nocturna Super NightShot (infrarrojo), con micrófono incorporado), el tiempo de grabación fue determinado por la respuesta del adulto hacia la larva L3. La interacción de ambos ejemplares dentro del cristalizador fue de 2 a 5 min.

El experimento se repitió un total de 78 veces utilizando un total de 15 hembras y 63 machos en etapa de apareamiento y 78 larvas L3. Registrando el comportamiento tanto de adultos como de larvas L3 de *C. barrerae*. Al finalizar el tiempo de grabación, se retiraron ambos ejemplares y cada uno fue devuelto a su respectivo contenedor.

El cristalizador, la caja petri, la tapa de vidrio y la malla fueron remojados con hexano (durante 5 min) previo a hacer la siguiente grabación, para evitar que quedaran restos de volátiles de la repetición anterior. Se alternaron distintos cristalizadores y cajas petri (alrededor de 5) entre cada grabación, todos con las mismas características y dimensiones, para dejar evaporar el hexano.

Los parámetros a consideración para respuestas de atracción positiva (RAP) del adulto de *C. barrerae* hacia la larva L3 fueron los siguientes: 1.- El adulto se acerca inmediatamente (en un lapso menor a 30 segundos) y de forma directa (en línea recta) a la caja petri donde se encuentra la larva L3 y permanece sobre o alrededor de la misma, mostrando interés enérgico por entrar a través de la malla o el cristal al menos durante un minuto (Figura 11). 2.- El adulto realiza movimientos rápidos, aleteo, movimiento de antenas, y en ocasiones muestra el edeago (Figura 12).

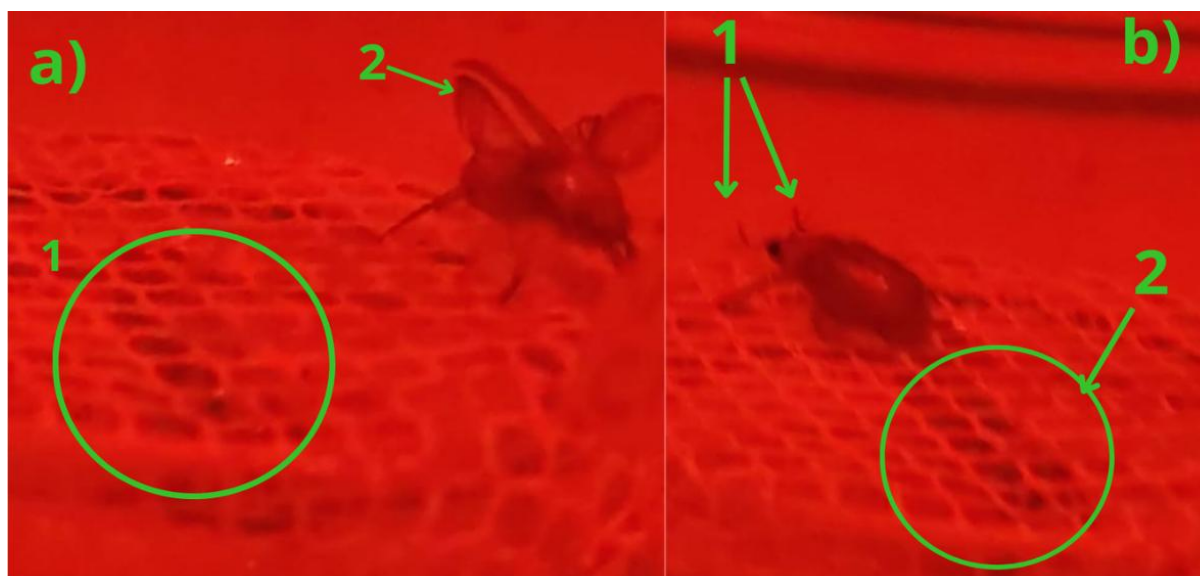


Figura 11. Evidencia conductual de la respuesta de atracción positiva del adulto de *Cyclocephala barrerae* hacia la larva L3. a) Adulto de *C. barrerae* (2) realizando aleteo estático sobre la superficie de la malla en respuesta a la presencia de la larva L3 (1). b) Adulto (1) exhibiendo movimientos antenales de exploración en proximidad a la larva (2). Las conductas observadas corresponden a los criterios definidos para el parámetro de evaluación 1. Fotografías del autor



Figura 12. Respuesta de atracción positiva del adulto de *Cyclocephala barrerae* hacia la larva L3 (parámetro 2). a) Adulto (1) posicionado adyacente a la caja de Petri, exhibiendo movimientos antenales de quimiorrecepción hacia la larva L3 (3). b) Adulto manifestando postura de arqueamiento corporal en respuesta a la proximidad del estímulo larvario. Fotografías del autor.

Si el adulto de *C. barrerae* cumple con al menos uno de los parámetros durante el primer minuto de interacción, se consideró RAP y se grabó durante un tiempo límite de 5 min.

Los parámetros para definir una respuesta de atracción nula (RAN) fueron los siguientes: 1.- El adulto se mantiene en la misma posición en la que se colocó al menos durante el primer minuto completo desde que se introdujo a la larva L3. 2.- El adulto avanza unos cuantos pasos a algún lugar del cristalizador, sin detenerse específicamente en la caja petri o a los costados. Si el adulto de *C. barrerae* cumple con al menos uno de los parámetros para RAN,

durante el primer minuto de interacción, se detuvo la grabación en un tiempo límite de 2 min (Figura 13).



Figura 13. Ausencia de respuesta de atracción del adulto de *Cyclocephala barrerae* hacia la larva L3 (parámetro 1). Se observa: 1) adulto de *C. barrerae* en estado estacionario, permaneciendo en su posición inicial de liberación y 2) larva de *C. barrerae*. Fotografía del autor.

6.5. Microscopía

Siguiendo la metodología de García-Hernández et al. (2019) y Delgado-Núñez et al. (2020), se realizaron microfotografías comparando dos cortes histológicos de cutícula (sin preparación previa) (Mag=400x) (10 μ m) tanto de larva L3 y de adulto de *C. barrerae*. en tacones de aluminio con adhesivo de carbono de doble cara y se observaron a través de microscopio de barrido electrónico ambiental (ESEM) modelo EVO LS10 Life Science, (Carl Zeiss, Jena, Alemania).

7. Resultados

7.1 Obtención de compuestos volátiles de larvas L3 por el método de inmersión

Al analizar los picos del cromatograma de las muestras de extractos cuticulares de larvas, no se encontraron volátiles en las ocho muestras estudiadas, sin embargo, en el cromatograma de las muestras de excretas se identificaron cinco compuestos.

7.1.1. Identificación de compuestos químicos cuticulares y en excretas de larvas L3 extraídos por inmersión en Cromatografía de Gases con Espectrometría de Masas

Los análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas detectaron coincidencias con cinco compuestos químicos en las muestras de compuestos cuticulares de larvas L3 de *C. barrerae* (Figura 14 y Cuadro 1). Tras la depuración de las muestras control (muestra 6 y 7) y aplicando un criterio de selección basado en una similitud mayor al 80% con la base de datos NIST, los compuestos propuestos son: 1-Hexanol, D-limoneno, Undecano 5-7 -Dimethyl-, Hexadecano, 1-Undecanol.

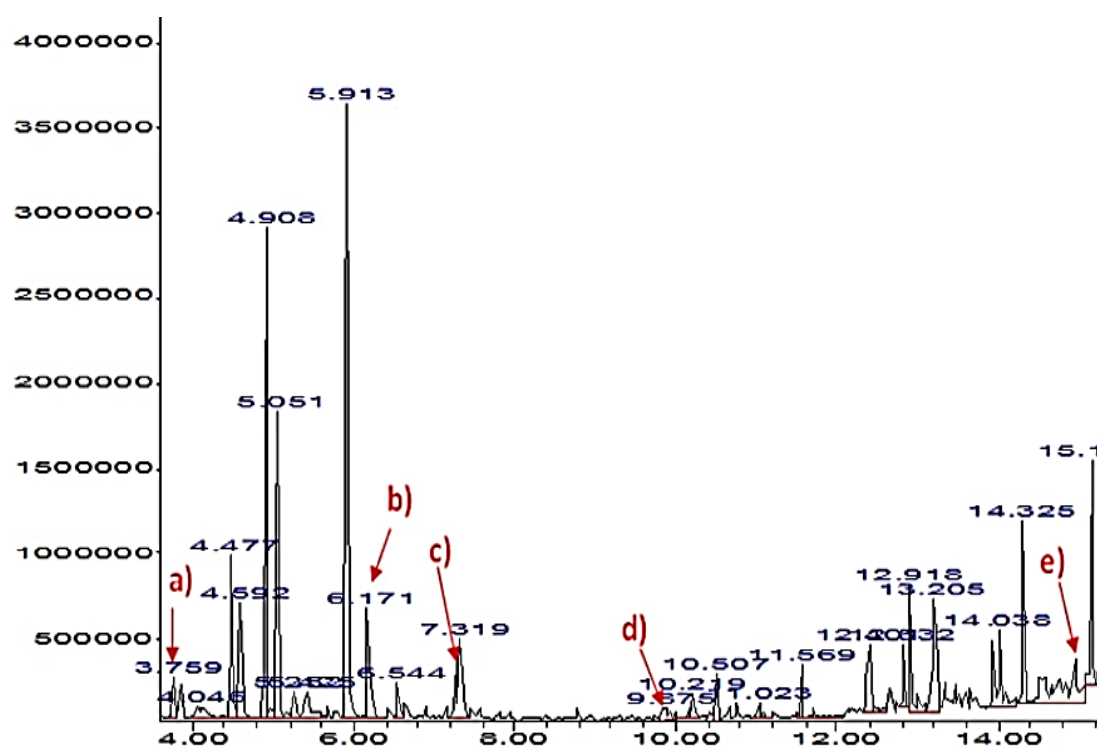


Figura 14. Cromatograma de compuestos volátiles en cutícula de larvas L3 *Cyclocephala barrerae* extraídos por inmersión. a) 1-Hexanol, b) D-limoneno, c) Undecano 5-7 -Dimethyl-, d) Hexadecano, e) 1-Undecanol.

Cuadro 1. Identidad propuesta de compuestos volátiles de cutícula de larvas L3 *Cyclocephala barrerae* extraídos por inmersión

Tiempo de retención	Porcentaje de similitud	Compuesto	No. CAS	Fórmula Química	Peso Molecular g/mol
3.759	81.0%	1-Hexanol	111-27-3	C ₆ H ₁₄ O	102.17
6.171	84.4%	D-limoneno	5989-27-5	C ₁₀ H ₁₆	136.23
9.846	82.4%	Hexadecano	544-76-3	C ₁₆ H ₃₄	226.44
14.928	89.6%	1-Undecanol	112-42-5	C ₁₁ H ₂₄ O	172.31

Se detectaron nueve compuestos químicos: metildicloroarsina, 5-cloro-6-hidroxi-1,3-dimetil-5,6-dihidrotimina, 9-metil-1,4,5,8-tetrazafenantreno, 5-acetamino-4,7-dihidroxibenzofurazano, 2,3,4, 4a,5,6-hexahidro-7-metoxiquinolina, 6,7-dimetoxi-3-fenil-4H-1-benzopirán-4-ona, 3-fluorobencenoetanol, 2-tienilamida y 1,3-bencil-N-benzoil y glucosamina. Estos compuestos fueron recurrentes en la mayoría de las muestras analizadas (4 de 6), lo que sugiere que constituyen el perfil hidrocarbonado característico de las excretas de esta especie en el tercer estadio larval (Figura 15 y Cuadro 2).

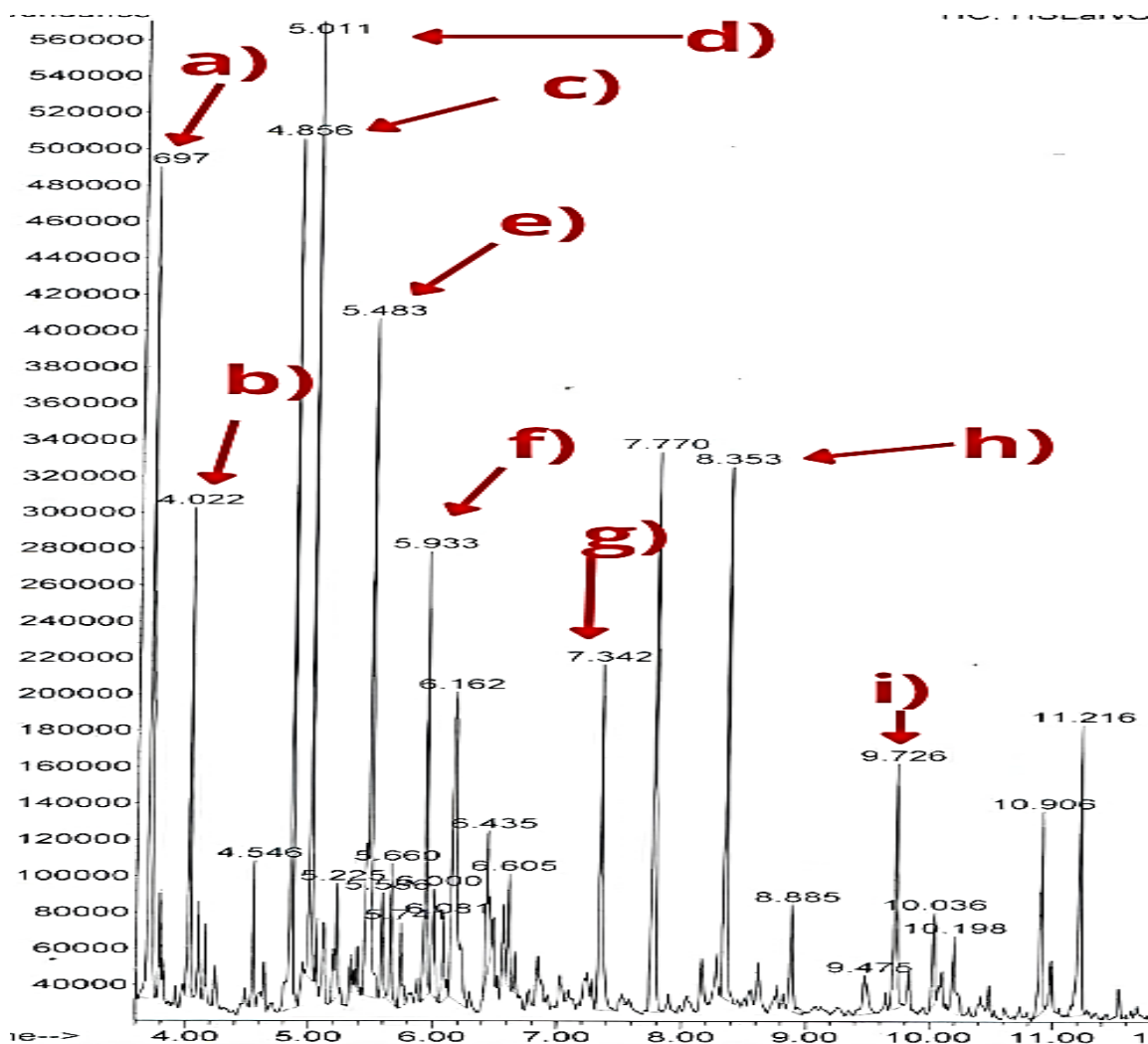


Figura 15. Cromatograma de compuestos volátiles identificados en excretas de larvas L3 *Cyclocephala barrerae* extraídos por inmersión: a) Metildicloroarsina b) 5-cloro-6-hidroxi-1,3-dimetil-5,6-dihidrotimina c) 9-metil-1,4,5,8-tetrazafenantreno, d) 5-acetamino-4,7-dihidroxibenzofurazano, e) 2,3,4, 4a,5,6-hexahidro-7-metoxiquinolina, f) 6,7-dimetoxi-3-fenil-4H-1-benzopirán-4-ona, g) 3-fluorobencenoetanol, h) 2-tienilamida, i) 1,3-bencil-N-benzoil glucosamina.

Cuadro 2. Propuesta de compuestos volátiles en excretas de larvas L3 *Cyclocephala barrerae* extraídos por inmersión

Tiempo de retención	Porcentaje de similitud	Compuesto	No. CAS	Formula Química	Peso Molecular g/mol
3.697	80%	Metildicloroarsina	593-89-5	CH ₃ AsCl ₂	160.86
4.022	80.2%	5-cloro-6-hidroxi-1,3-dimetil-5,6-dihidrotimina	100201-55-6	C ₇ H ₁₁ ClN ₂ O ₃	206.63
4.856	81.2%	9-metil-1,4,5,8-tetraazafenantreno	62088-23-7	C ₁₁ H ₈ N ₄	196.21
5.011	87.3	5-acetamido-4,7-dihidroxibenzofurazano	153136-26-6	C ₈ H ₅ N ₃ O ₄	207.14
5.483	81.6%	2,3,4, 4a,5,6-hexahidro-7-metoxiquinolina	19500-64-2	C ₁₀ H ₁₅ NO	165.23
5.933	82.1%	6,7-dimetoxi-3-fenil-4H-1-benzopiran-4-ona	74195-17-3	C ₁₉ H ₁₈ O ₄	310.3
7.342	86%	3-fluorobencenoetanol	52059-53-7	C ₈ H ₉ FO	140.15
8.353	86.7%	2-tiofenocarboxamida	5813-89-8	C ₅ H ₅ NOS	127.16
9.726	81.7%	1,3-di-O-bencil-N-benzoil glucosamina	6501-94-6	C ₂₇ H ₂₉ NO ₆	463.52

7.2. Identificación de volátiles de larvas L3 extraídos por Headspace en CG-EM

Los diferentes volátiles presentes en el cromatograma se identificaron por sus tiempos de retención y se compararon con los datos registrados en la biblioteca espectral NIST /EPA/NIH (Versión de software 2.0, Gaithersburg, MD, EE. UU.) tomando en consideración aquellos que tuvieran un intervalo de rango superior del 80% de similitud de acuerdo con el NIST. La estructura química se realizó con el software ADC/ChemSketch Freeware 2020, Canadá.

7.2.1. Compuestos detectados en eluciones de metanol en las muestras 1,2,3,4,5 y 8 en CG-EM extraídos por Headspace de larvas L3 de *Cyclocephala barrerae*

Se proponen cuatro compuestos: 2-hexanol, Metoxifeniloxima-, 6-Metilfenantridina y Fenol. El compuesto “Metoxifeniloxima -” estuvo presente en 5 de 6 muestras, por lo que fue el más frecuente (Figura 16 y Cuadro 3).

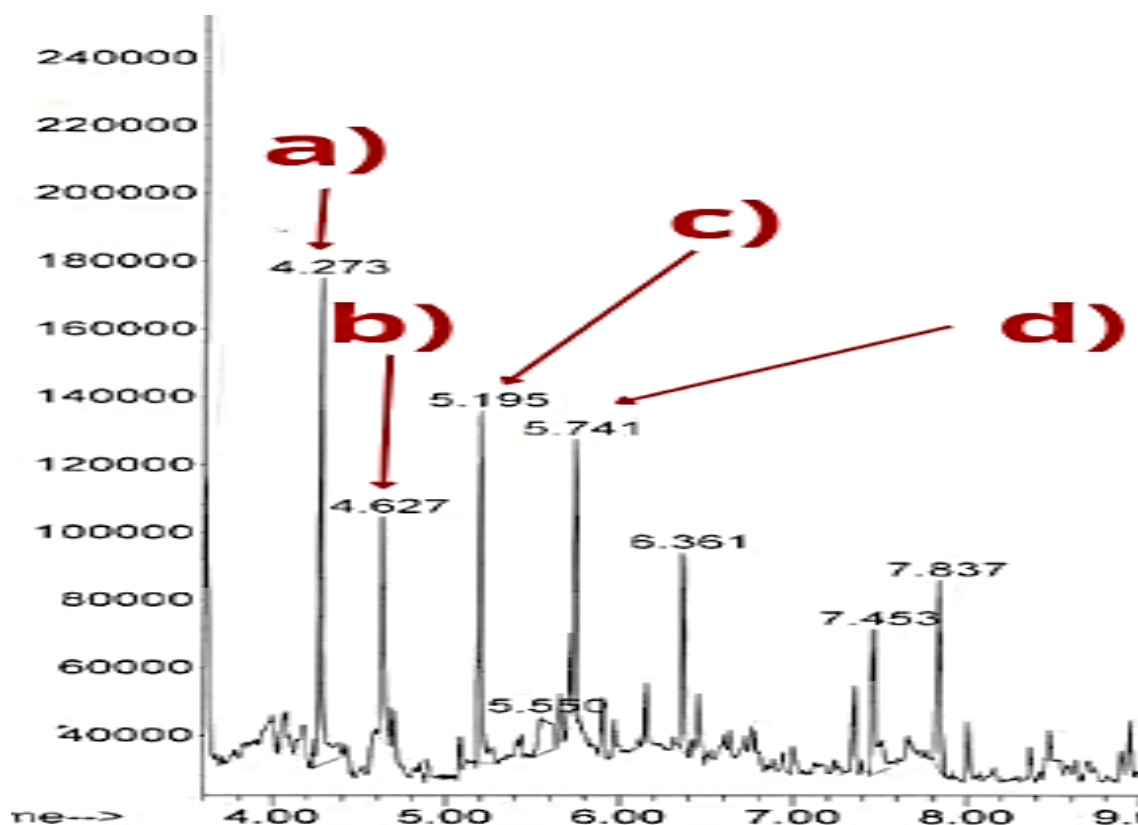


Figura 16. Cromatograma de compuestos volátiles identificados en eluciones de metanol en las muestras 1,2,3,4,5 y 8 en CG-EM extraídos por Headspace de larvas L3 de *Cyclocephala barrerae*: a) 2-hexanol, b) Metoxifeniloxima -, c) 6-Metilfenantridina y d) Fenol

Cuadro 3. Propuesta de compuestos identificados en eluciones de metanol en las muestras 1,2,3,4,5 y 8 en CG-EM extraídos por Headspace de larvas L3 de *Cyclocephala barrerai*

Tiempo de Retención	Porcentaje de similitud	Compuesto	No. CAS	Formula Química	Peso Molecular g/mol
3.6	91.5%	2-hexanol	626-93-7	C ₆ H ₁₄ O	102.17
4.590	81.9%	Metoxifeniloxima -	67160-14-9	C ₈ H ₉ NO ₂	151.16
5.173	81.3%	6-Metilfenantridina	3955-65-5	C ₁₄ H ₁₁ N	193.25
5.727	85.2%	Fenol	108-95-2	C ₆ H ₆ O	94.11

7.2.2 Compuestos identificados en eluciones de hexano en las muestras 1,2,3,4,5 y 8 en CG-EM extraídos por Headspace de larvas L3 de *Cyclocephala barrerai*

Se consideraron únicamente los componentes que se encontraban presentes en al menos 4 de 6 muestras, que en total fueron 7: P-Xileno, Benceno, 1,3-dicloro-, Heptano, 2,2,4,6,6-pentametil-, D-limoneno, Nonanal, Acetato de 3,5,5-trimetilhexano y Nonadecano (Figura 17 y Cuadro 4).

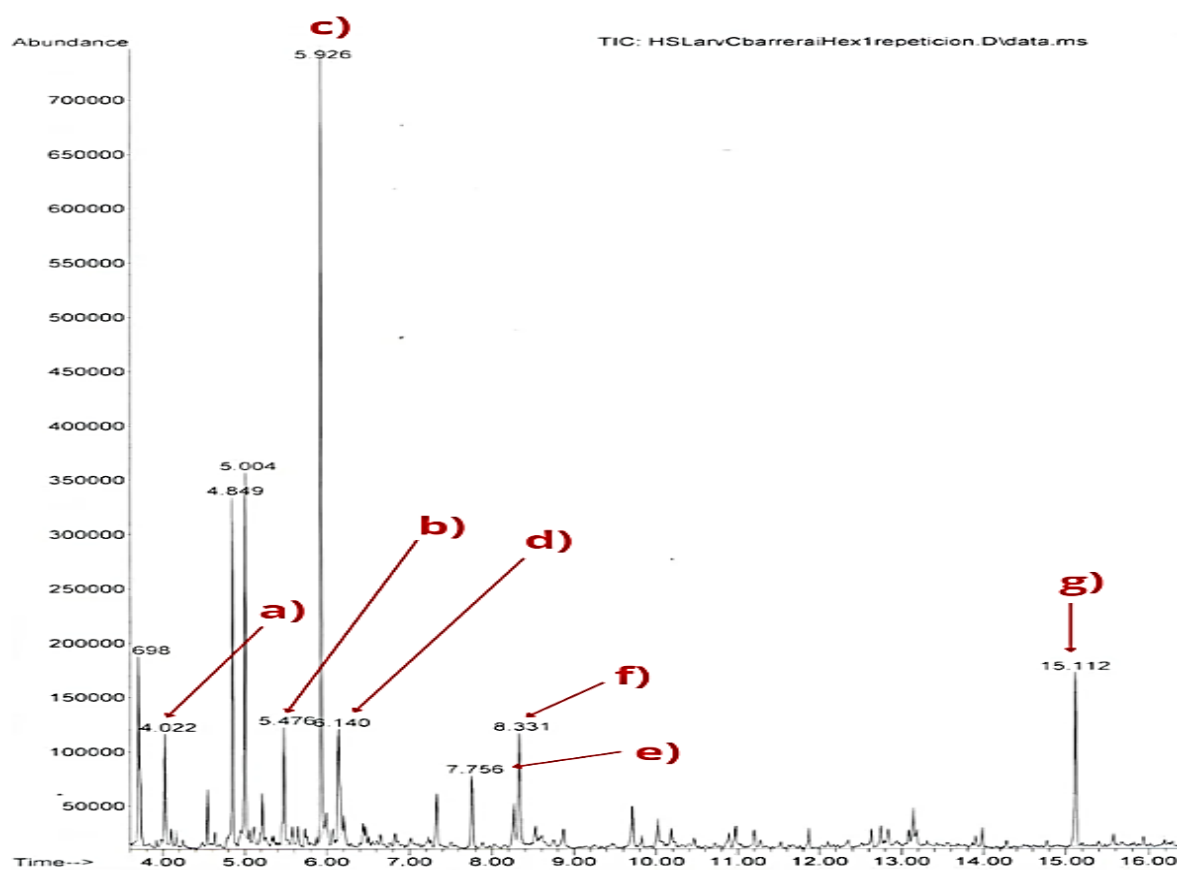


Figura 17. Cromatograma de compuestos volátiles identificados en las eluciones de hexano en las muestras 1,2,3,4,5 y 8 en CG-EM extraídos por Headspace de larvas L3 de *Cyclocephala barrerae*: a) P-Xileno, b) Benceno, 1,3-dicloro-, c) Heptano, 2,2,4,6,6-pentametil-, d) D-limoneno, e) Nonanal, f) Acetato de 3,5,5-trimetilhexano y g) Nonadecano.

Cuadro 4. Propuesta de compuestos identificados en las eluciones de hexano en las muestras 1,2,3,4,5 y 8 en CG-EM extraídos por Headspace de larvas L3 de *Cyclocephala barrerae*

Tiempo de Retención	Porcentaje de similitud	Compuesto	No. CAS	Formula Química	Peso Molecular g/mol
4.022	92.9%	P-Xileno	106-42-3	C ₈ H ₁₀	106.16
5.476	95.3%	Benceno, 1,3-dicloro-	541-73-1	C ₆ H ₄ Cl ₂	147.00
5.926	96%	Heptano, 2,2,4,6,6-pentametil-	13475-82-6	C ₁₂ H ₂₆	170.33
6.140	86%	D-limoneno	5989-27-5	C ₁₀ H ₁₆	136.23
7.328	90%	Nonanal	124-19-6	C ₉ H ₁₈ O	142.24
8.331	88%	Acetato de 3,5,5-trimetilhexilo	58430-94-7	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	186.29
15.112	94.5%	Nonadecano	629-92-5	C ₁₉ H ₄₀	268.53

7.3. Respuesta comportamental de adultos a L3 y excretas

No se observó atracción alguna de las larvas L3 a la presencia de algún adulto de *C. barrerae*. Mientras que en las 15 repeticiones con adultos hembra de *C. barrerae*, se registró nulo interés de parte de la hembra hacia la larva L3.

Por otra parte, 34 machos fueron rap y 29 no respondieron a las larvas L3. No se observó atracción alguna de adultos a las excretas.

De acuerdo con las grabaciones del experimento, la RAP ocurre casi de manera inmediata, durante el primer minuto desde que se introduce a la larva L3 y al adulto. De lo contrario, la respuesta será nula sin importar el tiempo de espera.

Por lo tanto, se puede deducir de acuerdo con los resultados, que los adultos machos presentan atracción solo a algunas larvas en etapa L3.

7.4. Microscopía

Al comparar los cortes histológicos de larva L3 y adulto de *C. barrerae* bajo el microscopio electrónico de barrido, se observó que la cutícula de las larvas L3 no presenta poros cuticulares ni estructuras que permitan la liberación de compuestos químicos cuticulares (Figura 18), en contraste con el del adulto donde se aprecia tejido celular, ultraestructuras

(sensilas chaéticas) (Eilers et al., 2012) y aperturas que pueden servir para secretar sustancias (Barbier et al., 1992) (Figura 19).

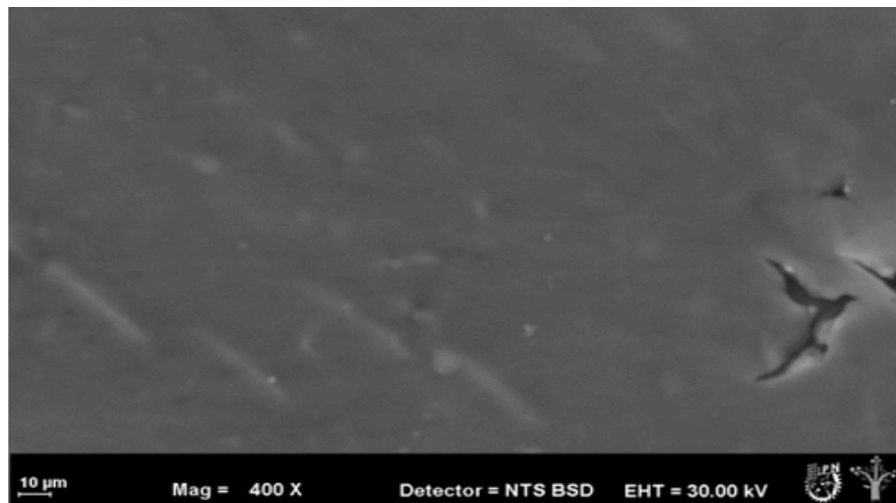


Figura 18. Micrografía electrónica de barrido de la superficie epicuticular de larva L3 de *Cyclocephala barrerai*. Se observa una textura tegumentaria lisa, sin presencia de estructuras celulares superficiales o aberturas glandulares visibles a esta resolución. Fotografía tomada por el autor.

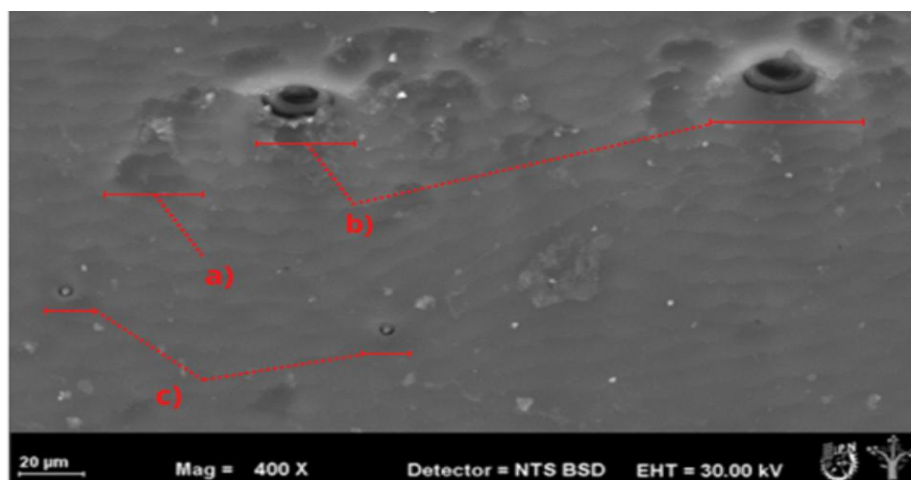


Figura 19. Micrografía electrónica de barrido de la superficie epicuticular de un adulto de *Cyclocephala barrerai*. Se observa: a) Tejido epidérmico subyacente, b) poros o aberturas glandulares y c) Sensilas chaéticas distribuidas sobre la superficie cuticular. Fotografía tomada por el autor.

8. Discusión de resultados

La importancia de estudiar la respuesta comportamental de adultos de *Cyclocephala barrerai* en presencia de las larvas L3 radica en conocer mejor el comportamiento de dicha

especie y comprender la interacción entre adultos y larvas. Los datos obtenidos en este trabajo revelan una clara tendencia de atracción sexual exclusiva de los machos de *C. barrera*i hacia las larvas L3, identificando patrones de cortejo de adultos hacia estadios larvales. A diferencia de la respuesta comportamental de hembras hacia larvas L3, su respuesta fue nula.

Esta conducta se presenta únicamente hacia ciertas larvas y no indiscriminadamente como reportan diversos autores para otros escarabajos melolóntidos. Por lo que, hipotéticamente, los machos pueden identificar a las hembras aún en estado larval y sin estar en etapa reproductiva, posiblemente por la presencia de enterobacterias en la cámara genital. Otro descubrimiento importante es que se observa la postura de la larva enrollada, lo que quiere decir que las larvas no muestran interés hacia los adultos. Además, este experimento permitió obtener evidencias de este comportamiento de acercamiento sexual (Haynes et al, 1995) de adultos hacia larvas, que suele ser frecuente en escarabajos melolóntidos, y que no había sido documentado con evidencia fotográfica hasta el momento.

El análisis morfológico mediante microscopía electrónica de barrido constituye el primer reporte ultraestructural detallado para la fase inmadura de *C. barrera*i y propone que las larvas L3 carecen de poros cuticulares, canales epidérmicos o cualquier otra estructura glandular exocrina superficial a lo largo de su tegumento. Este hallazgo contrasta con la alta complejidad y diversidad microestructural que caracteriza a la cutícula de ejemplares adultos de la misma especie. Esto descarta formalmente la epidermis cuticular como la vía anatómica de secreción o liberación de compuestos químicos en el estadio larval.

De acuerdo con Sanchez-Cruz et al. (2022), la respuesta conductual de adultos de *C. barrera*i en presencia de hembras de la misma especie ocurre gracias a la presencia de poros cuticulares que permiten la liberación de hidrocarburos, los cuales facilitan la comunicación química entre hembras y machos. Como menciona Chapman et al. (2013), estos canales, a menudo asociados con glándulas epidérmicas, son fundamentales para la secreción de compuestos químicos, como feromonas o sustancias defensivas, y juegan un rol determinante en la regulación de la pérdida de agua. En diversas especies de coleópteros y lepidópteros, se ha reportado que estos poros permiten la liberación de exudados que protegen a la larva contra patógenos fúngicos y depredadores, actuando como una barrera química activa que complementa la protección física de la quitina.

Además de las larvas de insectos, estructuras similares se han reportado ampliamente en otros artrópodos, incluyendo arácnidos y crustáceos terrestres (isópodos), donde la permeabilidad controlada es vital para la supervivencia en microhábitats con humedad variable. Se cree que su función primordial, más allá de la secreción, es el transporte de lípidos y ceras desde las células epidérmicas hacia la superficie de la epicutícula para mantener la impermeabilidad del insecto. Estudios en dípteros sugieren que estos poros también podrían estar involucrados en la quimiorrecepción periférica, permitiendo que las larvas detecten cambios químicos inmediatos en su sustrato alimenticio (Klowden, 2013; Vincent y Wegst, 2004).

Los compuestos identificados en el cromatógrafo de gases utilizando la técnica de inmersión, tanto en larvas L3 como en sus excretas, revelan la presencia de compuestos volátiles: 1-undecanol y 1-hexanol. Al comparar el perfil de compuestos volátiles encontrados en las larvas L3 con el de las hembras de la misma especie (Sanchez-Cruz, et al., 2020), no se encontraron coincidencias ya que las hembras presentan hidrocarburos cuticulares pesados, mismos que están ausentes en larvas L3. El perfil químico de las larvas L3 y sus excretas reveló la ausencia de hidrocarburos cuticulares pesados que coincidieran con el perfil químico de las hembras adultas (Sanchez-Cruz, et al., 2020). De acuerdo con los resultados de esta investigación, la retención de compuestos volátiles mediante el *Headspace* y las eluciones moleculares sugieren de manera consistente la presencia minoritaria pero biológicamente activa de compuestos volátiles de cadena corta y origen alifático, específicamente fenol, 1-hexanol y 1-undecanol.

A pesar de ello, la relevancia de estos compuestos volátiles de cadena corta y otros de origen alifático en la mediación de conductas biológicas ha sido ampliamente documentada en diversas etapas del desarrollo de los insectos. Por ejemplo, mediante el uso de microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía de gases y espectrometría de masas (SPME-GC/MS), se ha identificado que compuestos aldehídos como el nonanal forman parte del perfil natural de volátiles emitidos por larvas de coleópteros (Wojciechowska y Gołębiowski, 2020), lo que coincide con los compuestos reportados en las eluciones de hexano en las muestras extraídas por *Headspace* de larvas L3 de *C. barrerae*.

Se ha demostrado que el nonanal actúa como un componente clave en los sistemas de comunicación química de los artrópodos, ya sea incrementando significativamente la eficacia de atracción hacia las feromonas sexuales (Saveer et al., 2023) o modulando respuestas de comportamiento mediante la activación de neuronas receptoras periféricas (Wang et al., 2020). Al igual que lo reportado para el nonanal en dichos modelos, la volatilidad del 1-hexanol y el 1-undecanol les otorga las propiedades fisicoquímicas necesarias para viajar en el aire, dispersarse eficientemente en el sustrato y activar la respuesta olfativa selectiva de los machos de *C. barrerae* (Sanchez-Cruz et al., 2020).

Al no haber presencia de poros cuticulares en el cuerpo, se propone que los compuestos volátiles provienen principalmente de la microbiota intestinal y son excretados por el ano. La detección de alcoholes, particularmente el fenol encontrado en eluciones de metanol extraídas por *Headspace* de larvas L3 de *C. barrerae* y el 1-undecanol, aporta un fuerte sustento teórico a la existencia de rutas metabólicas compartidas entre las larvas y los adultos a través de microorganismos simbiotes. El 1-undecanol también se encontró en la cámara genital de las hembras de escarabajos melolontidos (Sánchez-Cruz et al., 2020), quien atribuye la presencia de estos compuestos volátiles a la actividad de enterobacterias específicas.

La correspondencia entre los volátiles identificados en las larvas L3 y sus excretas con los perfiles de los adultos sugiere que desde el estado larval existe una colonización activa de bacterias simbiotes como *Morganella morganii*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, tal como ocurre en las hembras de *Cyclocephala lunulata* y *C. barrerae* reportadas en el estudio

de Sanchez-Cruz et al. (2020). Estos microorganismos no solo participan en los procesos digestivos y de degradación del sustrato alimenticio, sino que actúan como fuentes secundarias de compuestos metabólicos que son liberados al exterior (Sanchez-Cruz, et al., 2020)

El origen bacteriano del fenol encuentra un respaldo bioquímico directo en los sistemas de comunicación química de otros escarabajos melolóntidos. Se ha demostrado que *Morganella morganii* es capaz de biosintetizar fenol (el cual actúa como feromona sexual en el escarabajo *Costelytra zealandica*) a partir del metabolismo de la tirosina en las glándulas internas del insecto (Marshall, 2016). La presencia de esta misma vía metabólica en las larvas L3 de *C. barrerae* sugiere que *M. morganii* podría estar utilizando la tirosina disponible en el tracto digestivo o en la cámara genital en desarrollo como precursor para la síntesis de fenol. De este modo, la liberación de este compuesto volátil al exterior no dependería de una maquinaria glandular propia de la larva, sino de la actividad enzimática secundaria de su microbiota simbiote, explicando la fuerte atracción etológica que se desencadena de manera selectiva en los machos adultos.

El posible papel de bacterias como *Klebsiella oxytoca* como agente responsable de los alcoholes identificados en las larvas L3 encuentra un respaldo bioquímico en sus capacidades enzimáticas nativas. Se ha documentado que esta enterobacteria posee deshidrogenasas específicas capaces de mediar la reducción y preparación de compuestos hidroxilados y alcoholes de cadena corta (Xu et al., 2017) La presencia de esta vía metabólica en *K. oxytoca* sugiere que la bacteria posee la maquinaria enzimática necesaria para procesar los nutrientes en el tracto digestivo o la cámara genital de la larva, actuando como la fuente de biosíntesis del 1-hexanol y el 1-undecanol detectados en los cromatogramas. De este modo, la liberación de estos alcoholes volátiles al exterior no requiere de una ruta de síntesis epidérmica ni de la presencia de poros cuticulares en la larva de *C. barrerae*, sino que se consolida como un producto directo del metabolismo oxidorreductor de su microbiota simbiote, el cual se libera por el ano.

El potencial de bacterias como *Citrobacter freundii* como emisor de señales quimioatrativas se alinea con lo observado en otros modelos de interacciones insecto-microbioma dentro del contexto de la ecología química. Robacker y Bartelt (1997) demostraron, mediante el uso de microextracción en fase sólida (SPME), que cultivos de *C. freundii* liberan de forma natural mezclas de compuestos volátiles que ejercen una fuerte atracción sobre adultos de la mosca de la fruta mexicana. La existencia de este fenómeno respalda la hipótesis de que, en las larvas L3 de *C. barrerae*, la presencia de bacterias como *C. freundii* en la microbiota intestinal o en la cámara genital contribuye activamente al perfil de volátiles del insecto. De esta manera, los compuestos sintetizados por esta enterobacteria cooperarían con los productos metabólicos de *K. oxytoca* y *M. morganii*, conformando un quimiotipo bacteriano complejo que es percibido a distancia por los machos adultos y que desencadena de forma selectiva su respuesta comportamental de cortejo.

La presencia y correspondencia de estos quimiotipos volátiles aporta un sólido sustento teórico a la hipótesis de una relación simbiótica temprana mediada por enterobacterias

específicas comunes en los escarabajos melolóntidos, tales como *Morganella morganii*, *Klebsiella oxytoca* y *Citrobacter freundii*. Este microbioma actúa como una fuente secundaria de precursores químicos y enzimas oxidorreductoras capaces de metabolizar nutrientes y aminoácidos como la tirosina, lo que genera una firma química diferencial que discrimina cualitativa o cuantitativamente a los individuos desde su etapa larval, permitiendo que los machos reconozcan selectivamente el sexo biológico del ejemplar inmaduro antes del desarrollo anatómico de gónadas funcionales.

Derivado de esta investigación, surgen nuevas teorías, como que las larvas pueden estar genéticamente predispuestas a ser hembras o machos, aunque en estado larval aún no desarrollen gónadas. La selectividad en la atracción demostrada por los machos hacia la larva L3 apoya la hipótesis de una señalización diferencial mediada por este microbioma alojado en la cámara genital en desarrollo, abriendo nuevas ramas para comprender la ontogenia de la ecología química en la familia Melolonthidae.

9. Conclusiones

Se demostró la respuesta comportamental de atracción sexual selectiva y unidireccional por parte de los machos adultos de *Cyclocephala barrerae* hacia las larvas L3, pero no a sus excretas.

Se propone que los compuestos volátiles presentes en el perfil cromatográfico no poseen un origen biosintético mediado por glándulas epiteliales, sino que provienen de la actividad metabólica secundaria de la microbiota intestinal alojada en el proctodeo (Sanchez-Cruz, et al., 2020), por lo que se estima que su liberación al exterior es a través del ano. Los análisis cromatográficos confirmaron que las larvas L3 de *C. barrerae* emiten un perfil de volátiles único con compuestos como nonanal, fenol, 1-hexanol y 1-undecanol.

El estudio de microscopía demostró que la cutícula de las larvas L3 de *C. barrerae* no presenta estructuras especializadas para la liberación de volátiles. La ausencia de dichas estructuras para liberar compuestos volátiles apoya la teoría de que el ano es la estructura que libera estos compuestos a la atmósfera.

Finalmente, los resultados derivados de esta investigación rompen con los paradigmas tradicionales de la comunicación insecto-insecto al demostrar que la señalización química puede originarse de forma trans-estadio y estar influenciada por agentes exógenos microbianos. Este trabajo abre nuevas vertientes de estudio dentro de la ecología química y agrícola de la familia Melolonthidae, enfocadas en comprender la ontogenia de las señales químicas, los mecanismos de predisposición genética de la microbiota y la colonización bacteriana como un factor determinante en el comportamiento reproductivo y la evolución de la especie.

10. Referencias bibliográficas

- Alberts, B., Heald, R., Johnson, A., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., Wilson, J. y Hunt, T. (2002). *Molecular biology of the cell* (4.^a ed.). W. W. Norton & Company. <https://jasulib.org.kg/wp-content/uploads/2026/02/Molecular-Biology-of-the-Cell-7e-By-Bruce-Alberts.pdf>
- Aragón, A., Morón, M.-A., Tapia-Rojas, A. M. y Rojas-García, R. (2001). Fauna de Coleoptera Melolonthidae en el rancho "La Joya", Atlixco, Puebla, México. *Acta Zoológica Mexicana*, (83), 143-164. <https://www.scielo.org.mx/pdf/azm/n83/n83a8.pdf>
- Audrain, B., Farag, M. A., Ryu, C. M. y Ghigo, J. M. (2015). Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. *FEMS Microbiology Reviews*, 39, 222-233. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu013>
- Badii, M. H. y Abreu, J. L. (2006). Control biológico una forma sustentable de control de plagas. *Daena: International Journal of Good Conscience*, 1(1), 82-89. [http://www.spentamexico.org/v1-n1/1\(1\)%2082-89.pdf](http://www.spentamexico.org/v1-n1/1(1)%2082-89.pdf)
- Barbier, R., Ferran, A., Le Lannic, J. y Allo, M.-R. (1992). Morphology and ultrastructure of integumentary glands of *Semiadalia undecimnotata* sch. (Coleoptera: Coccinellidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 21(3), 223-234. [https://doi.org/10.1016/0020-7322\(92\)90018-I](https://doi.org/10.1016/0020-7322(92)90018-I)
- Bárcenas Villalobos, A. G. (2018). *Taxonomía integrativa de especies de Paranomala y Cyclocephala (Coleoptera: Melolonthidae)* [Tesis de licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/15061>
- Becerril González, K. Y. (2020). *Composición lipídica en la cutícula de Aedes aegypti durante la infección con DENV2* [tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Morelos]. Repositorio Institucional UAEM. <https://riaa.uaem.mx/xmlui/bitstream/handle/20.500.12055/2916/BEGKNR00.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Burany, S. (2003). Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis. J. Goldstein, D. Newbury, D. Joy, C. Lyman, P. Echlin, E. Lifshin, L. Sawyer, and J. Michael. Kluwer Academic, Plenum Publishers, New York; 2003, 688 pages ISBN 0-306-47292-9. *Microscopy and Microanalysis*, 9(5), 484. <https://doi.org/10.1017/S1431927603030617>
- Cárdenas M., I. (1989). *Evaluación de teflutrina para el control de plagas rizófagas del maíz en la región de Vista Hermosa, Michoacán*. [tesis de licenciatura, Universidad de Guadalajara]. Repositorio de la Universidad de Guadalajara. http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/840/Cardenas_Morales_Ignacio.pdf?sequence=1
- Chapman, R. F. (2013). *The insects: Structure and function* (5.^a ed., S. J. Simpson y A. E. Douglas, eds.). Cambridge University Press.

https://assets.cambridge.org/97805211/13892/frontmatter/9780521113892_frontmatter.pdf

- CHEMOS. (2020, 14 de mayo). *Ficha de datos de seguridad conforme al Reglamento (CE) No. 1907/2006 (REACH): Terbufós (ISO) (Versión GHS 1.0)*. https://www.chemos.de/import/data/msds/ES_es/13071-79-9-A0044607-ES-es.pdf
- Cibrián Tovar, D. (2013). *Manual para la identificación y manejo de plagas en plantaciones forestales comerciales*. Universidad Autónoma Chapingo. https://www.conafor.gob.mx/biblioteca/Manuales-Tecnicos/Manual_para_la_identificacion_y_manejo_de_plagas_en_plantaciones_forestales.pdf
- Cuate-Mozo, V. A., Aragón-García, A., Lugo-García, G. A., Aragón-Sánchez, M., Pérez-Torres, B. C. y Juárez Ramón, D. (2019). Comparación morfológica de larvas de tercer estadio de *Phyllophaga* y *Listrochelus* (Coleoptera: Melolonthidae). *Entomología mexicana*, 6, 660-666. <https://acaentmex.org/entomologia/revista/2019/SM/SM%20660-666.pdf>
- De la Cruz Lozano, J. (2006). *Entomología: Morfología y fisiología de los insectos*. Universidad Nacional de Colombia. https://virtual.unju.edu.ar/pluginfile.php/387252/mod_resource/content/1/Artr%C3%B3podos%20generalidades%20Jaime.pdf
- Delgado-Núñez, E. J., Zamilpa, A., González-Cortazar, M., Olmedo-Juárez, A., Cardoso-Taketa, A., Sánchez-Mendoza, E., Tapia-Maruri, D., Salinas-Sánchez, D. O. y Mendoza-de Gives, P. (2020). Isorhamnetin: A nematocidal flavonoid from *Prosopis laevigata* leaves against *Haemonchus contortus* eggs and larvae. *Biomolecules*, 10(5), 773. <https://doi.org/10.3390/biom10050773>
- Díaz-Mederos, P., Nájera Rincón, M. B., Lezama Gutiérrez, R., Rebolledo Domínguez, O., Flores López, H. E. y Martínez Sifuentes, J. A. (2006). Especies de gallina ciega (Coleoptera: Melolonthidae) y su asociación con factores agroclimáticos y de manejo del maíz en los Altos de Jalisco, México. *Fitosanidad*, 10(3), 209-215. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209116108005>
- Douglas, A. E. (2009). The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology*, 23, 38-47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01442.x>
- Echlin, P. (2009). *Handbook of sample preparation for scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. Springer Science+Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-85731-2>
- Eilers, E. J., Talarico, G., Hansson, B. S., Hilker, M. y Reinecke, A. (2012). Sensing the underground – Ultrastructure and function of sensory organs in root-feeding *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeinae) larvae. *PLOS ONE*, 7(7), e41357. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041357>

- Eloisa, A. (2015). *Cyclocephala barrerai* Martínez, 1969 [Fotografía]. iNaturalist. <https://gbif.org/occurrence/1880661225>
- Engel, P. y Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 699-735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>
- García-Hernández, C., Rojo-Rubio, R., Olmedo-Juárez, A., Zamilpa, A., Mendoza de Gives, P., Antonio-Romo, I. A., Aguilar-Marcelino, L., Arece-García, J., Tapia-Maruri, D. y González-Cortazar, M. (2019). Galloyl derivatives from *Caesalpinia coriaria* exhibit in vitro ovicidal activity against cattle gastrointestinal parasitic nematodes. *Exp Parasitol.*, 200, 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.03.012>
- Guzmán-Vásquez, H. M., Sánchez-García, J. A. y Hernández-Cruz, J. (2017). El género *Cyclocephala* Dejean (Coleoptera: Melolonthidae: Dynastinae: Cyclocephalini) en México. *Entomología mexicana*, 4, 808-812. https://acaentmex.org/entomologia/revista/2017/SM/EM2292017_808-812.pdf
- Harborne, J. B. (2001). Twenty-five years of chemical ecology. *Natural Product Reports.*, 18(4), 361-379. <https://doi.org/10.1039/b005311m>
- Haynes, K. F. y Potter, D. A. (1995). Sexual response of a male scarab beetle to larvae suggests a novel evolutionary origin for a pheromone. *American Entomologist*, 41(3), 169-176. <https://doi.org/10.1093/ae/41.3.169>
- Haynes, K. F., Potter, D. A. y Collins, J. T. (1992). Attraction of male beetles to grubs: Evidence for evolution of a sex pheromone from larval odor. *Journal of Chemical Ecology*, 18(7), 1117-1124. <https://doi.org/10.1007/BF00980067>
- Hunt, D. W. A. y Borden, J. H. (1990). Conversion of verbenols to verbenone by yeasts isolated from *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae). *Journal of Chemical Ecology*, 16(5), 1385-1397. <https://doi.org/10.1007/BF01021034>
- Jiménez Martínez, E. (2009). Entomología. Universidad Nacional Agraria. <https://repositorio.una.edu.ni/id/eprint/2458>
- King, A. B. S. (1996). Biología, identificación y distribución de especies económicas de *Phyllophaga* en América Central. En P. J. Shannon y M. Carballo (Eds.), Biología y control de *Phyllophaga* spp.: Memoria (pp. 50-61). https://books.google.com.br/books?id=8cM4jkoaJtYC&lpg=PA50&ots=j_J6J7Smv5&lr&hl=es&pg=PA50#v=onepage&q&f=false
- Klowden, M. J. (2013). *Physiological systems in insects* (3.^a ed.). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-04120-0>
- Lawrence, J. F. y Newton, A. F., Jr. (1995). Families and subfamilies of Coleoptera (with selected genera, notes, references, and data on family-group names). En J. Pakaluk y S. A. Ślipiński (Eds.), *Biology, phylogeny, and classification of Coleoptera: Papers celebrating the 80th birthday of Roy A. Crowson* (pp. 779-1006). Muzeum

https://www.researchgate.net/publication/281999955_Families_and_subfamilies_of_Coleoptera_with_selected_genera_notes_references_and_data_on_family-group_names

- Márquez Manzano, J. P. (2023). *Complejo gallina ciega asociado a pastos de jardines privados de la ciudad de Puebla, México* [Tesis de licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/18694>
- Marshall, D. G., Jackson, T. A., Unelius, C. R., Wee, S. L., Young, S. D., Townsend, R. J. y Suckling, D. M. (2016). *Morganella morganii* bacteria produces phenol as the sex pheromone of the New Zealand grass grub from tyrosine in the colleterial gland. *The Science of Nature*, 103(7-8), 59. <https://doi.org/10.1007/s00114-016-1380-1>
- Martínez, I. y Lumaret, J.P. (2005). Structure of the terminal ampulla in male larvae of *Canthon cyanellus* LeConte (Coleoptera: Scarabaeidae: Scarabaeinae). *The Coleopterists Bulletin*, 59(1), 35–39. https://www.researchgate.net/publication/290575627_Structure_of_the_terminal_ampulla_in_male_larvae_of_Canthon_cyanellus_LeConte_Coleoptera_Scarabaeidae_Scarabaeinae
- Mattos, I., Miras Mermudes, J. R. y Reyes-Castillo, P. (2015). Larval structure of *Passalus graveleyi* and sexual dimorphism in Passalid larvae. *Revista de Biología Tropical*, 63(3), 695–704. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=44939781012>
- Morón, M. A., Lugo-García, G. A. y Aragón-García, A. (2014). Description of the third instar larvae of five species of *Cyclocephala* (Coleoptera, Melolonthidae, Dynastinae) from Mexico. *Revista Brasileira de Entomologia*, 58(3), 219–228. <https://doi.org/10.1590/S0085-56262014000300001>
- Morón, M. A., Rojas-Gómez, C. V. y Arce-Pérez, R. (2016). *La función de la gallina ciega en los pastizales*. Instituto de Ecología, A. C. <https://libros.inecol.mx/index.php/libros/catalog/view/507/618/3080>
- Morón, M., Ratcliffe, B. C. y Deloya, C. (1997). *Atlas de los escarabajos de México. Coleoptera: Lamellicornia. Familia Melolonthidae (Vol. 1)*. Sociedad Mexicana de Entomología.
- Nicholls Estrada, C. I. (2008). *Control biológico de insectos: Un enfoque agroecológico*. Editorial Universidad de Antioquia. <https://archive.foodfirst.org/wp-content/uploads/2016/01/Control-biologico-de-insectos-un-enfoque-agroecologico.pdf>
- Peralta-Falcón, R., Robledo-Quintos, N. R. y Barragán-Sol, C. J. (2019). Identification of the profile of cuticular hydrocarbons of *Anastrepha curvicauda* (Diptera: Tephritidae). En *Area-wide management of fruit fly pests* (6 págs.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429355738-2>

- Pérez-Agis, E., Morón, M. A., Nájera-Rincón, M. y Castro-Ramírez, A. (2014). Factores que influyen en la abundancia de larvas de Coleoptera: Melolonthidae con importancia agrícola en la región Purhépecha, Michoacán, México. *Acta Zoológica Mexicana*, 30(1), 161–173. <https://doi.org/10.21829/azm.2014.301136>
- Poveda Arias, J. (2019). Los microorganismos asociados a los insectos y su aplicación en la agricultura. *Revista Digital Universitaria (RDU)*, 20(1). <https://doi.org/10.22201/codeic.16076079e.2019.v20n1.a2>
- Robacker, D. C. y Bartelt, R. J. (1997). Chemicals attractive to Mexican fruit fly from *Klebsiella pneumoniae* and *Citrobacter freundii*. Cultures sampled by solid-phase microextraction. *Journal of Chemical Ecology*, 23, 2897–2915. <https://doi.org/10.1023/A:1022579414233>
- Romero-López, A. A. (2016). Comunicación química de coleópteros Melolonthidae distribuidos en México: A una década de distancia. *Dugesiana*, 23(1). <https://doi.org/10.32870/dugesiana.v23i1.5748>
- Romero-López, A. A., Morón, M. A., Aragón, A. y Villalobos, F. J. (2010). La “gallina ciega” (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae) vista como un “ingeniero del suelo”. *Southwestern Entomologist*, 35(3), 331–343. https://www.researchgate.net/profile/Miguel-Moron-2/publication/232688654_La_Gallina_Ciega_Coleoptera_Scarabaeoidea_Melolonthidae_Vista_Como_Un_Ingeniero_del_Suelo/links/00463538f8bb0201c4000000/La-Gallina-Ciega-Coleoptera-Scarabaeoidea-Melolonthidae-Vista-Como-Un-Ingeniero-del-Suelo.pdf
- Salazar-Escobar, J. A. y Villalobos-Moreno, A. (2021). Algunas notas sobre el integumento quitinoso e iridiscente en la clase Insecta (Arthropoda: Hexapoda). *Revista Chilena de Entomología*, 47(3). <https://doi.org/10.35249/rche.47.3.21.03>
- Sanchez-Cruz, A., Robledo, N., Rosete-Enríquez, M. y Romero-López, A. A. (2020). Attraction of adults of *Cyclocephala lunulata* and *Cyclocephala barrerae* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae) towards bacteria volatiles isolated from their genital chambers. *Molecules*, 25(19), 4430. <https://doi.org/10.3390/molecules25194430>
- Sanchez-Cruz, A., Tapia-Maruri, D. y Jiménez-Pérez, A. (2022). Reproductive apparatus, gonadic maturation, and allometry of *Cyclocephala barrerae* Martínez (Coleoptera: Melolonthidae: Dynastinae). *Insects*, 13(7), 638. <https://doi.org/10.3390/insects13070638>
- Sanchez-Cruz, A., Tapia-Maruri, D., Villa-Ayala, P., Robledo, N., Romero-López, A. A., Rojas, J. C. y Jiménez-Pérez, A. (2024). Antennal sensilla of *Cyclocephala barrerae* (Coleoptera: Melolonthidae): morphology, sexual dimorphism, allometric relationships, and function. *Environmental Entomology*, 53(6), 981–993. <https://doi.org/10.1093/ee/nvae087>

- Sanchez-Cruz, A., Villa-Ayala, P. y Jiménez-Pérez, A. (2025). Mass-rearing and life history of *Cyclocephala barrerae* (Coleoptera: Melolonthidae) and congeneric species. *Journal of Insect Science*, 25(3), 14. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieaf050>
- Sanchez-Cruz, A., Villa-Ayala, P. y Jiménez-Pérez, A. (2025). Mating behavior of *Cyclocephala barrerae* Martínez (Coleoptera: Melolonthidae). *Insects*, 16(6), 613. <https://doi.org/10.3390/insects16060613>
- Saveer, A. M., Hatano, E., Wada-Katsumata, A., Meagher, R. L. y Schal, C. (2023). Nonanal, a new fall armyworm sex pheromone component, significantly increases the efficacy of pheromone lures. *Pest Management Science*, 79(8), 2831–2839. <https://doi.org/10.1002/ps.7460>
- Sbarbati, A. y Osculati, F. (2006). Allelochemical communication in vertebrates: Kairomones, allomones and synomones. *Cells Tissues Organs*, 183(4), 206–219. <https://doi.org/10.1159/000096511>
- Schulz, S. y Dickschat, J. S. (2007). Bacterial volatiles: The smell of small organisms. *Natural Product Reports*, 24(4), 814–842. <https://doi.org/10.1039/b507392h>
- Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria. (2018). *Glosario de términos fitosanitarios* (NIMF 5). https://www.ippc.int/static/media/files/publication/es/2018/07/ISPM_05_2018_Es_2018-07-10_PostCPM13.pdf
- Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria. (2022). *Determinación de la condición de una plaga en un área* (NIMF 8). https://assets.ippc.int/static/media/files/publication/es/2022/02/ISPM_08_2021_Es_2022-02-04_PostCPM-15_LRGRev.pdf
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2020, 9 de noviembre). *Ecología química de insectos: interacciones mediadas químicamente y aplicaciones novedosas*. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. <https://prod.senasica.gob.mx/ALERTAS/inicio/pages/single.php?noticia=6243#>
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2023, julio). *Phyllophaga spp., Macrodactylus spp., Anomala spp. Complejo Gallina Ciega* (Ficha Técnica No. 08 /CGC/CNRF). Dirección General de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/847747/Ficha_tecnica_Complejo_gallina_ciega.pdf
- Tamaki, Y. (1985). Pheromones. En G. A. Kerkut y L. I. Gilbert (Eds.), *Comprehensive insect physiology, biochemistry, and pharmacology* (Vol. 9, pp. 145–191). Pergamon Press.
- Trotter, D. M., Kent, R. A. y Wong, M. P. (2009). Aquatic fate and effect of Carbofuran. *Critical Reviews in Environmental Control*, 21(2), 137–176. <https://doi.org/10.1080/10643389109388412>

- Underwood, D. L. A. (1994). Methods for sexing Lepidoptera larvae using external morphology. *Journal of the Lepidopterists' Society*, 48(3), 258–263. [https://images.peabody.yale.edu/lepsoc/jls/1990s/1994/1994-48\(3\)258-Underwood.pdf](https://images.peabody.yale.edu/lepsoc/jls/1990s/1994/1994-48(3)258-Underwood.pdf)
- Vendl, T., Kratochvil, L. y Šípek, P. (2016). Ontogeny of sexual size dimorphism in the hornless rose chafer *Pachnoda marginata* (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae). *Zoology*, 119(6), 481–488. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2016.07.002>
- Villalobos-M., A., Agudelo M., J. C. y Arrieta P., D. M. (2010). Histología de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera) como aporte entomológico parte I: Regiones corporales, organización anatómica e integumento. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 14(2). http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-30682010000200014&lng=en&tlng=es
- Vincent, J. F. V. y Wegst, U. G. K. (2004). Design and mechanical properties of insect cuticle. *Arthropod Structure & Development*, 33(3), 187–199. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2004.05.006>
- Wang, C., Li, G., Miao, C., Zhao, M., Wang, B. y Guo, X. (2020). Nonanal modulates oviposition preference in female *Helicoverpa assulta* (Lepidoptera: Noctuidae) via the activation of peripheral neurons. *Pest Management Science*, 76(9), 3159–3167. <https://doi.org/10.1002/ps.5870>
- Wojciechowska, M. y Gołębiowski, M. (2020). SPME-GC/MS analysis of volatile compounds contained in the insect larvae of *Tenebrio molitor* and *Leptinotarsa decemlineata* before and after using insecticides. *Chemistry & Biodiversity*, 17(4), e1900743. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900743>
- Xu, T., Wang, C., Zhu, S. y Zheng, G. (2017). Enzymatic preparation of optically pure t-butyl 6-chloro-(3R,5S)-dihydroxyhexanoate by a novel alcohol dehydrogenase discovered from *Klebsiella oxytoca*. *Process Biochemistry*, 57, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.03.019>
- Zermoglio, P. F. (2018). *Fisiología y ecología del comportamiento del sistema hospedador-parasitoide: Cyclocephala signaticollis (Coleoptera: Scarabaeidae) - Mallophora ruficauda (Diptera: Asilidae)* [Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires]. Sistema Nacional de Repositorios Digitales. https://repositoriosdigitales.sicyt.gob.ar/vufind/Record/BDUBAFCEN_4234fefad89181a0721cf86d3575853f