

APARATO REPRODUCTOR DE HEMBRAS DE *Phyllophaga ravid*a Blanchard, 1850 (COLEOPTERA: MELOLONTHIDAE) ASOCIADO CON COLONIAS BACTERIANAS

Francisco Javier Pérez-Estrada ✉, María Rosete-Enríquez, Martha Raquel Trujillo-Vélez, Ángel Alonso Romero-López

Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Blvd. Valsequillo y Av. San Claudio Edificio 112-A, Ciudad Universitaria, Col. Jardines de San Manuel. C. P. 72570, Puebla, México.

✉ Autor de correspondencia: francisco.perezestrada@outlook.com

RESUMEN. *Phyllophaga ravid*a Blanchard, 1850 es una especie distribuida en México y considerada de importancia agrícola, por ello, se cuenta con información de su comunicación química sexual. Además, se ha considerado que estructuras del aparato reproductor de las hembras como la cámara genital y glándulas accesorias son los sitios productores de feromonas. Sin embargo, debido a la caracterización de bacterias asociadas a la cámara genital y glándulas accesorias de dos representantes de la subfamilia Melonithinae posiblemente participen en la producción de feromonas. Por lo tanto, en el presente trabajo se realizó un estudio integral que incluye una descripción detallada de la morfología del aparato reproductor de hembras de *P. ravid*a y una caracterización de sus bacterias asociadas. En primer término, se observó que el aparato reproductor de las hembras de esta especie muestra un arreglo anatómico similar al de otro Melolonthidae. De todas las estructuras anatómicas, únicamente en el interior de la cámara genital se encontraron dos tipos de bacterias con características específicas. La identificación usando el gen ARNr 16S confirmó que se trata de las bacterias *Proteus vulgaris* Hauser, 1885 y *Achromobacter* sp. Yabuuchi and Yano, 1981 siendo el primer reporte que asocia estos géneros a una especie de *Phyllophaga*.

Palabras clave: Feromonas, cámara genital, ARNr 16S, *Proteus* sp., *Achrobacter* sp.

Female reproductive system of *Phyllophaga ravid*a Blanchard, 1850 (Coleoptera: Melolonthidae) associated with bacterial colonies

ABSTRACT. *Phyllophaga ravid*a Blanchard, 1850 is a species distributed in Mexico and considered of agricultural importance, therefore, information on its sexual chemical communication is available. Furthermore, structures of the female reproductive system such as the genital chamber and accessory glands have been considered to be the sites of pheromone production. However, due to the characterization of bacteria associated with the genital chamber and accessory glands of two representatives of the Melonithinae subfamily, they possibly participate in the production of pheromones. Therefore, in the present paper integral study was carried out that includes a detailed description of the morphology of the reproductive system of female *P. ravid*a and a characterization of its associated bacteria. In the first place, it was observed that the reproductive apparatus of the females of this species shows an anatomical arrangement similar to that of another Melolonthidae. Of all the anatomical structures, only two types of bacteria with specific characteristics were found inside the genital chamber. Identification using the 16S rRNA gene confirmed that it is the bacteria *Proteus vulgaris* Hauser, 1885 and *Achromobacter* sp. Yabuuchi and Yano, 1981 being the first report associating these genera with a species of *Phyllophaga*.

Keywords: Pheromones, genital chamber, 16s rRNA, *Proteus* sp., *Achrobacter* sp.

INTRODUCCIÓN

Se sabe que en la comunicación química sexual de los coleópteros Melolonthidae (Cherman y Morón, 2014), las hembras producen feromonas sexuales en epitelios glandulares de la cámara genital y en las glándulas accesorias (Kim y Leal, 1999; Romero-López, 2016). Particularmente se cuenta con reportes para *Phyllophaga anxia*, 1850 (Berberet y Helms, 1972), *Phyllophaga opaca* Moser, 1918 (Romero-López *et al*, 2010) y *Phyllophaga obsoleta* Blanchard, 1850, especies para las cuales se describe anatómicamente el aparato reproductor de las hembras (Romero-López *et*

al., 2011). Adicionalmente, en otros Melolonthidae se ha reportado que las glándulas accesorias del aparato reproductor poseen microorganismos productores de atrayentes sexuales, como es el caso de *Costelytra zealandica* White, 1846: en esta cuestión se determinó que se trataba de bacterias productoras de fenol, considerado como el compuesto principal de la feromona sexual de esta especie (Hoyt *et al.*, 1971; Marshall *et al.*, 2016). Asimismo, para *P. obsoleta* se ha reportado la presencia de enterobacterias en la cámara genital, proponiéndose que estas participan en la producción de feromonas (Rosete-Enríquez y Romero-López, 2017). Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo es describir el aparato reproductor de hembras de *P. ravidia* en los sitios sugeridos como productores de feromonas sexuales, así como, el aislamiento y la caracterización de las bacterias asociadas con estas estructuras.

MATERIALES Y MÉTODO

Descripción anatómica del aparato reproductor de hembras

Se recolectaron manualmente quince hembras adultas de *P. ravidia* en los jardines iluminados con luz blanca de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) (coordenadas 19°00'13.2" N y 98°12'11.6" O). Los especímenes obtenidos se sexaron e identificaron taxonómicamente con base en las claves dicotómicas de Morón (1986). Se seleccionaron las hembras que presentaban una apariencia corporal externa sin deformaciones ni lesiones y sin la presencia de huevos en su región abdominal. La disección, fijado y tinción del aparato reproductor de cada hembra se llevaron a cabo conforme a lo estipulado por Martínez-Morales (2002). Las muestras se observaron a través de un microscopio de luz clara (SZX7, Olympus, U.S.A).

Aislamiento e identificación de bacterias

Se seleccionaron quince hembras con una apariencia corporal externa “sana” y se lavaron con agua destilada y una solución de etanol al 70 %. La separación, lavado y disección del aparato reproductor, cámara genital y glándulas accesorias de cada hembra, así como la toma de muestras de hemolinfa y tubo digestivo y el aislamiento de las colonias bacterianas, se efectuaron con base en la metodología propuesta por Rosete-Enríquez y Romero-López (2017). El ADN genómico de las bacterias aisladas se analizó de acuerdo con las instrucciones del sistema comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, EUA). Las bacterias aisladas fueron sembradas en 5 ml de medio líquido LB e incubadas a 37°C con agitación constante durante 24 hrs. La concentración de DNA se determinó por la lectura de absorbancia 260 nm en un nanodrop UV ND-1000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA). Para la identificación molecular de las bacterias, también se tomó como base lo establecido por Rosete-Enríquez y Romero-López (2017), comparando la secuencia obtenida con las secuencias homologas ortólogas del gen ARNr 16S registradas en la base de datos NCBI mediante la herramienta BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción anatómica del aparato reproductor

En la Figura 1 se muestra con detalle la anatomía del aparato reproductor de las hembras de *P. ravidia*, el cual está conformado por dos ovarios, dos oviductos laterales, un oviducto común, la glándula espermática, la bursa copulatrix, la espermoteca, tres pares de placas genitales, dos pares de glándulas accesorias y una cámara genital. Todas las estructuras descritas presentan similitud estructural, en organización y distribución espacial a lo citado para otros integrantes del género

como *P. opaca* (Romero-López *et al.*, 2010) y *P. obsoleta* (Romero-López *et al.*, 2011), así como *P. latipes* Bates, 1888, *P. Blanchard*, 1851, *P. rugipennis* Schauffus, 1858, *P. setifera* Burmeister, 1855, *P. subrugosa* Moser, 1924, *P. tenuipilis* Bates, 1888 y *P. testaceipennis* Blanchard, 1850 (Martínez-Morales y Morón, 2015). En la región apical del aparato reproductor se localizan los dos ovarios formados por seis ovariolas cada uno y en cada ovariola, de cinco a seis oocitos en diferentes niveles de desarrollo. En la región centro-lateral se localizan dos conductos; uno de los conductos es largo con una región quitinizada y una ligera depresión que se dirige hacia la bursa copulatrix, semi-esférica y rugosa con una zona esclerosada en su zona basal.

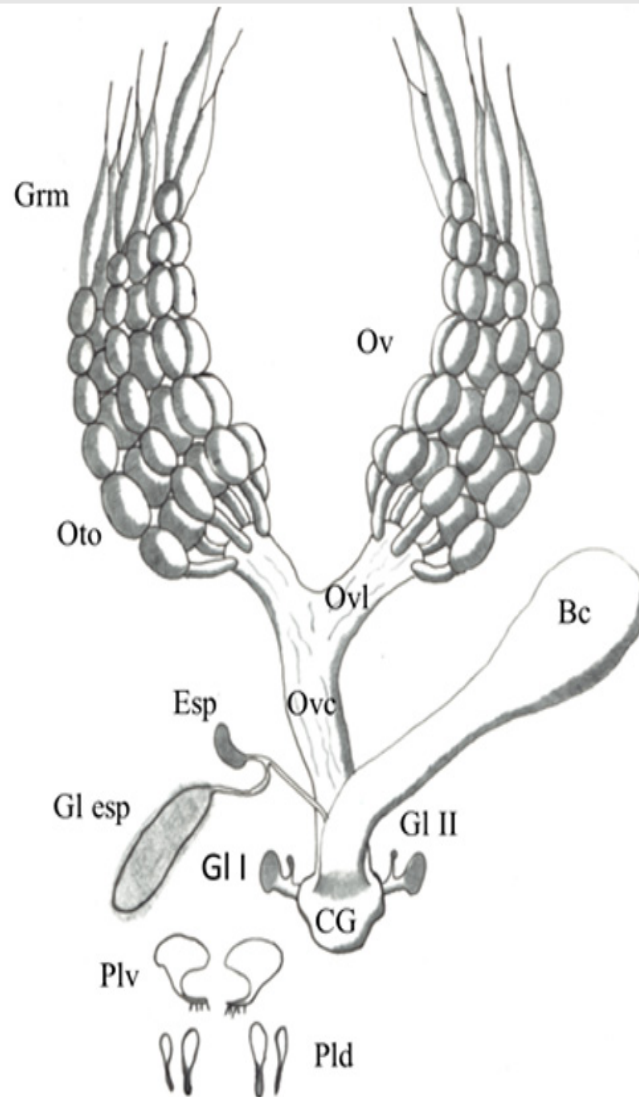


Figura 1. Estructura general de los componentes del aparato reproductor de las hembras de *Phyllophaga ravidata*. **Bc**= bursa copulatrix; **Cg**= cámara genital; **Esp**= espermateca; **Gl I**= glándula accesoria tipo I; **Gl II**= glándula accesoria tipo II; **Gl esp**= glándula de la espermateca; **Grm**= germario; **Oto**= oocito; **Ov**= ovario; **Ovc**= oviducto común; **Ovl**= oviducto lateral; **Pld**= placa genital dorsal; **Plv**= placa genital ventral.

La región esclerosada no se había reportado para otras especies del género y se encuentra conectada a la espermateca junto con su glándula (Romero-López *et al.*, 2010; Romero-López *et al.*, 2011; Martínez-Morales. y Morón, 2015). El segundo conducto muy delgado y corto es una estructura tubular ligeramente encorvada de la parte media; se dirige hacia la glándula de la espermateca, la cual es de forma semi-tubular, voluminosa, de un tamaño mayor con respecto a la espermateca. Estas dos últimas estructuras se encuentran unidas con la parte basal de la bursa copulatrix. En la región caudal ventral del aparato reproductor se observan un par de placas de pigmentación parduzca con una quitina gruesa y en su región basal expone pequeñas fibras delgadas. En la base del oviducto común se localiza la cámara genital, la cual es de una forma semi-esférica y presenta una pared delgada conformada por cutícula. De cada extremo de la parte anterior de la cámara genital, se encuentran unidas las glándulas accesorias tipo I, las cuales son periformes de una coloración negra, que por la parte dorsal están conectadas a la cámara genital con un tejido tubular ancho y en la región anterior se encuentran conectadas a las glándulas accesorias tipo II mediante un tejido tubular delgado. Estas últimas son de forma tubular, de una coloración café y con un tamaño menor en comparación a las glándulas accesorias tipo I. Las glándulas accesorias son similares en tamaño, forma, posición y coloración con respecto a las pertenecientes en otras especies del género (Martínez- M. y Morón, 2015). La cámara genital y las glándulas accesorias son consideradas los sitios de producción de feromonas sexuales en otras especies por poseer epitelios conformados por células Clase I y Clase II relacionadas con esta función (Coca-Abia *et al.*, 1993; Tada y Leal, 1997; Kim y Leal, 1999; Romero-López *et al.*, 2011).

Identificación molecular de bacterias asociadas al aparato reproductor

En la cámara genital se detectó el crecimiento de dos colonias bacterianas, las cuales en principio se denominaron inicialmente “PRA” y “PRB”, para fines prácticos. En las glándulas accesorias y la hemolinfa no se presentó crecimiento de microorganismos, mientras que en zonas del intestino se observó una gran variedad de colonias bacterianas, aunque diferentes a las de la cámara genital, por lo que se sugiere que son específicas de esta última.

Hoyt *et al.*, (1971) obtuvieron bacterias solamente en las glándulas accesorias de hembras de *C. zealandica*, aunque Rosete-Enríquez y Romero-López (2017) encontraron colonias bacterianas exclusivamente en la cámara genital de *P. obsoleta*. Con la amplificación del gen ARNr 16S (cebadores 8F-907R y 533F-1496R) de las bacterias designadas como PRA, se obtuvo una secuencia ensamblada de aproximadamente 1440 pb y para las bacterias nombradas como PRB se ensambló un fragmento de 1050 pb. En el análisis de BLASNT de las secuencias obtenidas para PRA se identificó a *Proteus vulgaris* Hauser, 1885 mediante una cobertura del 100 % y una identidad del 93 %, mientras que para PRB se obtuvo una cobertura de 100 % y una identidad del 99 % con *Achromobacter* sp. La especie bacteriana *P. vulgaris* se conforma de bacilos Gram negativos, anaeróbicos facultativos, heterótrofos, proteolíticos e indol positivos (Larsson, 1984; Drzawiecka, 2016) que se han aislado de las fosas nasales de cerdos, del intestino de ratones y en el tracto urinario de humanos (Drzawiecka, 2016). En insectos solamente se han localizado en larvas muertas de *Dolerus nigratus* O.F. Müller, 1776 y en larvas de *Phlebotomus papatasi* Scopoli, 1786 (Lysenko, 1959; Maleki-Ravasan *et al.*, 2014). *P. vulgaris* puede tener una estrecha interacción con *P. ravidia* mediante la producción de feromonas sexuales de estos insectos, al promover la síntesis de volátiles como el amoníaco, el indol y compuestos con aminos derivados de su metabolismo (Drzewiecka, 2016). Estos componentes están relacionados con la atracción de algunos insectos como el caso de *Proteus mirabilis* Hauser, 1885, especie bacteriana capaz de producir amoníaco y putrecina que

provocan respuestas positivas en adultos de *Lucilia sericata* Meigen, 1826 (Morgenstein *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2012). Para las bacterias de *Achromobacter* sp., se sabe que se trata de bacilos aeróbicos Gram negativos; generalmente sus hospederos son animales como conejos y hurones, encontrándoseles en el intestino o piel de los animales, en lugares (agua o suelo) y en algunos casos están relacionadas con infecciones secundarias en los seres humanos (Palacios-Gómez *et al.*, 2014). Estos organismos se han localizado en nematodos que después infectan la hemolinfa de lepidópteros como algunas polillas (Poinar y Thomas, 1967), pero no se ha reportado en asociación con otros organismos, ni mucho menos que estén involucrados en un proceso vital de un insecto.

Para el caso de *P. ravidia*, los microorganismos alojados en la cámara genital tienen la propiedad de producir volátiles derivados de metanol, propanol y metilpropano (<http://bioinformatics.charite.de/>), de manera que podrían estar relacionados con la síntesis de la feromona sexual de esta especie (Romero-López *et al.*, 2019). Esto contrasta con lo identificado para las bacterias de la cámara genital de *P. obsoleta*, las cuales poseen la capacidad de producir acetonas, indol y etanoles (Rosete-Enríquez y Romero-López, 2017), compuestos relacionados con feromonas sexuales de otros insectos (El-Sayed, 2016).

Es el primer reporte en dar a conocer la asociación de *Achromobacter* con un coleóptero y al igual que *P. vulgaris*, esta bacteria puede estar involucrada en la producción de feromonas sexuales con compuestos volátiles derivados de su metabolismo, al igual que otras bacterias localizadas en el interior de distintos insectos (Davis *et al.*, 2013). Para confirmar el papel de las colonias bacterianas asociadas con la cámara genital de *P. ravidia* es necesario efectuar bioensayos de confirmación de actividad biológica, como los establecidos por Sánchez-Cruz (2019) en hembras de *Cyclocephala lunulata* Burmeister, 1847, primera especie de Melolonthidae para la cual se ha evidenciado la respuesta de machos hacia volátiles bacterianos parecidos a los componentes feromonales. A partir de esta referencia, se complementarán los resultados alcanzados en el presente trabajo con *P. ravidia*. De esta forma se contribuirá al conocimiento de la comunicación química sexual de esta especie, siendo las primeras en relación con otras *Phyllophaga* distribuidas en México y como base para la implementación de estrategias de manejo o conservación del grupo.

CONCLUSIONES

La anatomía del aparato reproductor de las hembras de *P. ravidia* comparte características similares con otros individuos del género *Phyllophaga* en términos de organización, distribución y número de sus componentes. Se aisló e identificó por ARNr 16S una colonia de *P. vulgaris* y otra de *Achromobacter* sp., las cuales probablemente estén involucradas en la producción de atrayentes sexuales de esta especie.

AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por medio del proyecto VIEP “RO-LA-NAT15-1 y a la Dirección General de Planeación Institucional (DGPI) a través del Grupo de Investigación “Ecología, Manejo y Conservación de Recursos Naturales” por el apoyo para la realización de este trabajo.

LITERATURA CITADA

Berberet, R. C. and Helms, T. J. 1972. Comparative anatomy and histology of selected systems in larval and adult *Phyllophaga anxia* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 65 (5): 1026-1053. <https://doi.org/10.1093/aesa/65.5.1026>

- Cherman, M. A., y Morón, M. Á. 2014. Validación de la familia Melolonthidae Leach, 1819 (Coleoptera: Scarabaeoidea). *Acta Zoológica Mexicana*, 30(1): 201-220. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/575/57530109015.pdf>
- Coca-Abia, M., Martín-Piera, F. y Morón, M. A. 1993. Anatomía y morfología de la genitalia femenina de las especies del género *Phyllophaga* (sensu lato) (Coleoptera: Melolonthidae). Relaciones filogenéticas con otros géneros del área mediterránea. *Giornale Italiano di Entomologia*. 6: 263-274.
- Davis, T. S., Crippen, T. L., Hofstetter, R. W. and Tomberlin, J. K. 2013. Microbial volatile emissions as insect semiochemicals. *Journal of Chemical Ecology*, 39(6): 687-806. Recuperado de <https://nau.pure.elsevier.com/en/publications/microbial-volatile-emissions-as-insect-semiochemicals>
- Drzewiecka, D. 2016. Significance and Roles of *Proteus* spp. Bacteria in Natural Environments. *Microbial Ecology*, 72(4): 741-758. DOI: 10.1007/s00248-015-0720-6
- El-Sayed, A. M. 2016. The pherobase: data of pheromones and semiochemicals. <http://pherobase.com>.
- Hoyt, C. P., Osborne, G. O. and Mulcock, A. P. 1971. Production of an insect sex attractant by symbiotic bacteria. *Nature*, 230: 472-473. <https://doi.org/10.1038/230472a0>
- Kim, J. Y. and Leal, W. S. 1999. Eversible pheromone gland in a Melolonthinae beetle, *Holotrichia parallela*. *Journal of Chemical Ecology*, 25(4): 825-833.
- Larsson, P. 1984. Serology of *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris*. *Methods in Microbiology*. Goteborg, Sweden, 187-214.
- Lysenko, O. 1959. Report on diagnosis of Bacteria isolated from insects (1954–1958). *Entomophaga*, 4: 15-22. <https://doi.org/10.1007/BF02376098>
- Ma, Q., Fonseca A., Liu, W., Fields, A. T., Pimsler, M. L., Spindola, A. F., Tarone, A. M., Crippen, T. L., Tomberlin, J. K. and Wood, T. K. 2012. *Proteus mirabilis* interkingdom swarming signals attract blow flies. *ISME Journal*, 6: 1356–1366. doi: 10.1038/ismej.2011.210
- Maleki-Ravasan, N. Oshaghi, M. A., Hajikhani, S., Saeidi, S., Akhavan, A. A., Gerami-Shoar, M., Shirazi, M. H., Yakhchali, B., Rassi, Y. y Afshar, D. 2014. Aeróbica microbiana de la población de insectos de *Phlebotomus papatasi*. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 8(1): 69-81.
- Marshall, D. G., Jackson, T. A., Unelius, C. R., Wee, S. L., Young, S. D., Townsend, R. J. and 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 (59): 1-6. DOI: 10.1007/s00114-016-1380-1
- Martínez-Morales, I. 2002. Técnicas básicas de anatomía microscópica y morfometría para estudiar los insectos. *Sociedad Entomológica Aragonesa*, 30: 187-195. Recuperado de http://sea-entomologia.org/PDF/BOLETIN_30/B30-034-187.pdf
- Martínez-Morales, I. y Morón, M. A. 2015. Los sistemas reproductivos en hembras de Melolonthinae, Rutelinae y Dynastinae (Coleoptera: Scarabaeoidea, Melolonthidae). *Southwestern Entomologist*, 40(2): 369-385. DOI: 10.3958/059.040.0211
- Morgenstein, R. M., Szostek, B. and Rather, O. N. 2010. Regulation of gene expression during swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *FEMS Microbiol Rev*, 34: 753-763. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2010.00229.x
- Morón, M. A. 1986. El género *Phyllophaga* en México (Insecta: Coleoptera). Morfología, distribución y sistemática supra específica. INECOL, México.
- Palacios-Gómez, M. E., Martín-Gómez, A. y García-Marcos, S. 2014. *Achromobacter xylosoxidans* en dos pacientes en hemodiálisis. *Nefrología (Madrid)*, 34(4): 13-14. Recuperado de <https://>

revistanefrologia.com/es-achromobacter-xylosoxidans-dos-pacientes-hemodialisis-articulo-X021169951405421X

- Poinar, G. O. and Thomas, G. M. 1967. The nature of *Achromobacter nematophilus* as an insect pathogen. *Journal of Invertebrate Pathology*, 9(4): 510-514. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(67\)90131-0](https://doi.org/10.1016/0022-2011(67)90131-0)
- Romero-López, A. A., Arzuffi, R., Valdez, J., Sánchez-Espíndola, E. and Morón, M. A. 2011. Tissues involved in sex pheromone production in *Phyllophaga obsoleta* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 104(5): 960-965. DOI: 10.1603/AN10068
- Romero-López, A. A., Martínez, I. and Morón, M. A. 2010. Morphology of the genital chamber and accessory glands of *Phyllophaga opaca* Moser (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthinae) females. *World Journal of Zoology*, 5: 210-216.
- Romero-López, A. A., Reyes-Chilpa, R., Pérez-Flores, F. J., Lugo-García, G. A. and Maldonado-Rodríguez, J. I. 2019. Chemicals in the Genital Chamber of Two Mexican Species of *Phyllophaga*. *Southwestern Entomologist*, 44(2): 457- 464. <https://doi.org/10.3958/059.044.0211>
- Rosete-Enríquez, M. and Romero-López, A. A. 2017 *Klebsiella* bacteria isolated from the genital chamber of *Phyllophaga obsoleta*. *Southwestern Entomologist*, 42(4): 1003-1014. <https://doi.org/10.3958/059.042.0419>
- Sánchez-Cruz, A. 2019. *Participación de las bacterias de la cámara genital de cyclocephala lunulata (Coleoptera: Melolonthidae) en su comunicación química*. Tesis (Maestría en Ciencias en Manejo Agroecológico de Plagas y Enfermedades), Instituto Politécnico Nacional, 104 pp.
- Tada, S. and Leal, W. S. 1997. Localization and morphology of sex pheromone glands in scarab beetles. *Journal of Chemical Ecology*, 23: 903-915. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000006379.01010.da>