

IDENTIFICACIÓN DE ESTRUCTURAS RELACIONADAS CON EL SISTEMA OLFATIVO DE *Macrodactylus nigripes* (Bates) (COLEOPTERA: MELOLONTHIDAE)

Omar Kareem Martínez-Bonilla¹✉, Salvador Galicia-Isasmendi², Agustín Aragón-García¹ y Angel Alonso Romero-López²

¹Instituto de Ciencias, Maestría en Manejo Sostenible de Agroecosistemas, BUAP, 14 sur 6301 Col. San Manuel, C. P. 72570, Puebla, Puebla.

²Facultad de Ciencias Biológicas, BUAP, Blvd. Valsequillo y Av. San Claudio Edificio 112-A, Ciudad Universitaria, Col. Jardines de San Manuel C. P. 72570, Puebla, Puebla.

✉Autor de correspondencia: majestic12kosmos@gmail.com

RESUMEN. Se presenta el primer registro sobre la descripción anatómica del sistema olfativo de la larva (“gallina ciega”) de un coleóptero Melolonthidae distribuido en México. Se emplearon larvas de tercer estadio de *Macrodactylus nigripes* (Bates) colectadas en zonas agrícolas del estado de Puebla. Se identificaron las estructuras básicas del sistema nervioso central de *M. nigripes* como son el protocerebro, el ganglio cefálico, los lóbulos protocefálicos, el deutocerebro y los lóbulos ópticos. Así como doce segmentos ganglionares. El número de conexiones nerviosas es mayor hacia las estructuras mandibulares, por lo que su importancia podría hipotetizarse como mayor a las mandibulares. Así mismo, se encontraron conexiones que se dirigen a las antenas, por lo que a este nivel de desarrollo, los individuos están capacitados para captar los estímulos químicos que se encuentran en la rizósfera. El sistema de las larvas es simple y no se observan desarrollados el cuerpo de seta y otras estructuras observables en los adultos en el arreglo del sistema olfativo de *M. nigripes*. Existe la probabilidad que haya una transición natural hacia una complejidad morfológica en adultos, y un esquema de comunicación química similar en ambos estados.

Palabras clave: *Macrodactylus nigripes*, larvas, anatomía, estructuras olfativas, comunicación química.

Identification of structures related to the olfactory system of "white grubs" (Coleoptera: Melolonthidae) of a species distributed in Mexico

ABSTRACT. The first anatomical description on the anatomical description of the olfactory system of the larvae ("white grubs") of a coleopteran Melolonthidae distributed in Mexico is shown here. In this case, is employed larvae of third stage of *Macrodactylus nigripes* (Bates) collected in areas agricultural of the State of Puebla. In general, with dissections, the basic structures of the insect central nervous system were identified as the protocerebrum, the cephalic ganglion, the lobes are, protocephalic, the deutocerphalic region and the optic lobes. There were also twelve ganglion segments observed; first, the head circumference, extend three branches towards the jaw structures. The olfactory neural connections of the larvae are directly connected to the sensory epithelia of the antenna, which are located in the first antennal segments. The anatomical organization of the structures that make up the olfactory system of these larvae shows that at this stage of their life cycle, individuals are trained to capture the chemical stimuli that are found in the environment. It is suggested that there is consistency in the arrangement of the olfactory system of *M. nigripes* of white grubs and adults, with a natural transition to a morphological complexity in the latter, though a scheme of similar chemical communication in both cases.

Keywords: *Macrodactylus nigripes*, larvae, anatomy, olfactory structures, chemical communication.

INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios acerca del sistema olfativo en larvas de distintas especies de insectos apuntan a que éstas poseen la capacidad de registrar y discernir entre distintos compuestos emitidos al ambiente (Marín-Loaiza y Céspedes, 2007). Los insectos que viven en el suelo están provistos de órganos especializados en la recepción de estímulos visuales y químicos (olfativos), los cuales les sirven para la búsqueda de alimento (Méndez-Aguilar *et al.*, 2008; Branson, 1982).

Al momento, se tiene conocimiento generado por Méndez-Aguilar *et al* (2008) en larvas de tercer estadio de *Phyllophaga ravidia* (Blanchard) y *Phyllophaga tumulosa* (Bates), donde evaluaron las respuestas positivas hacia raíces de tomate verde, maíz y frijol, siendo el primer estudio en su tipo acerca de los volátiles de plantas involucrados en la rizósfera.

Referente al sistema nervioso de larvas de coleópteros, se tiene registrado que durante el desarrollo larvario de *Tenebrio molitor* (Linneo), varios segmentos de la cadena ganglionar que forma parte del sistema nervioso se fusionan en la fase de imago (Ullman, 1966).

Con respecto al estudio del sistema olfativo para este grupo de escarabajos, únicamente se tiene reportado que para adultos de *M. nigripes* la región central del protocerebro medio cuentan con estructuras conocidas como “cuerpos de seta” o “cuerpos fungiformes”, presentes en todos los insectos, cuya interacción se ve mediada por sustancias emitidas por congéneres o volátiles de plantas. En la porción lateral del cuerpo de seta se encuentran los lóbulos olfativos, los cuales se encargan de llevar la señal recibida en las antenas del insecto (Martínez-Bonilla *et al.*, 2014).

Con el presente trabajo se pretende generar información sobre el esquema de recepción de larvas *M. nigripes*, a partir del estudio del sistema nervioso y olfativo de larvas de esta especie, con el fin de identificar las estructuras involucradas en la recepción de estímulos químicos provenientes del medio externo y proponer criterios que promuevan nuevas investigaciones comparativas para el desarrollo completo de esta especie y en la búsqueda de criterios para establecer alternativas para el manejo de especies de este género a nivel larvario con base en el uso de atrayentes alimentarios.

MATERIALES Y MÉTODO

Zona de estudio y obtención de larvas. La recolecta de larvas de *M. nigripes* se llevó a cabo en una parcela de maíz ubicada en el municipio de Huejotzingo, Puebla (19° 9' 34.02" N, 98° 24' 26.42" W, 2267 msnm). Los especímenes se obtuvieron por medio de capturas manuales directas en los monolitos de suelo de 50 x 50 x 50 cm obtenidos al excavar en los alrededores de las plantas cultivadas.

El muestro fue dirigido, en las zonas que el productor había detectado daños en el cultivo. Las larvas recolectadas se colocaron en recipientes de plástico de 1 l, los cuales contenían en su interior sustrato de los mismos monolitos, para su traslado al Laboratorio de Entomología.

Las larvas colectadas se colocaron junto con la materia de la que se están alimentando, en cajas de Petri, en frascos (de 250 ml). Se identificaron a nivel de especie con base en los criterios establecidos por Aragón-García *et al.* (2010). Se procedió a colocarlas individualmente, ya que dos ó más larvas juntas podrían hacerse daño. Se les administró aserrín como alimento. Se revisaron una vez por semana, para renovarles el alimento y mantenerles una humedad similar a la existente cuando fueron recolectadas

Los individuos muertos se fijaron en solución Pampel para que las estructuras de valor taxonómico se puedan conservar. Posteriormente, las larvas se colocaron en alcohol al 70 % para preservarlas.

Disecciones. Se emplearon siete larvas de *M. nigripes* (n = 7), las cuales fueron seleccionadas por mostrar una apariencia externa sana. Con ayuda de un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ 660®), se efectuó una abertura con pinzas rectas de cirugía oftálmica en la parte dorsal del cuerpo de la larva, fijándola a la cámara de disección con alfileres; el tejido se fijó con dos alfileres y fue desprendido de manera longitudinal en la cámara de disección (Fig. 1).

Con las pinzas se llevó a cabo un corte vertical y transversal de la cutícula de la cápsula cefálica de cada una de las larvas, con el fin de apreciar las estructuras y órganos internos.

Inmediatamente, se colocan 3 ml de solución salina (Zorovic y Hedwig, 2011) en la cámara de disección, de manera que cubriera todo el tejido interno de la larva; esto para que la muestra no se

dañara y pudiera apreciarse bajo microscopio. Se removió el tejido adiposo que sobresalía debajo de la región dorsal, de tal forma que pudiera ser visible el tejido nervioso. Posteriormente, se extrajo gran parte del sistema olfativo y nervioso de cada individuo para conservarlos en alcohol al 70 % en tubos Eppendorf.

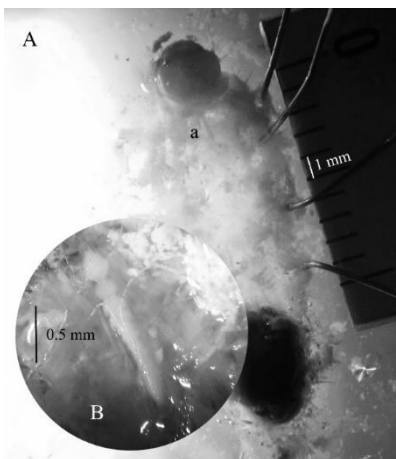


Figura 1. A. Sistema nervioso de *Macrodactylus nigripes*. El sistema nervioso (a) se encuentra en posición ventral respecto al sistema digestivo por lo que se aprecia en esta figura tras el retiro de este último. En el panel A, el sistema nervioso se encuentra parcialmente cubierto en su porción cefálica, mientras que en B se le ha expuesto en su totalidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con los primeros cortes de la cutícula de la región dorsal del cuerpo de las larvas, fue posible el observar el tubo digestivo y tejido adiposo abundante (Fig. 1). Después de retirarlos, se observó el sistema nervioso central de la larva, sin embargo, constatando que no existe una consistencia en la presencia de las estructuras observadas en adultos de *M. nigripes*. Se observaron doce segmentos ganglionares, sobresaliendo ramas nerviosas, donde la rama gruesa se dirige hacia la mandíbula y las delgadas a las antenas. Por debajo de las maxilas, parte del primer segmento ganglionar se encuentra en contacto directo con las antenas de la larva. Es evidente una elongación compuesta por tres segmentos ganglionares principales. El segmento terminal posee ramificaciones con direcciones diferentes. Las conexiones neuronales olfatorias de las larvas se conectan directamente hacia los epitelios sensoriales de la antena, los cuales se sitúan en los primeros segmentos antenales. El sistema nervioso está formado por una cadena de ganglios contiguos entre sí, cuya separación entre ellos es más notoria para los ganglios de mayor tamaño ubicados hacia la porción cefálica.

Es importante resaltar la dimensión reducida de la cadena ganglionar con respecto de la longitud corporal.

En los especímenes analizados se observó un número conservado de 12 (XII) ganglios que disminuyen en tamaño en la dirección antero-posterior. Del ganglio cefálico se extienden tres ramas pares que se dirigen a las mandíbulas, los palpos y las antenas, no se aprecia para este aumento la rama óptica que es muy pequeña. De los ganglios de tamaño intermedio (II a IV) surgen las ramas nerviosas que inervan las patas del animal. De los ganglios IV al XII se proyectan múltiples ramas nerviosas que se dirigen a los distintos segmentos corporales, los ganglios IV y V inervan los segmentos intermedios mientras que ganglios caudales se conectan con porciones

respectivamente más caudales (Fig. 2). Los ganglios XI y XII se encuentran semifusionados. Se observaron los túbulos del sistema hemolinfático que irrigan al sistema nervioso (Fig. 3).

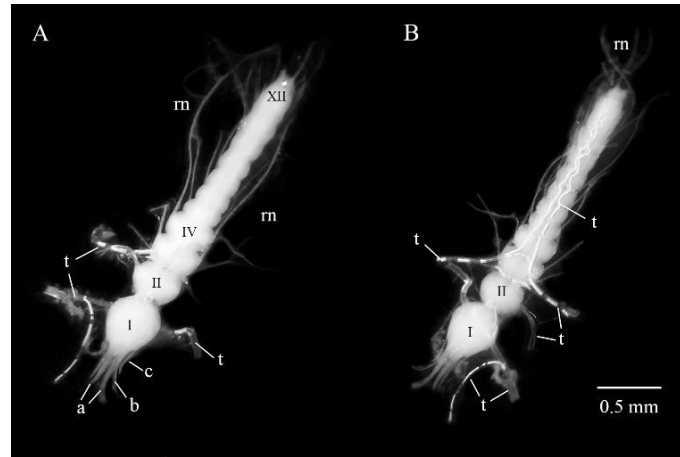


Figura 2. Vista ventral (A) y dorsal (B) del sistema nervioso de *M. nigripes*. En los especímenes analizados (n=7) se observó 12 ganglios (I a XII). Nótese la reducción de tamaño de éstos, iniciando desde la región anterior. Se observan ramificaciones que inervan el ganglio cefálico (I), las que se dirigen hacia las mandíbulas (a), los palpos (b) y las antenas (c). En m se muestra una ramificación nerviosa que inerva las patas a partir de los ganglios IV al XII. Se nota una semifusión de los ganglios XI y XII. Se indican también los túbulos del sistema hemolinfático (t).

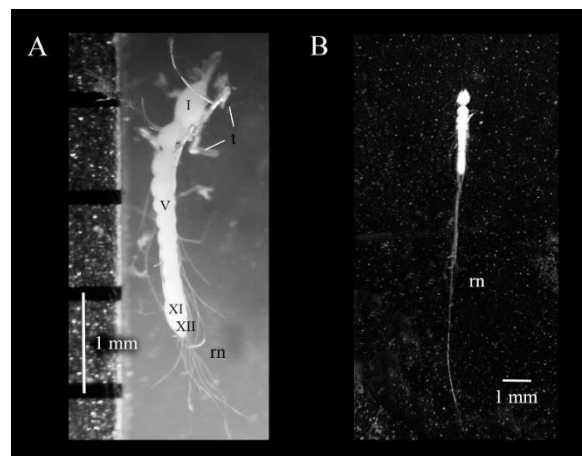


Figura 3. Vista lateral (A) y dorsal (B) del sistema nervioso de *M. nigripes*. En A se indican los ganglios (I a XII), túbulos hemolinfáticos (t) y ramas nerviosas (rn), obsérvese que el sistema nervioso no es tridimensionalmente plano dada la curvatura entre los ganglios I y II, asociada con la entrada al segmento cefálico del animal. En B se muestran algunas de las ramas nerviosas largas que van desde el sistema nervioso ubicado rostralmente hasta las porciones más caudales del animal, cubriendo distancias mayores a los 10 mm.

La organización anatómica de las estructuras que conforman el sistema olfativo de estas larvas muestra que en esta etapa de su ciclo biológico, los individuos podrían estar capacitados en la recepción de estímulos químicos, como se ha mostrado en *Drosophila melanogaster*. Se sugiere que el sistema olfativo de la larva es simple, formado de estructuras ganglionares y no se observan las estructuras características del sistema de los adultos.

El arreglo del sistema nervioso y olfativo de la larva de *M. nigripes* es similar al indicado para larvas de *Tenebrio molitor* (Ullman, 1966). De acuerdo a lo demostrado para el protocerebro del adulto de *M. nigripes*, las larvas presentaron una disposición similar a éste, pudiendo observar los lóbulos ópticos y una reducción de los lóbulos olfativos. También se identificó el ganglio cefálico. La disposición de los lóbulos olfativos corresponden a lo previamente reportado por Martínez Bonilla *et al.* (2014) para adultos de esta misma especie, donde los lóbulos olfatorios se encuentran en la parte superior derecha del ganglio subesofágico, innervando directamente a la antena. Hacia los laterales de los lóbulos olfativos se desprende una rama que posteriormente se bifurca para innervar a las antenas y las maxilas.

Las larvas presentaron estructuras con una posible importancia en cuanto a la recepción de estímulos mecánicos externos y de la transducción de éstos hacia el ganglio cefálico.

El nivel de complejidad en la disposición del sistema nervioso central en larvas es simple, como lo descrito por Stocker (2001) y Stocker y Lawrence (1981), donde se mostró que las larvas de *Drosophila melanogaster* cuentan con un sistema nervioso con un nivel de complejidad básico.

En este mismo estudio, se obtuvo que el mapeo de diferentes sensilas sensibles a “olor” están directamente contactadas con células nerviosas que traducen la señal emitida por un estímulo mecánico del medio, y que las terminales nerviosas que sobresalen al escindir la antena de larvas podrían ser las responsables de este mecanismo. Por lo que en el presente trabajo se puede hipotetizar que seguiría el mismo patrón.

La orientación del sistema olfativo sigue el patrón descrito por Ullman (1966), el cual consiste en que cada lóbulo presente en el protocerebro se extiende de manera dorso ventral al ectodermo.

Es importante señalar que a diferencia de la segmentación de los ganglios nerviosos de adultos de otros grupos de insectos, en *Macroductylus* estos ganglios no están fusionados, sino que, probablemente durante su desarrollo larvario y de pupa, éstos se fusionan. Este mismo principio obedece al propuesto por Wheeler *et al.* (2001) para el desarrollo de adultos de luciérnagas *Luciola gorhami* (Ritz), donde los ganglios torácicos primero y tercero se fusionan. Esto debido a que la evolución temprana en los insectos es crucial para desarrollar el vuelo (Wheeler *et al.*, 2001).

Yeates *et al.* (2002) mostraron que la fusión del segundo y tercer ganglio torácico son más prevalentes que la unión del primero y segundo ganglio torácico en el estado adulto de *L. gorhami*. Por ello, posiblemente estos ganglios se fusionen al término del desarrollo como imago.

CONCLUSIÓN

Este estudio del sistema olfativo de *M. nigripes* ha permitido tener un primer acercamiento a las estructuras involucradas en la transducción de las señales de quimiorrecepción de volátiles y atrayentes, permitiendo obtener información básica de la morfología de larvas y que dan pie a nuevos estudios acerca del comportamiento alimentario de éstas en la rizósfera, así como complementar aspectos de interés para el esquema de atracción alimentaria de insectos del género *Macroductylus* y de la familia Melolonthidae, así como alternativa en el manejo agroecológico de esta especie en su estado larvario tomando en cuenta que responden a los volátiles liberados por las raíces.

Agradecimientos

Al CONACyT por el apoyo económico que permitió la obtención del material requerido en campo y laboratorio.

A la Dra. Betzabeth Cecilia Pérez Torres quien colaboró en la cría de larvas de los ejemplares utilizados para el presente estudio.

Literatura Citada

- Aragón-García, A., Morón, M. A., Rodríguez-Velázquez, S. Y., Cortés-Meza, A. N., Zarazúa-Carvajal, M. and M. A. Damián-Huato. 2010. *Description of the Larvae of Three Species of Macrodactylus* Dejean (Coleoptera:Scarabaeidae_ Melolonthidae) from Mexico, with Notes on the Reproductive Behavior of *Macrodactylus ocreatus* Bates. *The Coleopterists Bulletin*, 64(3): 193–200.
- Branson, T. F. 1982. Olfactory response of larvae of *Diabrotica virgifera virgifera* to plant roots. *Entomology Experimentalis et Applicata*, 31: 303–307.
- Marín-Loaiza, J. C. y C. L. Céspedes. 2007. Compuestos volátiles de plantas. Origen, emisión, análisis y aplicaciones al agro. *Revista Fitotécnica Mexicana*, 30(4): 327–351.
- Martínez-Bonilla, O. K., Romero-López, A. A. y S. Galicia-Isasmendi. 2014. Cuerpos de Seta en el Sistema Olfativo de *Macrodactylus nigripes* Bates (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae). *Entomología mexicana*, 1: 536–540.
- Méndez-Aguilar, M. J., Castro-Ramírez, A. E., Rojas, J. C. y E. Huerta-Lwanga. 2008. Respuesta olfativa de larvas de *Phyllophaga ravidus* y *P. tumulosa* (Melolonthidae) a volátiles de raíces de cuatro plantas hospederas. *Acta Zoológica Mexicana (n. s.)*, 24(1): 115–128.
- Stocker, R. F. 2001. *Drosophila* as a focus in olfactory research: mapping of olfactory sensilla by fine structure, odor specificity, odorant receptor expression, and central connectivity. *Microscopy Research and Technique*, 55: 284–296.
- Ullman, S. L. 1966. *The Development of The Nervous System and Other Ectodermal Derivates in Tenebrio molitor L. (Insecta-Coleoptera)*. Royal Society Publishing, 28 p.
- Stocker, R. F. and P. A. Lawrence. 1981. Sensory projections from normal and homoeotically transformed antennae in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 82: 224–237.
- Wheeler, W. C., Whiting, M., Wheeler, Q. D. and J. M. Carpenter. 2001. The phylogeny of extant hexapod orders. *Cladistics*, 17: 113–169.
- Yeates, D. K., Merritt, D. J. and C. H. Baker. 2002. The adult ventral nerve cord as a phylogenetic character in Brachyceran Diptera. *Organism Diversity and Evolution*, 2: 89–96.
- Zorovic, M. and B. Hedwig. 2011. Processing of species-specific auditory patterns in the cricket brain by ascending, local, and descending neurons during standing and walking. *Journal of Neurophysiology*, 105: 2181–2194.