



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



**Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales**

**Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas**

# **TESIS**

VARIACIÓN MORFOLÓGICA Y GENÉTICA DE CINCO POBLACIONES DEL PICUDO  
DEL AGAVE, *Scyphophorus acupunctatus* GYLLENHAL (COLEOPTERA:  
CURCULIONIDAE)

**QUE PRESENTA:**

**IBT. XCARET CONTRERAS FIGUEROA**

**Para obtener el grado de:**

**Maestra en Ciencias Biológicas**

**DIRECTOR DE TESIS:**

Dr. José Isaac Figueroa de la Rosa

**CODIRECTORA DE TESIS:**

Dra. Selene Ramos Ortiz

**Morelia Michoacán, diciembre del año 2022**

## DEDICATORIA

El resultado de este trabajo lo dedico principalmente a mis padres, sin su amor y apoyo incondicional no hubiera llegado al final.

A mi mamá grande, sin tu cariño y cuidados no sería la persona que soy.

A mi papá grande, mi tía Quis y mi tía Lupe, que ya no están conmigo, por quererme tanto y siempre creer en mí.

A Cristian, gracias por no soltar mi mano en los momentos más difíciles.

A mis gatitos Miau, Cullen y Salem, me inspiran a continuar para darles la vida que se merecen.

## AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, y a su Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero otorgado a mi persona.

A la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por el apoyo financiero otorgado al proyecto.

Al Dr. José Isaac Figueroa de la Rosa y a la Dra. Selene Ramos Ortiz por su asesoramiento y compromiso, que, en medio de la adversidad y la crisis de salud mundial, fue crucial para la finalización de este proyecto.

A mis sinodales la Dra. Ana Mabel Martínez Castilla, el Dr. Jesús Llanderal Mendoza y el Dr. Samuel Pineda Guillermo, por sus observaciones, comentarios y puntos de vista, los cuales enriquecieron no solamente este trabajo; también pude enriquecerme de su conocimiento siendo su alumna.

Al Laboratorio de Ecología Molecular de la ENES Unidad Morelia UNAM por el apoyo recibido para el uso de infraestructura y secuenciación de muestras (3500 Series Genetic Analyzer) para desarrollar mi trabajo de Tesis.

Al Dr. Jesús Llanderal Mendoza por el apoyo técnico recibido durante mi estancia en el laboratorio de Ecología Molecular, por la estandarización de las técnicas moleculares y el corrimiento de las muestras en el Secuenciador.

A mis compañeros Belén Geovana Ayala Reyes, Jesús Palma Castillo, Cristian Ángel García, y a todas las personas en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, que se involucraron en este proyecto de manera directa e indirecta.

# ÍNDICE

Dedicatoria .....	2
Agradecimientos .....	3
<b>TABLA DE FIGURAS .....</b>	<b>5</b>
<b>TABLA DE CUADROS .....</b>	<b>7</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>8</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
<b>II. ANTECEDENTES .....</b>	<b>11</b>
2.1 Importancia del género <i>Agave</i> .....	11
2.3 Importancia de <i>Scyphophorus acupunctatus</i> .....	12
.....	13
2.4 Distribución mundial y en México de <i>S. acupunctatus</i> .....	13
2.5 Descripción de la morfometría geométrica.....	15
2.6 Estudios con morfometría geométrica .....	16
2.7 Marcadores moleculares: microsatélites.....	16
2.8 Gen citocromo oxidasa subunidad I (COI).....	17
2.9 Estudios con marcadores moleculares en coleópteros de la familia Curculionidae .....	18
<b>III. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>19</b>
<b>IV. HIPÓTESIS .....</b>	<b>19</b>
<b>V. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
5.1 Objetivo general .....	19
5.2 Objetivos específicos .....	19
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
6.1 Recolección del material biológico.....	20
6.2 Análisis de la variación morfológica de <i>S. acupunctatus</i> .....	20
6.3 Análisis de datos morfométricos.....	23
6.4 Variación genética intra e inter poblacional mediante el uso de marcadores moleculares....	24
6.4.1 Extracción del material genético de <i>S. acupunctatus</i> .....	24
6.4.2 Cuantificación del ADN genómico .....	25
6.5 Marcador molecular: microsatélites.....	25
6.5.1 Gradientes de temperatura para estandarizar la temperatura de amplificaciones de los microsatélites marcados con fluoróforo.....	26
6.6 Amplificación del gen citocromo oxidasa (COI).....	27
6.6.1 Secuenciación y análisis de productos de la PCR.....	28
<b>VII. Resultados .....</b>	<b>30</b>
7.1 Análisis de la variación morfológica de las poblaciones de <i>S. acupunctatus</i> .....	30

7.1.1 Morfometría clásica.....	30
7.2 Morfometría geométrica.....	36
7.2.1 Vista lateral del cuerpo.....	36
7.2.2 Pronoto.....	38
7.2.3 Terguito VIII.....	40
7.2.4 Lóbulo medio.....	41
7.3 Estandarización para la amplificación de los <i>loci</i> de microsatélites en ADN de <i>S. acupunctatus</i> .....	43
7.3.1 Temperatura de alineamiento primers sin fluoróforo.....	43
7.4 Gen COI.....	43
7.5 Variación genética intra e inter poblacional de <i>S. acupunctatus</i> .....	44
7.5.1 Árbol filogenético UPGMA de haplotipos mitocondriales.....	44
VIII. Discusión.....	47
8.1 Morfometría clásica.....	48
8.2 Morfometría geométrica.....	50
8.4 Variación genética intra e inter poblacional de <i>S. acupunctatus</i> .....	51
IX. Conclusiones.....	54
X. Perspectivas.....	54
XI. Literatura Citada.....	55

## TABLA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo de vida de <i>S. acupunctatus</i> . A. huevo; B. larva; C. pupa; D. adulto. Tomado de SENASICA (2016). _____	13
<b>Figura 2.</b> Distribución mundial de <i>S. acupunctatus</i> . _____	14
<b>Figura 3.</b> Distribución de <i>S. acupunctatus</i> en México. Imagen adaptada de Cuervo-Parra et al. (2019)._____	15
<b>Figura 4.</b> Un conjunto de landmarks (círculos blancos) usados en alas de <i>Drosophila melanogaster</i> . Tomado de Klingenberg (2013)._____	15
<b>Figura 5.</b> Cinco alelos con microsatélites de longitud de repetición diferente. Tomado de Al-Samarai (2015). _____	17
<b>Figura 6.</b> Esquema del código de barras de ADN estándar para animales, fragmento del gen de la subunidad I (COI) del citocromo c oxidasa en el genoma mitocondrial. Tomado de (Centre for Biodiversity Genomics, 2021). _____	18
<b>Figura 7.</b> Caracteres elegidos para medición de morfometría clásica. A) 1- Longitud del pronoto, 2-Amplitud del pronoto, 3- Amplitud de la base del rostro 4- Longitud del rostro, 5- Longitud de los élitros, 6- Amplitud de los élitros, 7- Amplitud de la base de los élitros, 8- Amplitud del ápice los élitros, 9- Longitud del cuerpo, 10- Longitud del escapo, 11- Longitud del pedicelo y flagelo de la antena, 12- Longitud y amplitud del escutelo, 13.- Longitud de la clava de la antena. B) 14,15- Altura y amplitud de los ojos, respectivamente, 16- Altura del	

tórax, 17,18-Longitud y amplitud del mesepimeron, 19,20- Longitud y amplitud del mesepisterno, 21- Longitud del fémur, 22- Longitud de la tibia, 23- Longitud de los 5 tarsómeros y longitud del 5to tarsómero. Tomado y modificado de Huala et al. (2018). \_\_\_\_ 21

**Figura 8.** Posicionamiento de 52 landmarks (círculos azules) en vista lateral de *S. acupunctatus*. \_\_\_\_\_ 22

**Figura 9.** Posicionamiento de 65 landmarks (círculos azules) en el pronoto de *S. acupunctatus*. \_\_\_\_\_ 22

**Figura 10.** Genitalia de macho de *S. acupunctatus* a) conjunto de 16 landmarks posicionados en el contorno apical del VIII terguito (VIII<sub>t</sub>) y en vértice de unión de los músculos genitales (Landmark número 1), b) conjunto de 26 landmarks posicionados en el contorno del lóbulo medio (lm). \_\_\_\_\_ 23

**Figura 11.** Análisis clúster de machos y hembras de cada población de *S. acupunctatus* con 34 caracteres. M=macho, H=hembra. Correlación cofenética de Etúcuaro (E), Registrillo (D), San Juan Guelavia (O), Tarímbaro (T) y Acuitzio del Canje (A): 0.646, 0.678, 0.755, 0.7381 y 0.8292, respectivamente. Ejemplo, 4ME=individuo 4, macho, Etúcuaro. Distance= Distancia. \_\_\_\_\_ 31

**Figura 12.** Diagramas de dispersión de hembras-machos, solo machos y solo hembras de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus* con 34 caracteres. Cada elipse representa el 95% de confianza para los valores ponderados de las poblaciones estudiadas (M=macho, H=hembra; individuos: E=Etúcuaro, D= Registrillo, O=San Juan Guelavia, T=Tarímbaro y A=Acuitzio del Canje). Ejemplo, 4ME=individuo 4, macho, Etúcuaro. \_\_\_\_\_ 32

**Figura 13.** Análisis clúster de machos y hembras de cada población de *S. acupunctatus* con 10 caracteres. M=macho, H=hembra. Correlación cofenética de Etúcuaro (E), Registrillo (D), San Juan Guelavia (O), Tarímbaro (T) y Acuitzio del Canje (A): 0.659, 0.683, 0.718, 0.723 y 0.827, respectivamente. Ejem. 4ME=individuo 4, macho, Etúcuaro. Distance= Distancia. \_\_\_\_\_ 33

**Figura 14.** A) Análisis de variación canónica de la vista lateral del cuerpo de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus*. Las imágenes en azul representan las formas representativas de cada variable canónica. Las poblaciones están diferenciadas por colores: Acuitzio del Canje (rojo), Registrillo (verde), Etúcuaro (celeste), San Juan Guelavia (naranja) y Tarímbaro (rosa). B) Análisis clúster de las distancias de Mahalanobis entre poblaciones de *S. acupunctatus*. Correlación cofenética: 0.9609. Distance= Distancia. \_\_\_\_\_ 37

**Figura 15.** Análisis de variación canónica entre sexos de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus*. Los sexos se encuentran diferenciados por colores: Machos (azul) y Hembras (rojo). \_\_\_\_\_ 38

**Figura 16.** A) Análisis de variación canónica de la forma del pronoto de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus*. Las imágenes en azul representan las formas representativas de cada variable canónica. Las poblaciones están diferenciadas por colores: Acuitzio del Canje (rojo), Registrillo (verde), Etúcuaro (azul), San Juan Guelavia (naranja) y Tarímbaro (rosa). B) Análisis clúster de las distancias de Mahalanobis de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus*. Correlación cofenética: 0.771. Distance= Distancia. \_\_\_\_\_ 39

**Figura 17.** Análisis de variación canónica entre sexos de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus*. Los sexos se encuentran diferenciados por colores: machos (azul) y hembras (rojo). \_\_\_\_\_ 40

- Figura 18.** A) Análisis de variación canónica de la forma del terguito VIII de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus*. Las imágenes en azul representan las formas representativas de cada variable canónica. Las poblaciones están diferenciadas por colores: Acuitzio del Canje (rojo), Registrillo (verde), Etúcuaro (azul), San Juan Guelavia (naranja) y Tarímbaro (rosa). B) Análisis clúster de las distancias de Mahalanobis de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus*. Correlación cofenética: 0.5434. Distance= Distancia. \_\_\_\_\_ 41
- Figura 19.** A) Análisis de variación canónica de la forma del lóbulo medio de la genitalia de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus*. Las imágenes en azul representan las formas representativas de cada variable canónica. Las poblaciones están diferenciadas por colores: Acuitzio del Canje (rojo), Registrillo (verde), Etúcuaro (celeste), San Juan Guelavia (naranja) y Tarímbaro (rosa). B) Análisis clúster de las distancias de Mahalanobis de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus*. Correlación cofenética: 0.8194. Distance= Distancia. \_\_\_\_ 42
- Figura 20.** Electroforesis en gel de agarosa al 3% TAE de los productos de la PCR gradiente, la línea de color rojo indica en donde se encuentra el ADN de interés que ha sido amplificado, se esperan bandas de entre 140 a 278 pares de bases (pb). Los números sobre los carriles hacen referencia a los primers seleccionados. \_\_\_\_\_ 43
- Figura 21.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% TAE de los productos de PCR de gradiente del gen COI en dos individuos de *S. acupunctatus*: a) San Juan Guelavia, Oaxaca, b) Registrillo, Durango. La línea de color rojo indica el ADN de interés con un tamaño aproximado de 650-658 pares de bases (pb). MM=Marcador molecular (1Kb). \_\_\_\_\_ 44
- Figura 22.** Árbol Filogenético UPGMA de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus* y un grupo externo (*S. yuccae*). Los valores al inicio de cada nodo representan la robustez de cada rama (Bootstrap). Las poblaciones están diferenciadas por colores: Registrillo, Durango. (verde), Tarímbaro, Michoacán. (rosa), San Juan Guelavia, Oaxaca. (naranja), Acuitzio del Canje, Michoacán. (rojo) y Etúcuaro, Michoacán. (azul). \_\_\_\_\_ 45

## TABLA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Usos más importantes de las plantas de <i>Agave</i> .....	11
<b>Cuadro 2.</b> Plantas hospederas y ubicación de los sitios de recolecta de <i>S. acupunctatus</i> . ....	20
<b>Cuadro 3.</b> Protocolo de extracción de ADN en insectos. ....	25
<b>Cuadro 4.</b> Primers utilizados para amplificar los microsatélites elegidos en base al trabajo de Husseneder <i>et al.</i> (2017). ....	27
<b>Cuadro 5.</b> Secuencias de los primers utilizados para la amplificación del gen COI, de acuerdo con Folmer <i>et al.</i> (1994).....	28
<b>Cuadro 6.</b> ANOVAs para 10 caracteres morfométricos entre hembras, machos y hembras-machos de cinco poblaciones de <i>S. acupunctatus</i> . NDS= No diferencias significativas.....	35
<b>Cuadro 7.</b> Temperatura de alineamiento de cuatro pares de primers sin fluoróforo añadido reportado para el escarabajo <i>X. crassiusculus</i> (por Husseneder <i>et al.</i> (2017) y modificado para <i>S. acupunctatus</i> . ....	43
<b>Cuadro 8.</b> Valores de diferenciación genética y sitios polimórficos .....	46
<b>Cuadro 9.</b> Distancia genética de las cinco poblaciones estudiadas. ....	46
<b>Cuadro 10.</b> Matriz de distancia genética por pares (Gst) entre cinco poblaciones de <i>S. acupunctatus</i> . ....	46

## RESUMEN

*Scyphophorus acupunctatus* se considera la plaga más importante del cultivo del agave. El objetivo de estudio fue determinar la variación morfológica y genética de las poblaciones de *S. acupunctatus* procedentes de Acuitzio del Canje, Etúcuaro, Tarímbaro (las tres poblaciones de Michoacán), San Juan Guelavia (Oaxaca) y Registrillo (Durango), mismas que se recolectaron de cinco hospederos diferentes. Para este estudio se emplearon las técnicas de morfometría clásica y geométrica en combinación con herramientas moleculares. Para la morfometría clásica se midieron 34 caracteres morfológicos de 10 hembras y 10 machos de cada población y para la morfometría geométrica se tomaron imágenes digitales, también de 10 machos y 10 hembras de cada población, de la vista lateral del cuerpo, de la vista dorsal del pronoto, del terguito VIII y del lóbulo medio. El análisis genético se llevó a cabo utilizando el gen mitocondrial: citocromo oxidasa I (COI) amplificado en individuos de Etúcuaro (15), Registrillo (16), San Juan Guelavia (15), Tarímbaro (6) y Acuitzio del Canje (5) (sin sexar). Los resultados indicaron en la morfometría clásica, con los 34 caracteres morfológicos analizados para cada población, que *S. acupunctatus* es una especie que presenta una amplia variación en las mediciones de los caracteres entre poblaciones y entre individuos de una misma población (machos y/o hembras). Con respecto a la morfometría geométrica, analizada con la vista lateral del cuerpo y la vista dorsal del pronoto, se demostró que ambas formas evaluadas son de utilidad para separar individuos de *S. acupunctatus* por población y sexo. Finalmente, la diferenciación genética encontrada entre las cinco poblaciones de *S. acupunctatus*, indicó que el flujo genético existente es suficiente para mantener la variación entre y dentro de las poblaciones, debido posiblemente a la plasticidad fenotípica por presión ambiental y al impacto antropogénico en las zonas donde se cultivan especies del género *Agave*.

**Palabras clave:** COI, morfometría geométrica, morfometría clásica, microsátélites, landmarks.

## ABSTRACT

*Scyphophorus acupunctatus* is considered the most important pest of the agave crop. The objective of the study was to determine the morphological and genetic variation of *S. acupunctatus* populations from Acuitzio del Canje, Etúcuaro, Tarímbaro (the three populations of Michoacán), San Juan Guelavia (Oaxaca) and Registrillo (Durango), which were collected from five different hosts. For this study, classical and geometric morphometry techniques were used in combination with molecular tools. For classical morphometry, 34 morphological characters of 10 females and 10 males of each population were measured, and for geometric morphometry, digital images were taken, also of 10 males and 10 females of each population, of the lateral view of the body, of the dorsal view of the pronotum, tergite VIII and the median lobe. Genetic analysis was carried out using the mitochondrial gene: cytochrome oxidase I (COI) amplified in individuals from Etúcuaro (15), Registrillo (16), San Juan Guelavia (15), Tarímbaro (6) and Acuitzio del Canje (5) (without sexing). The results indicated in the classical morphometry, with the 34 morphological characters analyzed for each population, that *S. acupunctatus* is a species that presents a wide variation in the measurements of the characters between populations and between individuals of the same population (males and/or females). With respect to geometric morphometry, analyzed with the lateral view of the body and the dorsal view of the pronotum, it was shown that both forms evaluated are useful to separate individuals of *S. acupunctatus* by population and sex. Finally, the genetic differentiation found among the five populations of *S. acupunctatus* indicated that the existing gene flow is sufficient

to maintain variation between and within populations, possibly due to phenotypic plasticity because of environmental pressure and anthropogenic impact in the areas where species of the *Agave* genus are cultivated.

## I. INTRODUCCIÓN

Las plagas y enfermedades causan pérdidas económicas significativas en el sector agrícola (SIAP, 2016a). Un estudio de la FAO, a través de AGROASEMEX (2019), reveló que las plagas no sólo causan pérdidas económicas sino también reducen la calidad de los productos. La industria del tequila y mezcal es un sector muy importante para la economía de México debido a la generación de empleos y captación de divisas. Debido a esto, las plantas del género *Agave* (Asparagaceae) tienen alta demanda en la producción de bebidas y subproductos, además de proveer otros servicios tales como el equilibrio ambiental y agroecológico que mantienen las zonas semidesérticas donde crecen (Beltran, 2005; Cuervo *et al.*, 2019; Tribuna, 2019). En los últimos años, el consumo de bebidas derivadas del agave ha aumentado considerablemente (SIAP, 2016b), y como consecuencia, también ha incrementado la superficie de este cultivo y los problemas de plagas. Actualmente, este cultivo tiene una superficie sembrada de 120,339 ha, misma que está distribuida en 23 estados de la República Mexicana, donde sobresalen Jalisco, Guanajuato, Oaxaca, Nayarit y Michoacán con mayor superficie sembrada (SIAP, 2016a).

*Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae), comúnmente conocido como el picudo del agave, se considera como la plaga más importante que afecta a las especies del género *Agave*, tanto a los cultivos destinados para la producción de fibra y bebidas (tequila, mezcal y pulque) como para la producción ornamental. El principal daño de este insecto lo ocasiona el estado de larva, que junto a la infección bacteriana que transmite, provoca el colapso y la muerte de las plantas (Riba *et al.*, 2007). Las larvas de *S. acupunctatus* tienen la particularidad de enterrarse en el meristemo apical de la roseta de agave para alimentarse de los tejidos internos de la planta. Terminado su desarrollo, la larva excava hacia las raíces de la planta para formar su capullo y pupar (Smith *et al.*, 2012). Esta especie fue originalmente descrita en México, pero su distribución incluye los cinco continentes (CABI, 2021). Según Vaurie (1971), esta especie presenta variación morfológica entre los individuos de diferentes áreas geográficas, lo que probablemente se deba a que se alimenta de distintas especies de plantas. Jaramillo (2010) menciona que las variaciones morfológicas de los organismos son atributos medibles que adquirieron las poblaciones en los diferentes entornos ecológicos en respuesta a la interacción con factores bióticos y abióticos, y la morfometría

geométrica es la ciencia que estudia a profundidad tales variaciones para generar patrones distribucionales, evolutivos y filogenético. En este contexto, Sanaei *et al.* (2015) observaron que el dimorfismo sexual y la morfología de cinco poblaciones iraníes del picudo de la alfalfa, *Hypera postica* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae), tuvieron importantes variaciones en la forma del pronoto, élitros y rostro entre machos y hembras, así como entre individuos de diferentes poblaciones. De igual forma, Souza (2017) diferenció machos y hembras del curculiónido *Cratosomus flavofasciatus* Guerin, mediante mediciones de la última sección tanto del abdomen como del tórax.

Por otro lado, la medición de la variabilidad de los organismos no sólo puede basarse con rasgos morfológicos, sino también con estudios de biología molecular (ejemplo; RAPDs, isoenzimas, microsatélites, entre otros), donde medir la variabilidad genética puede proporcionar un indicio de la identidad de las poblaciones. En los últimos años, la implementación de marcadores moleculares en estudios sobre la diversidad genética ha aumentado considerablemente, especialmente por su elevada tasa de polimorfismo y las reducidas cantidades de ADN que se requieren sin destruir especímenes (González, 2003). Al respecto, en un estudio realizado en el sur de Chile, Huala *et al.* (2018) revelaron que las poblaciones de la especie *Calvertius tuberosus* (Fairmaire & Germain) (Coleoptera: Curculionidae), el cual se alimenta de árboles de *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch, con distribución en la zona andina y la zona costera del mismo país, presentaron diferenciación genética entre ambas poblaciones, lo cual lo atribuyeron a la separación geográfica que tuvo su hospedero a través del tiempo y que fueron afectados por los cambios ambientales a gran escala. Así mismo, Thangaraj *et al.* (2016) demostraron la utilidad de los marcadores de microsatélites para caracterizar la estructura y diversidad genética de cuatro poblaciones del gorgojo del arroz, *Sitophilus oryzae* L., en países procedentes de Australia, China y Estados Unidos de América. Estos mismos autores sugirieron que los microsatélites, junto con los análisis genéticos de población, proporcionan un recurso valioso para la investigación genética de poblaciones y contribuyen a estrategias efectivas de manejo integrado de plagas. Sin duda, ambas herramientas de estudio, la morfometría geométrica y los estudios moleculares, son complementarias, puesto que miden características diferentes. Por ello, el presente estudio tiene la finalidad de evaluar la variación morfológica y caracterizar la variación genética de cinco poblaciones distintas de *S. acupunctatus*.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Importancia del género *Agave*.

Las plantas del género *Agave* tienen raíces ramificadas, una cutícula gruesa (según la especie) y hojas suculentas con estomas hundidos. En general, las especies que pertenecen a este género mantienen el equilibrio ambiental y agroecológico en las zonas semidesérticas donde crecen (Cuervo *et al.*, 2019).

México es el país con mayor diversidad de especies del género *Agave*, ya que cuenta con alrededor de 159 especies de un total de 206 descritas a nivel mundial, de las cuales 119 especies se consideran endémicas (García-Mendoza, 2011; Huerta-Alcocer *et al.*, 2014). La importancia de las especies del género *Agave* se remonta a la época prehispánica cuando los pueblos indígenas del centro y norte del país encontraron en esta planta una fuente de materia prima para elaborar una gran cantidad de productos (Cuadro 1) (García *et al.*, 2010; Espinoza, 2015).

**Cuadro 1.** Usos más importantes de las plantas de *Agave*.

USOS	PRODUCTO	PARTE DE LA PLANTA
AGROPECUARIOS	Cerca Viva	Planta completa
	Prevención de la erosión como formadora de suelo	Planta completa
	Abono orgánico (fertilizante)	Composta de hojas
	Planta líder de ecosistemas	Planta completa
	Forraje (bovino, caprino, porcino)	Hojas, escapos florales, flores, parte de la inflorescencia, bagazo.
INDUSTRIALES	Industria química, farmacéutica, medicamentos y productos esteroides (saponinas)	Hojas, raíces, tallo y semilla
	Producción de celulosa para papel	
	Producción de etanol, celulosa y glucósidos	Hojas (pulpa y residuos de desfibramiento)
	Aguamiel, miel, atole de aguamiel, pulque, mezcal, tequila, sotol, bacanora, vinagre, jarabe.	Hojas (pulpa, residuos del desfibramiento, bagazo, jugos)
	Materiales compuestos: resinas termoplásticas o termófilas + fibras	Tallo (piña)
		Residuos de fibra

Tomado de García-Herrera *et al.* (2010).

De las plantas del género *Agave* puede conseguirse una extensa variedad de usos y productos, entre los que destaca la producción de destilados y bebidas fermentadas. Por otra parte, las plantas de agave también son usadas como plantas de ornato y para la extracción de aceites esenciales en perfumería (ejemplo; *Agave amica*, anteriormente *Polianthes tuberosa*), así como en la industria textil para la fabricación de fibra (*Agave fourcroydes*), biocombustible (*Agave americana*) y otros subproductos como la fructosa (*Agave tequilana*) e inulina (*Agave sisalana*) (Espinoza, 2015; Cuervo *et al.*, 2019; IPNI, 2020), entre otros (Cuadro 1).

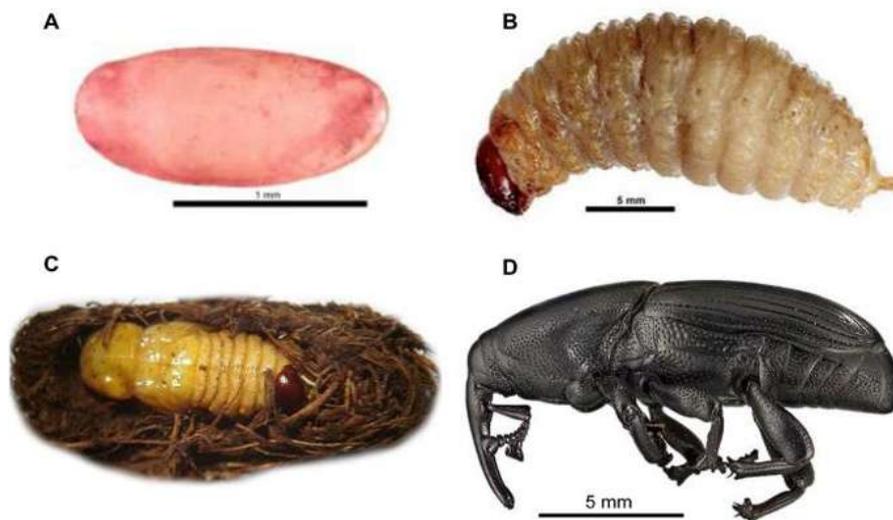
En los últimos años se ha determinado que la industria del tequila y mezcal constituye la segunda actividad económica más importante, especialmente porque el 18% del total de la producción de bebidas alcohólicas corresponde al tequila y al mezcal. Así mismo, México es el principal país exportador de tequila a países como Estados Unidos de América con 165 millones de L<sup>-1</sup> (mdL). Otros países como, Alemania, Colombia, España, Francia y Gran Bretaña con importaciones de 2 a 4 mdL, recientemente se logró la entrada de esta bebida a China (INEGI, 2019). Finalmente, a pesar de ser una de las actividades económicas más importantes del país, la industria del agave ha pasado por diversas crisis, vinculadas a su escasez o abundancia (debido a que las plantas tardan entre 7 a 8 años en madurar), lo que deriva en la volatilidad de sus precios que genera incertidumbre entre los productores (Ruiz, 2018). Desafortunadamente, el desequilibrio entre la oferta y la demanda de agave y sus productos se acentúa por la presencia de plagas y enfermedades (Ruiz, 2018).

### **2.3 Importancia de *Scyphophorus acupunctatus*.**

El Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) ha reportado a *S. acupunctatus* como una plaga reglamentada por los daños que provoca a los cultivos de agave (polifagia), por ello cuenta con un programa oficial de control (CIPF, 2002). Además de ser comúnmente conocido como el “picudo del agave”, también se conoce como “pinacate del maguey” o “torito de maguey” (Riba *et al.*, 2007). Entre las plantas hospederas registradas para esta especie de insecto se incluyen al *Agave fourcroydes* Lem (agave henequenero), *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck (maguey pulquero), *Agave sisalana* Perrine ex Engelm (Sisal), *Dracaena draco* L. (drago de canaria), *Furcraea cabuya* Vent. (cabuya o fique), *A. amica* (nardo), *Yucca aloifolia* L. (bayoneta española), *Yucca elephantipes* Baker in Regel (pata de elefante) y *Yucca glauca* Nutt (yuca de llanura) (Vaurie *et al.*, 1971; Chamorro *et al.*, 2016).

*Scyphophorus acupunctatus* es un insecto que presenta metamorfosis completa, ya que pasa por cuatro estados de vida durante su desarrollo (Figura 1). Los huevos eclosionan a los 5 días, son de forma ovoidal, de color blanco y son ovipositados en masas de hasta cuatro huevos. Las

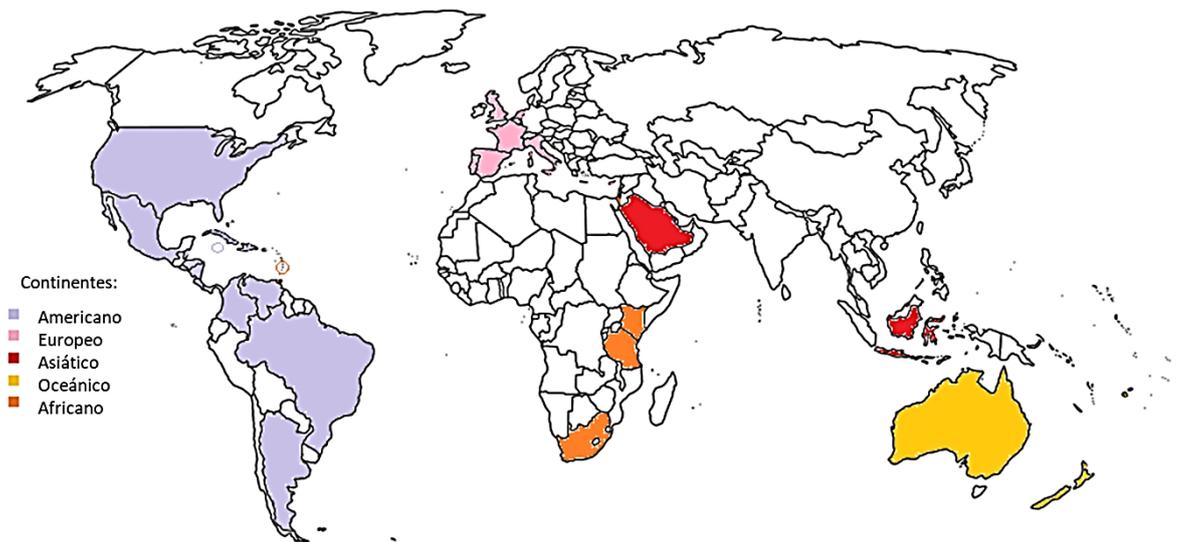
larvas son apodas, ligeramente encorvadas y del mismo color de los huevos. Las pupas generalmente se les encuentran dentro de un cocón formado de la fibra de la planta hospedera, son de color amarillo en las primeras horas y después se tornan café oscuro. En este estado de vida los individuos presentan apéndices libres (antenas, aparato bucal y patas). Finalmente, el adulto es de cuerpo robusto, compacto y de color negro brillante (Siller-Jasso, 1985; Solís, 2001). El ciclo de vida de este insecto (Figura 1) dura entre 105 y 137 días, dependiendo de la especie de agave del que se alimente y de las condiciones climáticas. Esta plaga puede infestar a las plantas en cualquier mes del año, aunque es más frecuente en la temporada de lluvias (Siller-Jasso, 1985; Solís-Aguilar, 2001; Cuervo *et al.*, 2019). Las hembras pueden diferenciarse de los machos (dimorfismo sexual) por el último segmento abdominal, el cual es más corto y puntiagudo (Solís-Aguilar, 2001).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *S. acupunctatus*. A. huevo; B. larva; C. pupa; D. adulto. Tomado de SENASICA (2016).

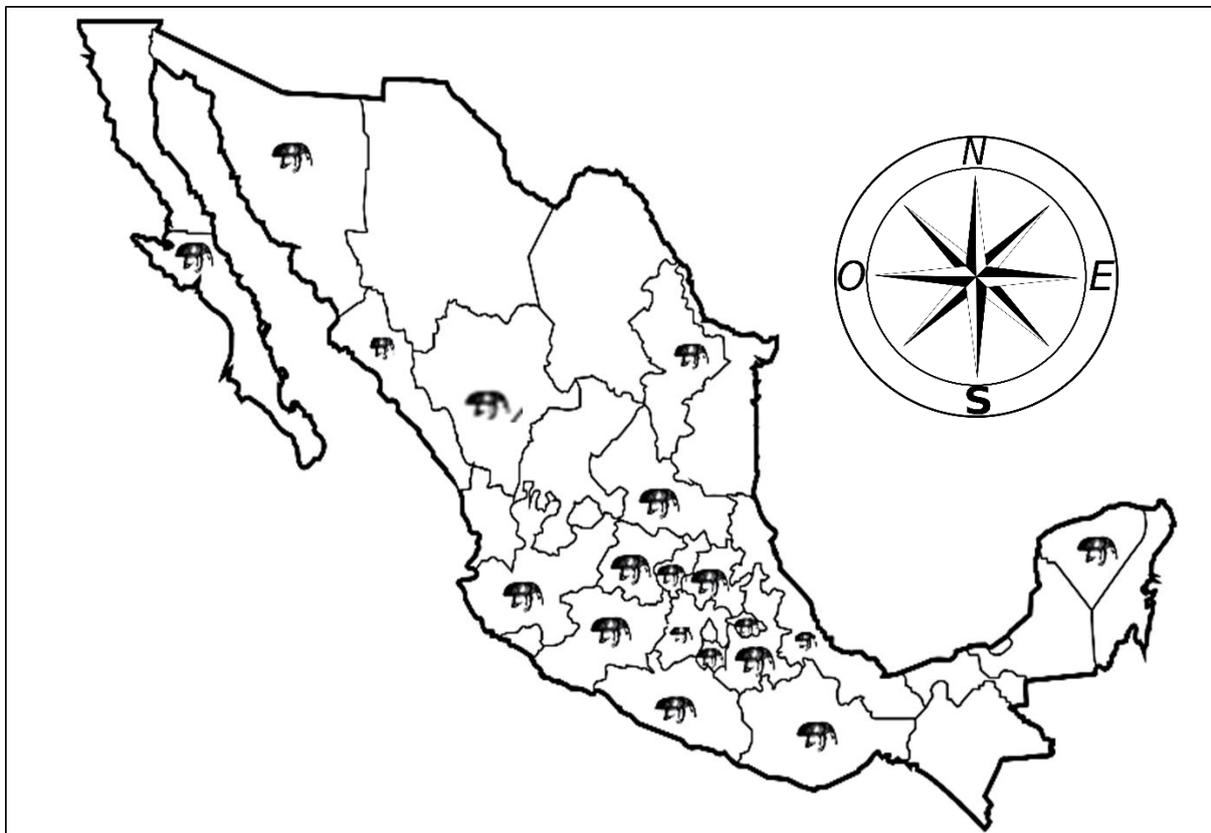
#### **2.4 Distribución mundial y en México de *S. acupunctatus*.**

*Scyphophorus acupunctatus* se encuentra distribuido a lo largo de los cinco continentes (Figura 2): Asia (Vaurie, 1971; EPPO, 2014); África (Servin *et al.*, 2006; EPPO, 2014), América (Halfpter, 1956; Aquino *et al.*, 2007; EPPO, 2014); Europa (Van Rossem *et al.*, 1981; EPPO, 2014); Oceanía (Vaurie, 1971; Molina, 2013; EPPO, 2014).



**Figura 2.** Distribución mundial de *S. acupunctatus*.

En México se ha reportado la presencia de *S. acupunctatus* en los estados de Baja California Sur, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Yucatán

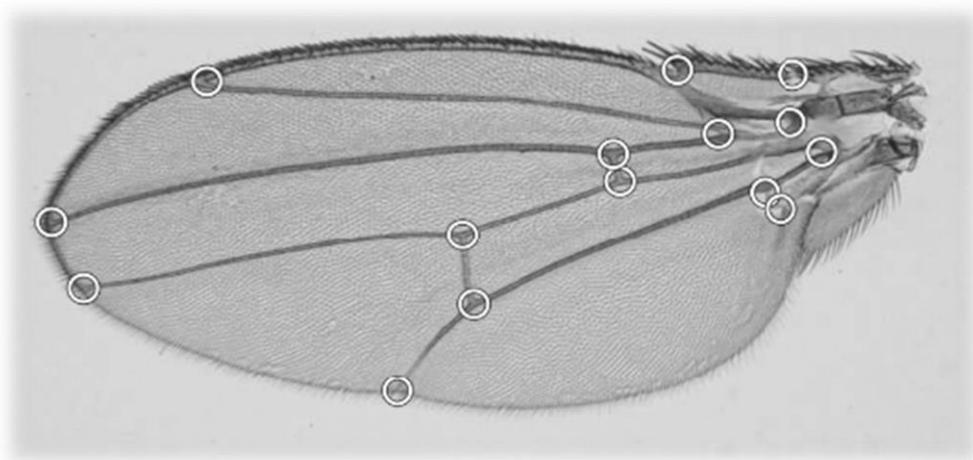


(Cuervo Parra *et al.*, 2019; Naturalista, 2020).

**Figura 3.** Distribución de *S. acupunctatus* en México. Imagen adaptada de Cuervo-Parra *et al.* (2019).

## 2.5 Descripción de la morfometría geométrica.

El objetivo principal de la morfometría es estudiar cómo varían las formas y su relación con otras variables de medición, mismas que permiten la descripción cuantitativa de los organismos. Un primer método denominado "tradicional" o "clásico" mide distancias lineales (como longitud, ancho y altura), aunque la limitante de este método es que las mediciones de distancia lineal generalmente están altamente correlacionadas con el tamaño; por ello, se dificulta el análisis de la forma (Gelsvartas, 2007). La morfometría geométrica es otra herramienta que se usa con estadísticas multivariadas, la cual describen patrones de variación de forma dentro y entre grupos. Con esta metodología, la forma se define matemáticamente como "todas las características geométricas de un objeto, excepto su tamaño, posición y orientación" (Gelsvartas, 2007). Con esta técnica, se pueden capturar contornos o hitos, también conocidos como *landmarks*, los cuales son puntos de referencias que utiliza un conjunto de puntos específicos para describir la forma (Figura 4) (Ibacache *et al.*, 2010). Un *landmark* es un punto bidimensional o tridimensional descrito por un conjunto de reglas bien definidas. Cada *landmark* también debe estar presente en cada organismo estudiado, donde el número de puntos de referencia seleccionados no debe exceder el número de muestras porque los puntos de referencia adicionales serán redundantes. Mediante el uso de la morfometría geométrica se pueden determinar las relaciones entre los puntos anatómicos de un organismo, identificar patrones de asimetría y generar hipótesis sobre la estabilidad del desarrollo del grupo de estudio (Gelsvartas, 2007; Benitez, 2016).



**Figura 4.** Un conjunto de *landmarks* (círculos blancos) usados en alas de *Drosophila melanogaster*. Tomado de Klingenberg (2013).

## **2.6 Estudios con morfometría geométrica.**

En insectos hay varios casos de estudio que pueden citarse como modelo del uso de la morfometría geométrica. Por ejemplo, en Irán, Sanaei *et al.* (2015) encontraron diferencias de forma tanto entre machos y hembras de *H. postica* de una misma población como entre individuos del mismo sexo de poblaciones diferentes. De manera similar, en Brasil, Souza (2017) verificó también las diferencias en forma y tamaño de las hembras y machos de *Cratosomus flavofasciatus*. Por su parte, García-Román *et al.* (2019) determinaron las diferencias entre individuos de *Dendroctonus approximatus* Dietz y *D. parallelcollis* Chapuis (Curculionidae: Scolytinae) recolectados de México, Guatemala y Honduras. Finalmente, Riad y Mahmoud (2020) compararon las mediciones morfométricas de poblaciones diferentes de *Pimilia nilotica* (Coleoptera: Tenebrionidae) en Egipto.

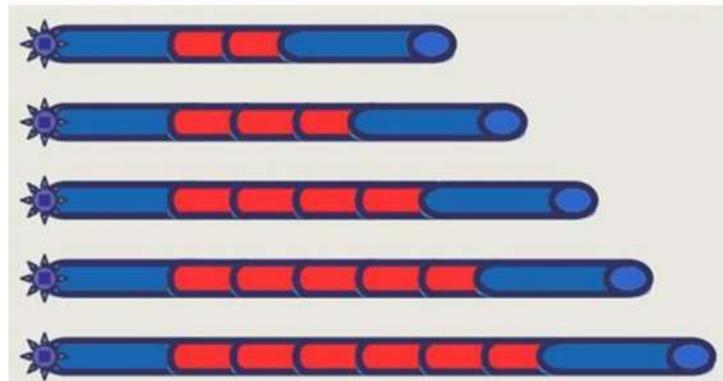
## **2.7 Marcadores moleculares: microsatélites.**

La información a nivel genético ayuda a encontrar diferencias de secuencia de nucleótidos que se pueden usar para estudiar las relaciones evolutivas entre especies. Durante la evolución, el material genético acumula mutaciones que potencialmente resultan en cambios fenotípicos (Woese y Fox, 1977; Olsen y Woese, 1993).

Los *loci* son posiciones que ocupan los genes a lo largo de un cromosoma que pueden ser analizados mediante técnicas moleculares. Los microsatélites también conocidos como repeticiones de secuencia simple (SSR), polimorfismos de longitud de secuencia simple (SSLP) o repeticiones en tándem cortas (STR), son secuencias medulares de pares de bases repetidas en tándem (secuencia de dos o más pares de bases de ADN) y que presentan un elevado grado de polimorfismo en función del número de repeticiones (Ríos *et al.*, 2009). El alto grado de polimorfismo y la amplia distribución de microsatélites permiten la detección de bajos niveles de diferenciación. Los microsatélites han sido ampliamente utilizados en estudios de migración y estructura genética de poblaciones de insectos, aspectos demográficos y de conservación (Gutiérrez, 2013).

De manera general, la técnica se basa en que el número de repeticiones varía ampliamente entre los diferentes individuos. Esta variación del número de repeticiones crea diferentes alelos. Estos presentan una alta tasa de mutación, característica que los hace muy polimórficos. Para la detección de estas secuencias repetidas se utiliza la amplificación de ADN mediante la PCR a partir de muestras biológicas de cualquier tipo. Se selecciona o sintetiza un *primer* que se sabe flanquea las regiones microsatélite, obteniendo únicamente estas secuencias medulares. Así mismo, una vez obtenido el producto de la reacción de cadena de la polimerasa (PCR), los fragmentos se analizan mediante electroforesis. Existen dos opciones para la

identificación de los amplicones: la tinción de plata y la fluorescencia (Gutiérrez, 2013). En un microsatélite que está flanqueado por primers de PCR fluorescentes, la amplificación dará un par de productos alélicos fluorescentes que variarán en tamaño según su longitud de repetición (Figura 5) (Al-Samarai, 2015).

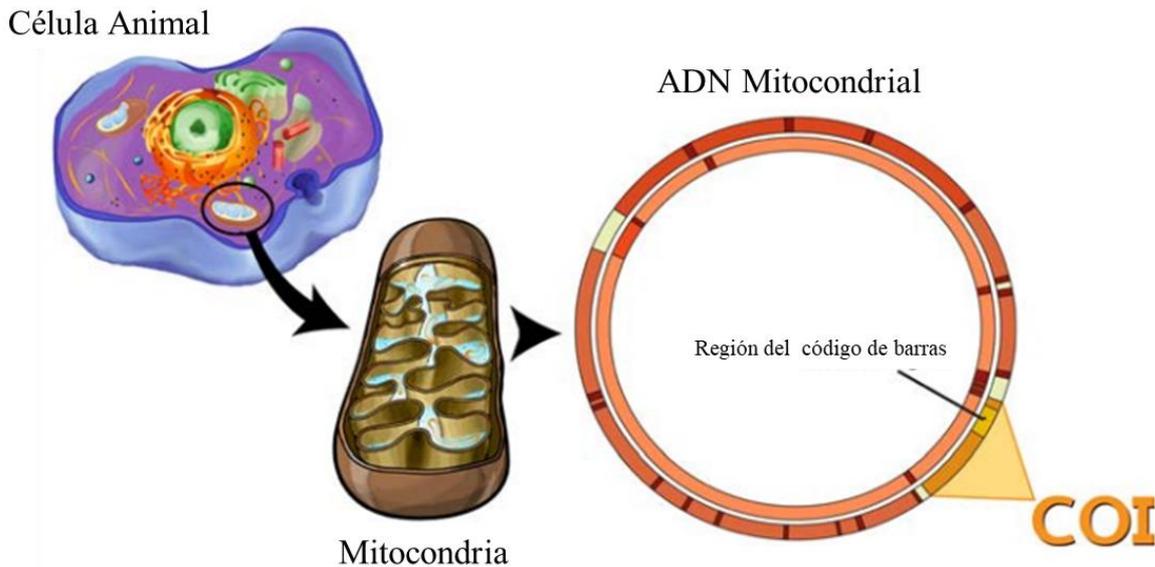


**Figura 5.** Cinco alelos con microsatélites de longitud de repetición diferente. Tomado de Al-Samarai (2015).

## 2.8 Gen citocromo oxidasa subunidad I (COI).

El ADN mitocondrial es fácil de aislar por su elevada abundancia en las células. A pesar de presentar altas tasas de mutación en distintas partes de su estructura puede mantener regiones altamente conservadas seguidas de regiones altamente variables, mismas que son útiles para estudiar la diferenciación genética entre poblaciones de una misma especie y entre especies de un mismo género (Lanteri, 2007; Pečňiar y Buzan, 2013).

El marcador molecular basado en el gen COI (Figura 6), también considerado como “código de barras de la vida”, es utilizado principalmente para la identificación de insectos debido a la tasa de mutación del ADN mitocondrial, lo cual hace posible la distinción de especies estrechamente relacionadas y el grado de conservación de la secuencia entre individuos del mismo género y especie (Harvey *et al.*, 2003). Este “código de barras” del ADN se ha implementado, por ejemplo en Canadá, para describir especies nuevas de coleópteros invasores (Bouchard *et al.*, 2009). También se ha utilizado como modelo para examinar la heterogeneidad interna de la tasa evolutiva y sus implicaciones para análisis evolutivos en insectos como *Chorthlppus parallelus* (Zetterstedt) (Orthoptera: Acrididae) (Lunt *et al.*, 1996). De la misma manera, en estudios de diversidad genética en *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) identificando a estos escarabajos de las palmeras que invaden la cuenca del Mediterráneo y Oriente Medio y también para detectar puntos críticos de población (Sukirno *et al.*, 2020).



**Figura 6.** Esquema del código de barras de ADN estándar para animales, fragmento del gen de la subunidad I (COI) del citocromo *c* oxidasa en el genoma mitocondrial. Tomado de (Centre for Biodiversity Genomics, 2021).

## 2.9 Estudios con marcadores moleculares en coleópteros de la familia Curculionidae.

Las herramientas moleculares han sido ampliamente utilizadas para la entomología. Por ejemplo, Lesieur *et al.* (2016) caracterizó por primera vez con microsatélites a *Ceutorhynchus assimilis* Paykull, para que estos estuvieran disponibles para estudios genéticos de poblaciones a gran escala. Thangaraj *et al.* (2016) evaluaron la estructura y variación genética de cuatro poblaciones de *S. oryzae* en Nueva Gales del Sur, Queensland y Santai (Australia). Los autores observaron que las cuatro poblaciones formaron cuatro grupos distintos, lo cual permitió visualizar futuras perspectivas de estrategias de manejo de la plaga. Husseneder *et al.* (2017) encontraron en el escarabajo ambrosia granulado, *Xylosandrus crassiusculus* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), especie plaga invasora de viveros ornamentales, que de tres poblaciones estudiadas dos de ellas pertenecían a la misma población, mientras que la tercera mostró ser genéticamente distinta. Además, los autores encontraron un nivel de endogamia muy alta en la población.

Chamorro *et al.* (2016) utilizaron el gen COI para confirmar la identidad de larvas de *S. acupunctatus* encontradas por primera vez en St. Croix, Islas Vírgenes, Estados Unidos de América, la cual amenazaba a la especie endémica de la región *Agave eggersiana* Tre. Los mismos autores mencionan que el análisis filogenético que hicieron con este gen les permitió

plantear un patrón de estructura filogeográfica, donde los especímenes se agruparon por ubicación espacial, sugiriendo la presencia de especies aisladas de las demás poblaciones.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

Existe poca información referente a la variación morfológica y genética entre poblaciones distintas de *S. acupunctatus*, una plaga importante que reduce la producción hasta 40% de los agaves tequilero, mezcalero y pulquero. El conocimiento sobre estos aspectos en esta plaga a través del uso de técnicas morfométricas y moleculares es importante para identificar biotipos de la misma especie en diferentes hospederos y zonas geográficas. Este conocimiento, también ayudaría a corroborar si las actividades implementadas para el control de esta plaga podrían ser las mismas en cualquier parte del país, lo que sería fundamental para producir mejoras en la tecnología de producción de las distintas especies del *Agave* mencionadas anteriormente.

### **IV. HIPÓTESIS**

La distribución geográfica y los diferentes hospederos de *S. acupunctatus* determinan su variabilidad morfológica y genética.

### **V. OBJETIVOS**

#### **5.1 Objetivo General.**

Determinar la variación morfológica y genética de diferentes poblaciones del picudo del agave, *S. acupunctatus*.

#### **5.2 Objetivos Específico.**

- 1) Determinar la variación morfológica de cinco poblaciones de *S. acupunctatus* a través de morfometría clásica y geométrica.
- 2) Analizar la variación genética intra e inter poblacional de *S. acupunctatus* mediante el uso de marcadores moleculares: gen COI y microsatélites.

### **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 6.1 Recolección del material biológico.

Los adultos de *S. acupunctatus* se recolectaron de diferentes plantas hospederas del género *Agave* con síntomas de daños en los lugares señalados en el Cuadro 2. La recolecta de adultos se realizó con pinzas entomológicas para no causarles daños en el cuerpo y posteriormente, los individuos se colocaron en frascos de vidrio que contenía alcohol etílico al 70%. Estos frascos se cerraron herméticamente y se etiquetaron con sus respectivos datos de colecta. Los frascos de vidrio con los insectos se transportaron al Laboratorio de Entomología Agrícola (LEA) del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, UMSN (IIAF-UMSNH) en una hielera de unicel que contenía bolsas de gel congeladas. Todos los especímenes se identificaron con las claves de Romo y Morrone (2012) y se mantuvieron en el congelador a -10 °C del LEA del IIAF-UMSNH.

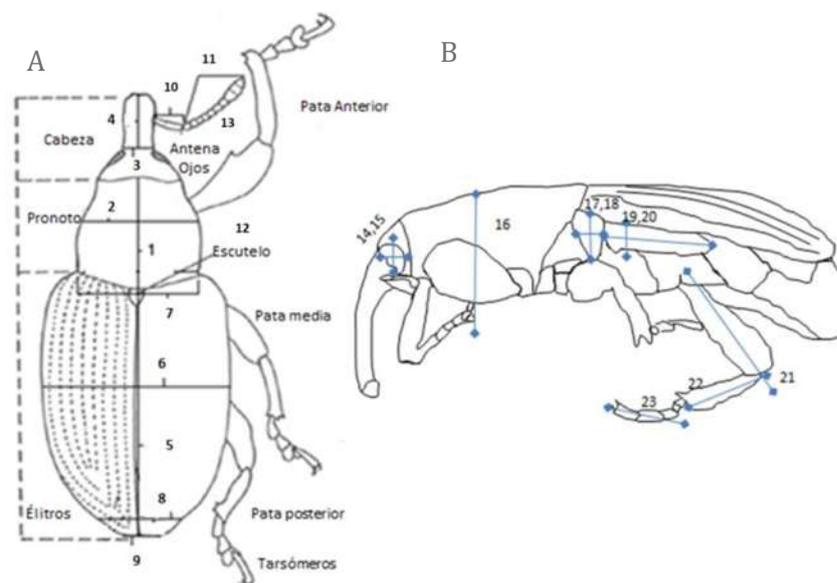
**Cuadro 2.** Plantas hospederas y ubicación de los sitios de recolecta de *S. acupunctatus*.

Población	Hospedero	Edad del hospedero (años)	Localización geográfica	Altitud (m)	No. Individuos
Etúcuaro, Michoacán	<i>Agave cupreata</i>	6	19° 24' 50.4" N, 101° 12' 59.9" O	1,632	20
Acuitzio del Canje, Michoacán.	<i>Agave inaequidens</i>	15-20	19° 29' 11" N, 101° 21' 29" O	2,342	32
Tarímbaro, Michoacán.	<i>Agave salmiana</i>	5	19° 46' 18.12" N, 101° 8' 39.84" O	1,861	45
Registrillo, Durango.	<i>Agave durangensis</i>	7	24° 00' 28.7" N, 104° 23' 13.3" O	1,906	54
San Juan Guelavia, Oaxaca.	<i>Agave angustifolia</i>	5	16° 98' 80" N, 96° 54' 69" O	1,657	60

## 6.2 Análisis de la variación morfológica de *S. acupunctatus*.

*Morfometría clásica.* Este análisis consideró la medición de 100 adultos (10 hembras y 10 machos de cada población) de cinco poblaciones de *S. acupunctatus*. Las mediciones (en mm) se realizaron de 34 partes del cuerpo con la ayuda de un micrómetro instalado en el ocular de un microscopio estereoscópico Carl Zeiss modelo STEMI12000-C. Se midieron las siguientes partes del cuerpo: 1) altura del ojo, 2) amplitud del ojo, 3) longitud del escapo de la antena, 4) longitud del funículo de la antena, 5) longitud de la clava de la antena, 6) longitud del pedicelo de la antena, 7) longitud del último segmento del funículo, 8) longitud del rostro en vista dorsal, 9) amplitud de la base del rostro, 10) longitud del cuerpo en vista lateral (de la cabeza hasta el último segmento del abdomen), 11) longitud del escutelo, 12) amplitud del escutelo, 13) separación de las coxas medias, 14) longitud del mesepimerón, 15) amplitud del mesepimerón, 16) longitud del mesepisterno, 17) amplitud del mesepisterno, 18) longitud del metepisterno,

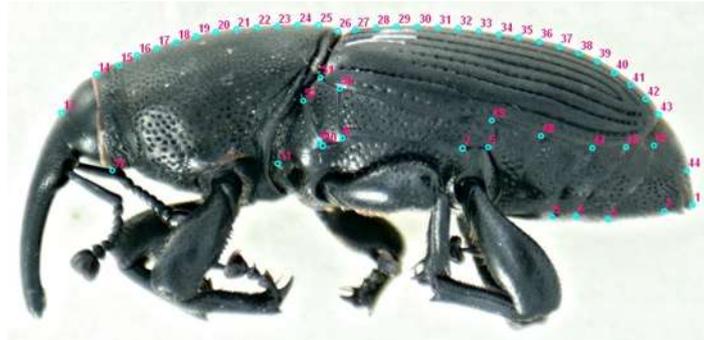
19) amplitud del metepisterno, 20) longitud del pronoto, 21) amplitud del pronoto, 22) longitud del élitro, 23) amplitud máxima del élitro, 24) amplitud de la base del élitro, 25) amplitud del ápice del élitro, 26) longitud de la tibia anterior, 27) longitud de la tibia posterior, 28) longitud del fémur anterior, 29) longitud del fémur posterior, 30) longitud de los cinco tarsómeros de la pata anterior, 31) longitud del 5to. tarsómero de la pata anterior, 32) longitud de los cinco tarsómeros de la pata posterior, 33) longitud del 5to. tarsómero de la pata posterior, y 34) altura del tórax vista lateral. Las estructuras o partes del cuerpo a medir se eligieron con base en la descripción morfológica de *S. acupunctatus* realizada por Vaurie (1971), considerando principalmente aquellas estructuras con mayor variabilidad en sus tamaños. Adicionalmente, se consideraron algunas estructuras mencionadas en el estudio de Huala *et al.* (2018), quienes trabajaron con *C. tuberosus* (Figura 7).



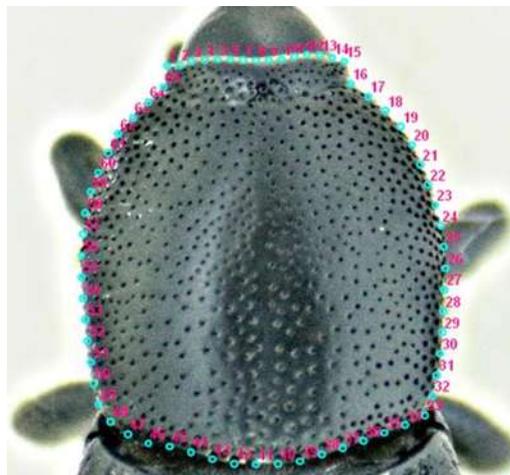
**Figura 7.** Caracteres elegidos para medición de morfometría clásica. A) 1- Longitud del pronoto, 2-Amplitud del pronoto, 3- Amplitud de la base del rostro 4- Longitud del rostro, 5- Longitud de los élitros, 6- Amplitud de los élitros, 7- Amplitud de la base de los élitros, 8- Amplitud del ápice los élitros, 9- Longitud del cuerpo, 10- Longitud del escapo, 11- Longitud del pedicelo y flagelo de la antena, 12- Longitud y amplitud del escutelo, 13.- Longitud de la clava de la antena. B) 14,15- Altura y amplitud de los ojos, respectivamente, 16- Altura del tórax, 17,18-Longitud y amplitud del mesepimeron, 19,20- Longitud y amplitud del mesepisterno, 21- Longitud del fémur, 22- Longitud de la tibia, 23- Longitud de los 5 tarsómeros y longitud del 5to tarsómero. Tomado y modificado de Huala *et al.* (2018).

**Morfometría geométrica.** Para este análisis se tomaron imágenes digitales de 10 machos y 10 hembras de *S. acupunctatus* de cada población con una cámara Canon EOS Réflex y se marcaron coordenadas morfométricas o *landmarks* con el programa TPSDIG2 sobre cada imagen, mismas que permitieron observar las variaciones en la forma y tamaño (en mm) de los especímenes. Se tomaron imágenes del cuerpo en vista lateral y del pronoto en vista dorsal, así

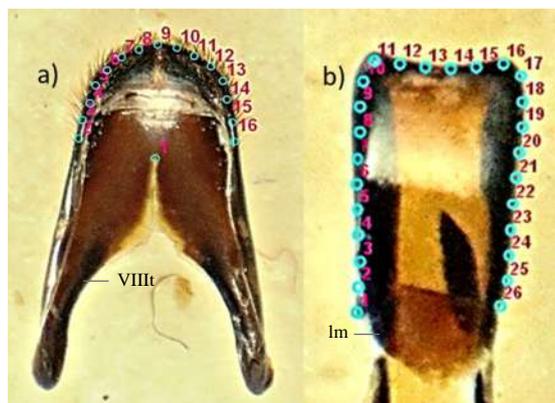
como de la genitalia del macho, la cual se extrajo de la forma como se describe más abajo. Las imágenes se orientaron siempre de la misma manera y con la misma escala de graduación de aumento del microscopio estereoscópico. Por ejemplo, para las imágenes del cuerpo y del pronoto, cada espécimen se colocó con la cabeza orientada hacia la izquierda (Lara de la Cruz, 2011; De la Mora *et al.*, 2018), y en el caso de las genitalia del macho, el terguito VIII y el lóbulo medio (Clark, 1977) se orientaron hacia abajo. En cada individuo, se colocaron 52 (Figura 8), 65 (Figura 9), 16 (Figura 10a) y 26 *landmarks* (Figura 10b) en vista lateral del cuerpo, en el pronoto, en el terguito VIII y en el lóbulo medio, respectivamente.



**Figura 8.** Posicionamiento de 52 landmarks (círculos azules) en vista lateral de *S. acupunctatus*.



**Figura 9.** Posicionamiento de 65 landmarks (círculos azules) en el pronoto de *S. acupunctatus*.



**Figura 10.** Genitalia de macho de *S. acupunctatus* a) conjunto de 16 *landmarks* posicionados en el contorno apical del VIII terguito (VIIIIt) y en vértice de unión de los músculos genitales (*Landmark* número 1), b) conjunto de 26 *landmarks* posicionados en el contorno del lóbulo medio (lm).

*Extracción de genitalia.* La extracción de la genitalia se realizó en 10 machos de cada población estudiada de *S. acupunctatus*, a través de la técnica de Hanley (2003) con algunas modificaciones. Para ello, cada macho se colocó en pequeños crisoles de porcelana con 10 ml de alcohol etílico al 70% hasta punto de ebullición durante 15-20 minutos. Posteriormente, se removió la genitalia de cada macho con ayuda de unas pinzas entomológicas. Los músculos, fibras y grasas residuales contenidas en la genitalia se reblandecieron con una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 10% durante 15 minutos a 65 °C. Después, se lavó con agua destilada para eliminar los residuos de KOH y las fibras y músculos se removieron con ayuda de un pincel de cerdas finas. Finalmente, la genitalia se almacenó en viales con alcohol al 100% hasta su uso. Para el análisis, se tomaron fotografías del lóbulo medio y del VIII terguito de la genitalia (Figura 10).

### 6.3 Análisis de datos morfométricos.

Las matrices de datos generadas para cada población en la morfometría clásica se organizaron por sexo, tomando en cuenta los caracteres sexuales primarios de *S. acupunctatus*. Se generaron matrices para cada población, para solo hembras o solo machos de las cinco poblaciones, y en conjunto, en este caso denominada hembras-machos. En todas las matrices de datos se realizó un análisis de correlación múltiple y un análisis clúster (AC) para buscar datos redundantes (correlación  $\geq 80\%$ ) y atípicos. Posteriormente, los datos se sometieron a un análisis de componentes principales (ACP) para detectar en las variables medidas a los principales caracteres informativos que agruparían a los individuos de *S. acupunctatus* por población o sexo (dimorfismo sexual). Finalmente, con estas variables se realizó otro AC para cada matriz de datos usando distancias euclidianas (aquellas que indican disimilaridad cuando el espacio

vectorial es de igual dimensión o inferior a la dimensión del espacio de las variables en el que se puede representar a los individuos por puntos y su distancia euclídea ordinaria coincide con la distancia utilizada). Estos análisis se realizaron con el programa PAST versión 3.01.

Para los datos de la morfometría geométrica; primeramente, se eliminaron las diferencias producidas por las superposiciones parciales de los especímenes debido a la escala, orientación y ubicación de las configuraciones de *landmarks*. Este procedimiento se realizó con el criterio de distancia mínima de Procrustes en el programa MorphoJ (Klingenberg, 2011). Posteriormente, las coordenadas obtenidas se transformaron en puntuaciones de deformación para generar una matriz de datos que se utilizó para llevar a cabo el ACP, el cual se analizó mediante la variación de forma entre los morfotipos. Para maximizar las diferencias individuales según la población, se realizó un análisis discriminante a través de un análisis de variación canónica (AVC) entre poblaciones y sexo de *S. acupunctatus*. También se realizaron Procrustes ANOVAs para la vista lateral del cuerpo y la vista dorsal del pronoto con la finalidad de encontrar diferencias significativas entre poblaciones y por sexo de *S. acupunctatus* (similar a Vergara *et al.*, 2014). De igual manera, se realizaron Procrustes ANOVAs para el terguito VIII y lóbulo medio de la genitalia del macho con el propósito de encontrar diferencias significativas entre poblaciones. Dichos análisis se realizaron con el programa MorphoJ (Klingenberg, 2011).

Finalmente, con el propósito de detectar a los caracteres informativos (eficaces), que separarían solo hembras, solo machos y hembras-machos de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus*, en los 34 caracteres medidos del análisis de morfometría clásica, cada carácter morfométrico se sometió a un análisis de varianza, y la separación de medias se realizó con la prueba de Tukey. Todos estos análisis se realizaron con el programa PAST versión 3.01.

## **6.4 Variación genética intra e inter poblacional mediante el uso de marcadores moleculares.**

### **6.4.1 Extracción del material genético de *S. acupunctatus*.**

La extracción del ADN se realizó a partir de 15 adultos (sin sexar) de cada población estudiada. La estandarización del protocolo de extracción del ADN de *S. acupunctatus* se llevó a cabo implementando un protocolo de extracción para insectos modificado de Fitzsimmons *et al.* (1997) considerando el peso de la muestra, la cual consistió en la remoción de las seis patas (seleccionadas para evitar el contenido del aparato digestivo y el daño del espécimen) de cada uno de los individuos. A esta muestra se añadió un buffer de lisis (Cuadro 3) y proteinasa K (PK) (20mg/ml). También se empleó acetato de potasio (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K) 5M y tiempos de incubación en frío. Se sustituyó el uso de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) por

cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Finalmente, se dejó secar por completo la pastilla obtenida que contiene el ADN de la muestra, se agregó agua grado molecular para resuspenderla y se dejó hidratar por 8 h para después revisar en un gel de agarosa al 1.5%.

**Cuadro 3.** Protocolo de extracción de ADN en insectos.

<b>Pasos estandarizados para extracción de ADN de <i>S. acupunctatus</i></b>	
<b>Pesado de especímenes</b>	100 mg
<b>Parte del Insecto</b>	Patas
<b>Volumen de PK (20mg/ml)</b>	20 µl
<b>Buffer de lisis</b>	Tris 10 mM pH 7.5-8, EDTA 1mM pH 7.5-8, NaCl 10mM, SDS 1%
<b>Temperatura de incubación</b>	55°C
<b>Tiempo de incubación con PK</b>	20 min
<b>Precipitación de proteínas</b>	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> K
<b>Incubación en frío</b>	10 min a -20°C
<b>Solvente orgánico</b>	Cloroformo isoamílico
<b>Incubación en frío con isopropanol</b>	15 min a -20°C
<b>Reposo la pastilla disuelta en agua</b>	Toda la noche

#### 6.4.2 Cuantificación del ADN genómico.

Las extracciones de ADN se examinaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% con un amortiguador de corrida TAE 1X. Por cada 50 mL de agarosa se agregó 1 µL de GelRed® Nucleic Acid Stain 10 000X (Biotium, Estados Unidos de América). Después de la electroforesis, los geles se visualizaron y capturaron en un sistema de fotodocumentación BioDoc-It®<sup>2</sup> Imaging System (UVP, An Analytik Jena Company, Cambridge). La concentración y calidad del ADN se midió por espectrofotometría utilizando el NanoDrop 2000c® (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos de América).

#### 6.5 Marcador molecular: microsátélites.

Para seleccionar los microsátélites utilizados en el estudio se hizo una revisión bibliográfica tomando en cuenta solo literatura reciente y en donde se reportarán microsátélites diseñados para especies cercanas (Cuadro 4). Una vez seleccionados los microsátélites se mandaron sintetizar 8 pares de primers los cuales fueron reportados por Husseneder y colaboradores en el 2017, en donde reportan una lista de microsátélites utilizados en individuos de la familia Curculionidae (Coleoptera). Estos microsátélites se seleccionaron bajo los siguientes criterios;

1) mostrar variación en el estudio donde se reportaron (Husseneder et al., 2017); 2) presentar diferencia en el tamaño del producto amplificado.

Una vez que fueron sintetizados se realizó una amplificación de los 8 *loci* de microsatélites en un gradiente de temperatura que iba de 40 °C a 60°C y se verificó la amplificación del producto mediante geles de agarosa al 1.5% teñidos con SyBr Safe, visualizándolos en un fotodocumentador ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad®). En ese mismo gel se utilizó un marcador de peso molecular de 1Kb conveniente para referenciar el tamaño de los fragmentos amplificados y se seleccionaron aquellas temperaturas en donde se observó una sola banda cercana al tamaño reportado por Husseneder y colaboradores. Posteriormente se mandaron sintetizar los oligonucleicos "Forwad" junto con un fluoróforo (6-FAM) para poderlos leer en un secuenciador mediante un electroferograma (Lara de la Cruz *et al.*, 2011; Ramos-Ortiz *et al.*, 2016).

#### **6.5.1 Gradientes de temperatura para estandarizar la temperatura de amplificaciones de los microsatélites marcados con fluoróforo.**

Para estandarizar la temperatura de amplificación de los microsatélites ya marcados se llevó a cabo una reacción de PCR en gradiente de 40 a 60°C usando todos los juegos de primers, y se determinó la temperatura óptima en donde se observó una sola banda cercana al tamaño reportado. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: la fase de activación de la polimerasa se llevó a 94°C por 15 minutos, la fase de desnaturalización a 95 °C por 30segundos, el alineamiento se realizó en gradiente de 40° a 60°C y se seleccionaron las siguientes temperaturas que representaban este gradiente (40, 41, 43, 46, 53, 56 y 59 °C la fase de polimerización fue a 72°C por 30 segundo y esto se llevó a cabo por 35 ciclos, posteriormente se realizó una fase de extensión final a 72°C por 3 min. (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Primers utilizados para amplificar los microsatélites elegidos en base al trabajo de Husseneder *et al.* (2017).

Locus	Repetición	Secuencia de los primers	Tamaño del producto (pb)	Ta	Tamaño del alelo (pb)
CR07	ATT	F-GCCCAATAACCCCCAGTAAT R-CAGGAAGATGCGTGTGTTTG	157	55	173 – 176
CR09	AGG	F-GCGTGTGGACAAACGATCCC R-GCTGCATACGAAGCATTGTA	148	53	159 – 165
CR15	ACT	F-AAATTAAGTGGTAGGTA R-GCTTTGTCAATCCGACCTTT	180	53	181 – 190
CR16	ACG	F-GCTAACCGGAAACGTAACGA R-TTCGCTGCTGCTGTTGTTAC	195	55	201 – 210
CR17	GAT	F-GCTTCCCGTAGAGCAATGAC R-CCAAAGGCTCCACTTCAATC	251	55	262 – 265
CR29	ACC	F-TAATGAAACTGCCCCACCAT R-ACGGTCGGATTTCCTTATTCC	240	55	256 – 259
CR37	ATT	F-CCCCATTATACTACTGACAA R-AGGAAAAGTTGCCCAAAGGT	175	53	190 – 199
CR39	CGT	F-AAAGGATATTCGCCCGATTT R-TGATTTTTGACGCGATTTGA	177	49	189 – 210

pb= pares de bases; TA= temperatura de alineamiento.

### 6.6 Amplificación del gen citocromo oxidasa (COI).

Se llevó a cabo una PCR en gradiente de 40 a 60°C para determinar la temperatura de alineamiento específica de los primers para invertebrados diseñados con base en los estudios de Folmer *et al.* (1994) (Cuadro 5). El PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones; para la activación de la polimerasa se llevó un ciclo de 95 °C durante 3 minutos, seguido de 33 ciclos; 1) desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, 2) alineamiento entre 40° y 60° durante 45 segundos; polimerización del fragmento a 72° C durante 45 segundos; seguido de una extensión final a 72° C durante 5 minutos. Estas amplificaciones se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5% y se visualizaron en fotodocumentador. Se determinó que la temperatura óptima de alineamiento era a 53°C y posteriormente se amplificaron: 15 individuos de Etúcuaro, Michoacán., 16 de Registrillo, Durango., 15 de San Juan Guelavia, Oaxaca, 6 de Tarímbaro, Michoacán, y 3 de Acuitzio del Canje, Michoacán (sin sexar). Las amplificaciones se visualizaron en geles de agarosa al 1.5%. Los productos de PCR amplificados se purificaron en columnas con Sephadex® G-25 ADN. Finalmente, las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su secuenciación.

Se llevó a cabo una PCR gradiente para determinar la temperatura de alineamiento ideal de los primers específicos para invertebrados diseñados con base en los estudios de Folmer *et al.* (1994) (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Secuencias de los *primers* utilizados para la amplificación del gen COI, de acuerdo con Folmer *et al.* (1994).

Orientación y nombre del primer	Secuencia de los primers	Tamaño de fragmento esperado (pb)
Forward LCO Primer de inicio	5'GGTCAACAAATCATAAGATATTGG3'	658
Reverse HCO Primer de término	5'TAAACTTCAGGCTGACCAAAAAATA3'	658

pb= pares de bases

### 6.6.1 Secuenciación y análisis de productos de la PCR.

Los productos de PCR amplificados se secuenciaron en el equipo “Genetic Analyzer 3500” del Laboratorio de Ecología Molecular de la Escuela Nacional de Estudios Superiores, UNAM, campus Morelia con asesoría del Dr. Jesús Llanderal Mendoza. Todas las amplificaciones se secuenciaron en ambas direcciones por el método de Sanger y Coulson (1975). Se obtuvieron 55 secuencias de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus*: 15 de Etúcuaro, Michoacán, 16 de Registrillo, Durango, 15 de San Juan Guelavia, Oaxaca, 6 de Tarímbaro, Michoacán, y 3 de Acuitzio del Canje, Michoacán. Se revisaron mediante un electroferograma, se ensamblaron y editaron en el programa MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis versión 11.0.11) (Tamura *et al.*, 2015). Este programa permite realizar análisis filogenéticos, elaborar árboles por medio de homologías entre secuencias, estimar tasas de evolución molecular y proveer hipótesis evolutivas. Además, brinda información importante sobre las secuencias introducidas para el análisis (Kumar *et al.*, 2018).

Con ayuda del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) se llevó a cabo la comparación de las secuencias. Las similitudes entre secuencias biológicas se exploraron en la base de datos del GenBank. Posteriormente, se construyó un árbol de distancias tipo UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) con el cual se estimó la historia evolutiva (Sneath y Sokal, 1973), además del método de soporte Bootstrap, el cual es una medida que proporcionan fiabilidad y robustez al árbol resuelto; este proceso se repite varias veces, siendo lo más común repetirlo 1000 veces. Al final arroja el porcentaje de veces en que cada nodo del árbol se presentó en las matrices remuestreadas. Si una rama presenta más del 50% quiere decir que ésta es fiable (Soltis y Soltis, 2003). Enseguida, se seleccionó una

secuencia conocida como referencia 1) picudo del agave (*S. acupunctatus* KU896926.1) y como grupo externo 2) picudo de la yuca (*S. yuccae* AY131110.1) disponibles en la base de datos del GenBank. El criterio de selección de las secuencias se llevó a cabo con base al gen COI. Finalmente, estas secuencias se sometieron a un alineamiento donde se agruparon dentro de *S. acupunctatus* con base al porcentaje de identidad. Una vez alineadas las secuencias se llevo a cabo un análisis de polimorfismo del ADN y divergencia entre poblaciones utilizando el programa DNA Sequence Polymorphism versión 6.12.03.

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Análisis de la variación morfológica de las poblaciones de *S. acupunctatus*.

#### 7.1.1 Morfometría clásica.

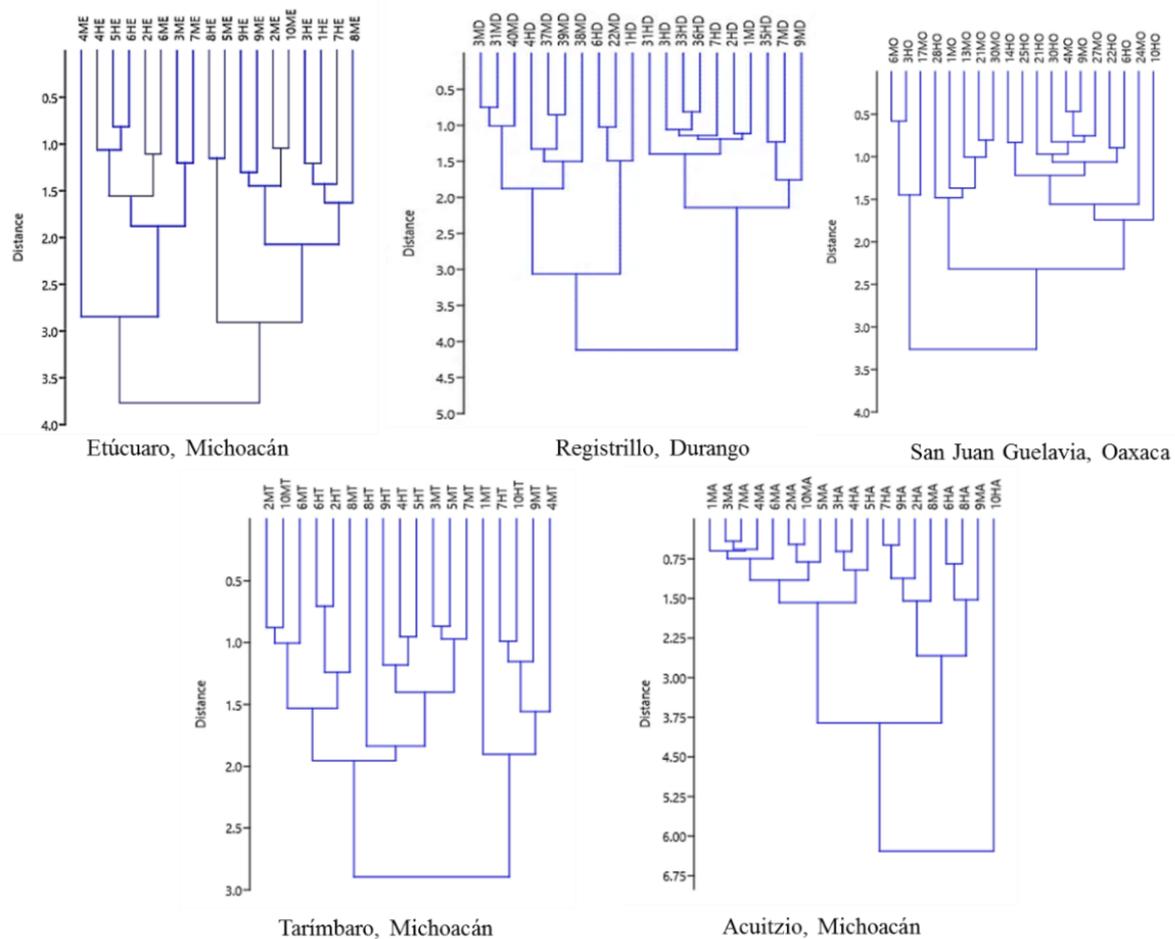
Los promedios de la medición de cada caracter morfológico para cada sexo y localidad de las poblaciones de *S. acupunctatus* se concentraron en el Cuadro 6. El AC de la matriz de datos de los 34 caracteres medidos para cada población reveló que no existe agrupación por sexo en ninguna de las poblaciones estudiadas (Figura 11). Así mismo, los diagramas de dispersión realizados con los 34 caracteres de solo machos, solo hembras y la de ambos sexos de las cinco poblaciones confirman que no existe agrupación por sexo (Figura 12).

**Cuadro 6.** Promedio (mm  $\pm$  EE, error estándar) de mediciones de 34 caracteres morfométricos en individuos de ambos sexos de cinco poblaciones de *S. acupunctatus*.

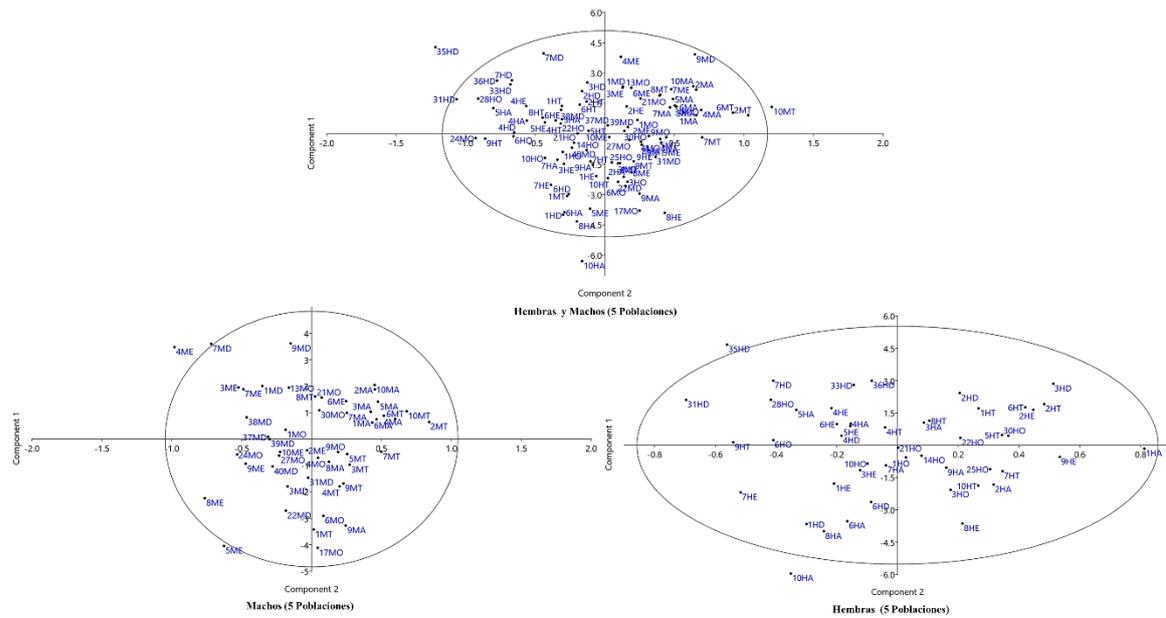
*	Etúcuaro ( E )		Registrillo ( D )		San Juan Guelavia ( O )		Tarímbaro ( T )		Acuitzio del Canje ( A )	
	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M
1	1.3 $\pm$ 0.13	1.1 $\pm$ 0.05	1.42 $\pm$ 0.04	1.26 $\pm$ 0.03	1.26 $\pm$ 0.03	1.21 $\pm$ 0.03	1.33 $\pm$ 0.03	1.24 $\pm$ 0.04	1.26 $\pm$ 0.06	1.22 $\pm$ 0.02
2	0.47 $\pm$ 0.01	0.47 $\pm$ 0.02	0.49 $\pm$ 0.02	0.49 $\pm$ 0.01	0.47 $\pm$ 0.01	0.49 $\pm$ 0.02	0.51 $\pm$ 0.01	0.5 $\pm$ 0.009	0.44 $\pm$ 0.01	0.48 $\pm$ 0.01
3	1.48 $\pm$ 0.04	1.55 $\pm$ 0.05	1.57 $\pm$ 0.06	1.55 $\pm$ 0.04	1.49 $\pm$ 0.02	1.56 $\pm$ 0.04	1.53 $\pm$ 0.02	1.42 $\pm$ 0.14	1.39 $\pm$ 0.05	1.64 $\pm$ 0.05
4	1.41 $\pm$ 0.03	1.43 $\pm$ 0.05	1.43 $\pm$ 0.05	1.4 $\pm$ 0.09	1.39 $\pm$ 0.07	1.45 $\pm$ 0.05	1.42 $\pm$ 0.04	1.41 $\pm$ 0.05	1.23 $\pm$ 0.04	1.48 $\pm$ 0.03
5	0.53 $\pm$ 0.02	0.55 $\pm$ 0.01	0.57 $\pm$ 0.02	0.55 $\pm$ 0.01	0.54 $\pm$ 0.01	0.56 $\pm$ 0.01	0.58 $\pm$ 0.01	0.61 $\pm$ 0.01	0.53 $\pm$ 0.01	0.57 $\pm$ 0.01
6	0.37 $\pm$ 0.02	0.37 $\pm$ 0.01	0.36 $\pm$ 0.01	0.39 $\pm$ 0.01	0.33 $\pm$ 0.006	0.35 $\pm$ 0.02	0.36 $\pm$ 0.01	0.34 $\pm$ 0.01	0.31 $\pm$ 0.01	0.36 $\pm$ 0.02
7	0.18 $\pm$ 0.009	0.18 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.01	0.19 $\pm$ 0.009	0.18 $\pm$ 0.008	0.17 $\pm$ 0.009	0.17 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.006	0.16 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.01
8	0.37 $\pm$ 0.02	0.28 $\pm$ 0.03	0.60 $\pm$ 0.02	0.39 $\pm$ 0.02	0.44 $\pm$ 0.3	0.46 $\pm$ 0.02	0.72 $\pm$ 0.05	0.57 $\pm$ 0.04	0.59 $\pm$ 0.03	0.47 $\pm$ 0.02
9	1.09 $\pm$ 0.02	1.17 $\pm$ 0.04	1.24 $\pm$ 0.03	1.25 $\pm$ 0.04	1.08 $\pm$ 0.01	1.17 $\pm$ 0.03	1.11 $\pm$ 0.02	1.14 $\pm$ 0.03	1 $\pm$ 0.03	1.19 $\pm$ 0.02
10	14.65 $\pm$ 0.42	15.12 $\pm$ 0.48	16.10 $\pm$ 0.57	15.35 $\pm$ 0.45	14.83 $\pm$ 0.27	14.81 $\pm$ 0.37	15.3 $\pm$ 0.3	14.52 $\pm$ 0.23	14.08 $\pm$ 0.52	15.22 $\pm$ 0.29
11	0.56 $\pm$ 0.03	0.65 $\pm$ 0.02	0.62 $\pm$ 0.02	0.61 $\pm$ 0.02	0.59 $\pm$ 0.02	0.63 $\pm$ 0.02	0.66 $\pm$ 0.02	0.67 $\pm$ 0.02	0.59 $\pm$ 0.02	0.68 $\pm$ 0.02
12	0.34 $\pm$ 0.01	0.42 $\pm$ 0.03	0.4 $\pm$ 0.01	0.35 $\pm$ 0.01	0.35 $\pm$ 0.01	0.38 $\pm$ 0.01	0.37 $\pm$ 0	0.39 $\pm$ 0.01	0.35 $\pm$ 0.01	0.35 $\pm$ 0.01
13	0.96 $\pm$ 0.06	0.95 $\pm$ 0.05	0.91 $\pm$ 0.03	0.89 $\pm$ 0.02	1 $\pm$ 0.02	0.97 $\pm$ 0.03	1.02 $\pm$ 0.02	0.97 $\pm$ 0.03	0.93 $\pm$ 0.03	1.06 $\pm$ 0.02
14	1.45 $\pm$ 0.06	1.49 $\pm$ 0.06	1.55 $\pm$ 0.08	1.58 $\pm$ 0.05	1.47 $\pm$ 0.01	1.46 $\pm$ 0.03	1.56 $\pm$ 0.03	1.53 $\pm$ 0.04	1.37 $\pm$ 0.05	1.5 $\pm$ 0.02
15	0.74 $\pm$ 0.02	0.74 $\pm$ 0.03	0.90 $\pm$ 0.04	0.85 $\pm$ 0.04	0.81 $\pm$ 0.02	0.76 $\pm$ 0.02	0.87 $\pm$ 0.04	0.78 $\pm$ 0.03	0.71 $\pm$ 0.02	0.76 $\pm$ 0.03
16	0.84 $\pm$ 0.06	0.84 $\pm$ 0.06	1.03 $\pm$ 0.05	0.97 $\pm$ 0.03	0.93 $\pm$ 0.02	0.93 $\pm$ 0.04	0.9 $\pm$ 0.03	0.89 $\pm$ 0.02	0.85 $\pm$ 0.03	0.89 $\pm$ 0.02
17	0.43 $\pm$ 0.02	0.45 $\pm$ 0.07	0.44 $\pm$ 0.01	0.41 $\pm$ 0.01	0.43 $\pm$ 0.01	0.38 $\pm$ 0.01	0.47 $\pm$ 0.02	0.47 $\pm$ 0.02	0.42 $\pm$ 0.01	0.44 $\pm$ 0.01
18	3.41 $\pm$ 0.12	3.74 $\pm$ 0.19	3.70 $\pm$ 0.14	3.63 $\pm$ 0.12	3.47 $\pm$ 0.07	3.49 $\pm$ 0.12	3.59 $\pm$ 0.08	3.49 $\pm$ 0.08	3.19 $\pm$ 0.13	3.39 $\pm$ 0.04
19	0.88 $\pm$ 0.04	0.97 $\pm$ 0.04	1.01 $\pm$ 0.04	0.98 $\pm$ 0.02	0.96 $\pm$ 0.01	0.95 $\pm$ 0.02	1.19 $\pm$ 0.02	1.07 $\pm$ 0.03	1.06 $\pm$ 0.04	1.07 $\pm$ 0.02
20	5.79 $\pm$ 0.15	6.18 $\pm$ 0.24	6.14 $\pm$ 0.24	6.2 $\pm$ 0.23	5.7 $\pm$ 0.09	6.01 $\pm$ 0.17	5.88 $\pm$ 0.13	6.17 $\pm$ 0.18	5.4 $\pm$ 0.23	6.48 $\pm$ 0.18
21	4.87 $\pm$ 0.15	5.29 $\pm$ 0.25	5.18 $\pm$ 0.19	5.27 $\pm$ 0.19	4.86 $\pm$ 0.05	5.14 $\pm$ 0.16	5.07 $\pm$ 0.13	5.25 $\pm$ 0.15	4.6 $\pm$ 0.2	5.55 $\pm$ 0.17
22	7.12 $\pm$ 0.21	7.69 $\pm$ 0.27	7.76 $\pm$ 0.29	7.85 $\pm$ 0.22	7.32 $\pm$ 0.11	7.48 $\pm$ 0.22	7.58 $\pm$ 0.17	7.49 $\pm$ 0.2	6.85 $\pm$ 0.26	7.99 $\pm$ 0.18
23	5.17 $\pm$ 0.15	5.58 $\pm$ 0.21	5.69 $\pm$ 0.20	5.57 $\pm$ 0.16	5.26 $\pm$ 0.1	5.45 $\pm$ 0.16	5.58 $\pm$ 0.1	5.55 $\pm$ 0.16	5.08 $\pm$ 0.19	5.9 $\pm$ 0.13
24	4.7 $\pm$ 0.16	4.95 $\pm$ 0.19	5.14 $\pm$ 0.17	5 $\pm$ 0.18	4.9 $\pm$ 0.08	4.94 $\pm$ 0.14	5.05 $\pm$ 0.09	4.98 $\pm$ 0.13	4.52 $\pm$ 0.18	5.2 $\pm$ 0.13
25	3.53 $\pm$ 0.14	3.67 $\pm$ 0.15	4.19 $\pm$ 0.15	3.96 $\pm$ 0.12	3.69 $\pm$ 0.06	3.75 $\pm$ 0.13	3.86 $\pm$ 0.1	3.8 $\pm$ 0.09	3.58 $\pm$ 0.15	4.01 $\pm$ 0.09
26	2.6 $\pm$ 0.07	2.72 $\pm$ 0.09	2.78 $\pm$ 0.10	2.79 $\pm$ 0.08	2.53 $\pm$ 0.06	2.71 $\pm$ 0.07	2.62 $\pm$ 0.07	2.79 $\pm$ 0.07	2.37 $\pm$ 0.09	2.73 $\pm$ 0.06
27	2.5 $\pm$ 0.07	2.73 $\pm$ 0.11	2.61 $\pm$ 0.09	2.64 $\pm$ 0.08	2.43 $\pm$ 0.06	2.6 $\pm$ 0.06	2.57 $\pm$ 0.09	2.62 $\pm$ 0.07	2.33 $\pm$ 0.09	2.66 $\pm$ 0.06
28	2.8 $\pm$ 0.07	2.97 $\pm$ 0.10	2.95 $\pm$ 0.10	3.05 $\pm$ 0.10	2.78 $\pm$ 0.07	2.96 $\pm$ 0.09	2.88 $\pm$ 0.07	3.05 $\pm$ 0.05	2.71 $\pm$ 0.09	3 $\pm$ 0.06
29	3.1 $\pm$ 0.09	3.39 $\pm$ 0.11	3.43 $\pm$ 0.11	3.53 $\pm$ 0.11	3.22 $\pm$ 0.08	3.44 $\pm$ 0.1	3.31 $\pm$ 0.08	3.39 $\pm$ 0.11	3.12 $\pm$ 0.12	3.46 $\pm$ 0.11
30	2.24 $\pm$ 0.05	2.63 $\pm$ 0.12	2.41 $\pm$ 0.09	2.44 $\pm$ 0.07	2.28 $\pm$ 0.03	2.31 $\pm$ 0.06	2.21 $\pm$ 0.06	2.14 $\pm$ 0.05	2.02 $\pm$ 0.02	2.22 $\pm$ 0.05

31	0.89 ± 0.02	1.03 ± 0.06	1.02 ± 0.04	0.99 ± 0.04	0.91 ± 0.01	0.9 ± 0.02	0.94 ± 0.01	0.98 ± 0.01	0.95 ± 0.017	0.97 ± 0.02
32	2.11 ± 0.08	2.47 ± 0.10	2.37 ± 0.09	2.36 ± 0.06	2.15 ± 0.04	2.18 ± 0.07	2.01 ± 0.04	1.99 ± 0.05	1.96 ± 0.02	2.14 ± 0.06
33	0.87 ± 0.03	1.05 ± 0.05	1.03 ± 0.03	1 ± 0.03	0.92 ± 0.01	0.95 ± 0.02	0.94 ± 0.03	0.93 ± 0.02	0.91 ± 0.01	0.93 ± 0.02
34	3.74 ± 0.16	3.84 ± 0.16	3.77 ± 0.15	3.82 ± 0.15	3.59 ± 0.05	3.69 ± 0.11	3.65 ± 0.08	3.78 ± 0.1	3.32 ± 0.13	3.97 ± 0.12

\* Número del caracter según lo mencionado en la metodología.



**Figura 11.** Análisis clúster de machos y hembras de cada población de *S. acupunctatus* con 34 caracteres. M=macho, H=hembra. Correlación cofenética de Etúcuaro (E), Registrillo (D), San Juan Guelavia (O), Tarímbaro (T) y Acuitzio del Canje (A): 0.646, 0.678, 0.755, 0.7381 y 0.8292, respectivamente. Ejemplo, 4ME=individuo 4, macho, Etúcuaro. Distance= Distancia.



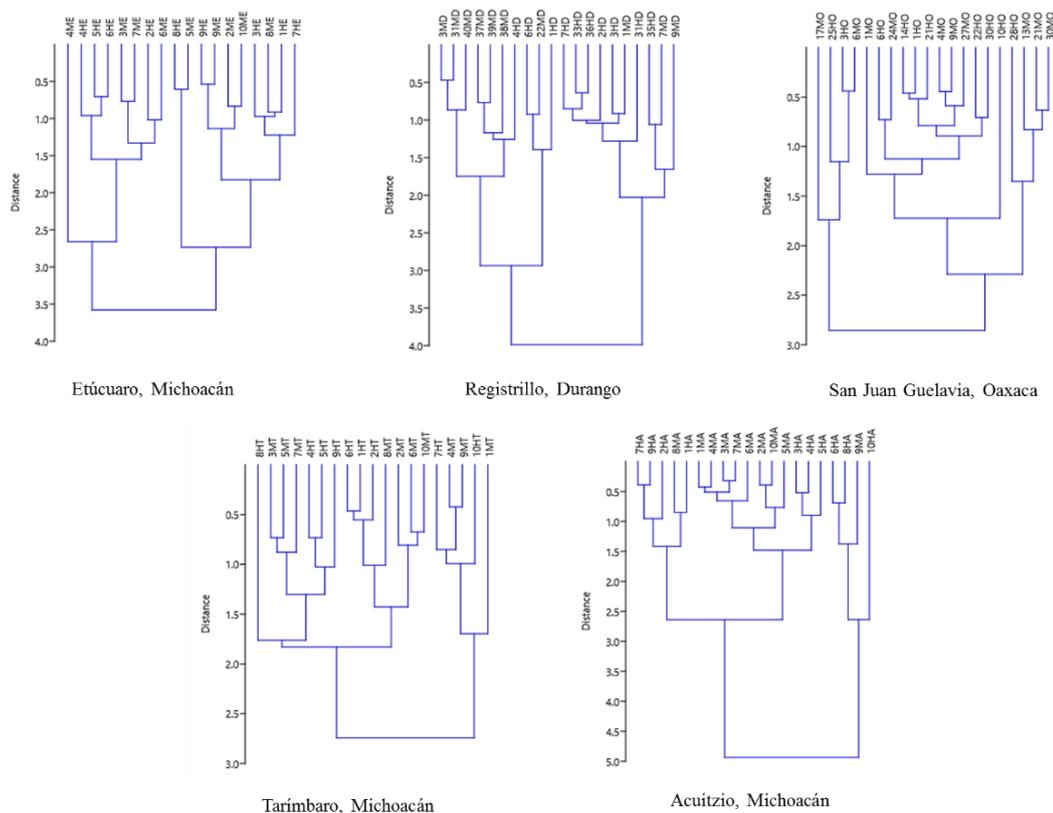
**Figura 12.** Diagramas de dispersión de hembras-machos, solo machos y solo hembras de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus* con 34 caracteres. Cada elipse representa el 95% de confianza para los valores ponderados de las poblaciones estudiadas (M=macho, H=hembra; individuos: E=Etúcuaro, D= Registrillo, O=San Juan Guelavia, T=Tarímbaro y A=Acuitzio del Canje). Ejemplo, 4ME=individuo 4, macho, Etúcuaro.

Por otro lado, el ACP mostró que los primeros dos componentes principales explicaron el 89.33% de la varianza total, en los cuales se seleccionaron 10 caracteres informativos (Cuadro 7). El componente principal 1 (PC1) tuvo un eigenvalue (valor propio) de 4.15, el cual explicó el 84.87% de la variación total, para las cinco poblaciones de *S. acupunctatus*. En este componente las variables longitud del cuerpo y longitud de los élitros fueron los que tuvieron los coeficientes más altos en comparación con los demás caracteres morfométricos (Cuadro 7). Por su parte, el componente principal 2 (PC2) tuvo un eigenvalue de 0.21, el cual explicó el 4.46% de la variación total. En este caso, aunque con este componente se indicó una varianza baja, la amplitud y longitud de pronoto tuvieron los más altos valores.

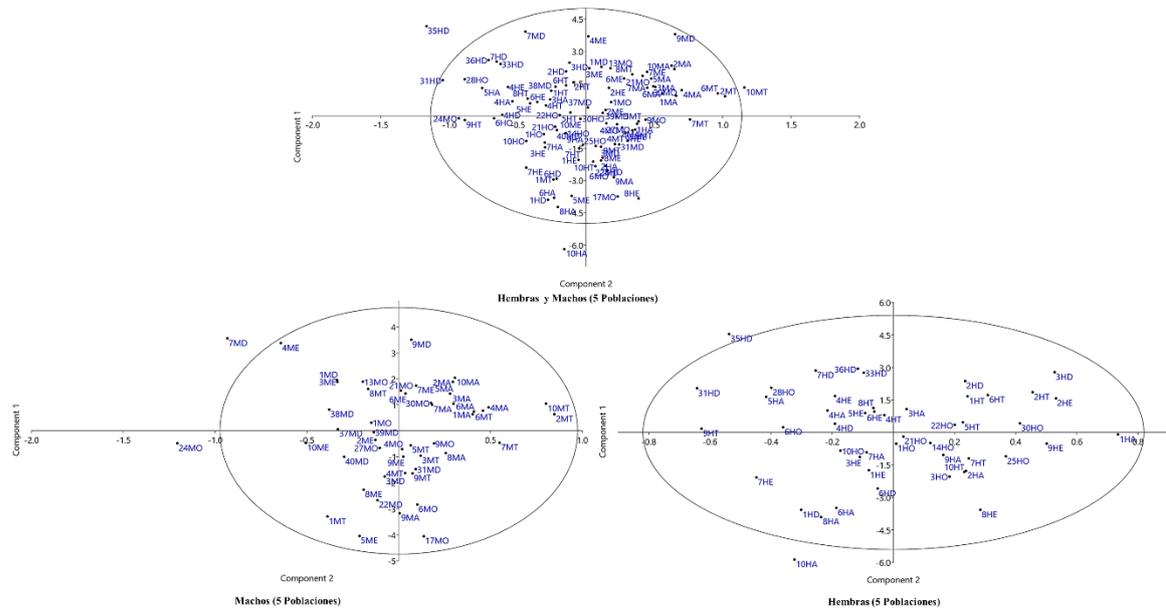
**Cuadro 7.** Contribución y proporción de la varianza de 10 caracteres con relación a los componentes principales. Entre paréntesis, el número del carácter respectivo en el análisis.

	Caracteres	Contribución	Proporción de la varianza	
			%	Acumulada
	Longitud del cuerpo (10)	0.63		
	Longitud del élitro (22)	0.34		
	Amplitud máxima del élitro (23)	0.25		
CP1	Amplitud de la base del élitro (24)	0.22	84.87	84.87
	Amplitud del ápice del élitro (25)	0.17		
	Longitud del metepisterno (18)	0.17		
	Longitud de la tibia anterior (26)	0.11		
CP2	Amplitud del pronoto (21)	0.33		
	Longitud del pronoto (20)	0.32	4.46	89.33
	Altura del tórax (34)	0.20		

Las figuras 13 y 14, que representan el AC y diagramas de dispersión de individuos de las matrices de datos de las cinco poblaciones con 10 variables informativas, respectivamente, muestran que tampoco existe agrupación por sexo en ninguna de las cinco poblaciones.



**Figura 13.** Análisis clúster de machos y hembras de cada población de *S. acupunctatus* con 10 caracteres. M=macho, H=hembra. Correlación cofenética de Etúcuaro (E), Registrillo (D), San Juan Guelavia (O), Tarímbaro (T) y Acuitzio del Canje (A): 0.659, 0.683, 0.718, 0.723 y 0.827, respectivamente. Ejem. 4ME=individuo 4, macho, Etúcuaro. Distance= Distancia.



**Figura 14.** Diagramas de dispersión de hembras-machos, solo machos y solo hembras de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus* con 10 caracteres. Elipses representan el 95% de confianza para los valores ponderados de las poblaciones estudiadas (M=macho, H=hembra; individuos: E=Etúcuaro, D= Registrillo, O=San Juan Guelavia, T=Tarímbaro y A=Acuitzio del Canje). Ejem. 4ME=individuo 4, macho, Etúcuaro

El cuadro 8 muestra los ANOVAs de los 10 caracteres informativos, seleccionados a través del ACP, la comparación se hizo entre hembras y entre hembras-machos de las cinco poblaciones. No se encontró diferencias significativas en la comparación entre machos de las cinco poblaciones. En los ANOVAs de las comparaciones entre solo hembras, los promedios de longitud del cuerpo (10), metepisterno (18), élitro (22) y tibia anterior (26), así como de los promedios de amplitud de la base del élitro (24) y del ápice del élitro (25) fueron estadísticamente diferentes. En todos los casos, los promedios registrados para cada caracter de las hembras de Registrillo fueron significativamente más grande que los valores de las hembras de Acuitzio del Canje. En ese mismo sentido, los ANOVAs de las comparaciones entre hembras-machos, los promedios de la longitud del pronoto (20) y élitro (22), amplitud del pronoto (21) y del élitro (23) fueron significativamente diferentes entre hembras y machos de la población de Acuitzio del Canje, siendo los machos significativamente más grandes que las hembras. Por otra parte, los ANOVAs de las comparaciones entre hembras de las poblaciones de Registrillo y Acuitzio del Canje (según comparaciones machos-hembras), especialmente del caracter amplitud del ápice del élitro (25), los promedios mostraron diferencias significativas, en este caso las hembras de Registrillo tuvieron los valores más grandes que las hembras de Acuitzio del Canje. Finalmente, solo se encontraron diferencias significativas en los promedios de amplitud del ápice del élitro (25), entre los valores de las

hembras de Registrillo y Etúcuaro, en este último caso los valores de las hembras de Registrillo fueron más altos que los de Etúcuaro (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** ANOVAs para 10 caracteres morfométricos entre hembras, machos y hembras-machos de cinco poblaciones de *S. acupunctatus*. NDS= No diferencias significativas.

No. De caracter morfológico	Hembras	Machos	Machos – Hembras
10	Registrillo (16.1) vs. Acuitzio del Canje (14) <i>P</i> (0.01) ( <i>F</i> = 3.03 <i>GL</i> = 4, 43 <i>P</i> = 0.02)		H Registrillo (16.1) vs. H Acuitzio del Canje (14) <i>P</i> (0.02) ( <i>F</i> = 1.86 <i>GL</i> = 9, 87 <i>P</i> = 0.06)
18	Registrillo (3.7) vs. Acuitzio del Canje (3.2) <i>P</i> (0.02) ( <i>F</i> = 2.82 <i>GL</i> = 4, 43 <i>P</i> = 0.03)		NDS
20	Registrillo (6.15) vs. Acuitzio del Canje (5.4) <i>P</i> (0.04) ( <i>F</i> = 2.18 <i>GL</i> = 4, 43 <i>P</i> = 0.08)		H Acuitzio del Canje (5.4) vs. M Acuitzio del Canje (6.48) <i>P</i> (0.005) ( <i>F</i> = 2.52 <i>GL</i> = 9, 87 <i>P</i> = 0.01)
21	NDS		H Acuitzio del Canje (4.6) vs. M Acuitzio del Canje (5.55) <i>P</i> (0.006) ( <i>F</i> = 2.42 <i>GL</i> = 9, 87 <i>P</i> = 0.01)
22	Registrillo (7.7) vs. Acuitzio del Canje (6.8) <i>P</i> (0.04) ( <i>F</i> = 2.61 <i>GL</i> = 4, 43 <i>P</i> = 0.04)		H Acuitzio del Canje (6.85) vs. M Acuitzio del Canje (6.99) <i>P</i> (0.01) ( <i>F</i> = 2.38 <i>GL</i> = 9, 87 <i>P</i> = 0.01)
23	NDS	NDS	H Acuitzio del Canje (5.08) vs. M Acuitzio del Canje (5.9) <i>P</i> (0.01) ( <i>F</i> = 2.32 <i>GL</i> = 9, 87 <i>P</i> = 0.02)
24	Registrillo (5.15) vs. Acuitzio del Canje (4.52) <i>P</i> (0.03) ( <i>F</i> = 2.95 <i>GL</i> = 4, 43 <i>P</i> = 0.03)		NDS
25	Registrillo (4.19) vs. Acuitzio del Canje (3.58) <i>P</i> (0.01) ( <i>F</i> = 4.32 <i>GL</i> = 4, 43 <i>P</i> = 0.004)		H Registrillo (4.19) vs. H Acuitzio del Canje (3.58) <i>P</i> (0.02) ( <i>F</i> = 2.73 <i>GL</i> = 9, 87 <i>P</i> = 0.007)
	Registrillo (4.19) vs. Etúcuaro (3.53) <i>P</i> (0.007) ( <i>F</i> = 4.32 <i>GL</i> = 4, 43 <i>P</i> = 0.004)		H Registrillo (4.19) vs. H Etúcuaro (3.53) <i>P</i> (0.01) ( <i>F</i> = 2.73 <i>GL</i> = 9, 87 <i>P</i> = 0.007)
26	Registrillo (2.78) vs. Acuitzio del Canje (2.44) <i>P</i> (0.03) ( <i>F</i> = 2.46 <i>GL</i> = 4, 42 <i>P</i> = 0.05);		NDS
34	NDS		H Acuitzio del Canje 3.32 vs. M Acuitzio del Canje 3.97 <i>P</i> (0.02) ( <i>F</i> = 1.81 <i>GL</i> =9, 88 <i>P</i> = 0.07)

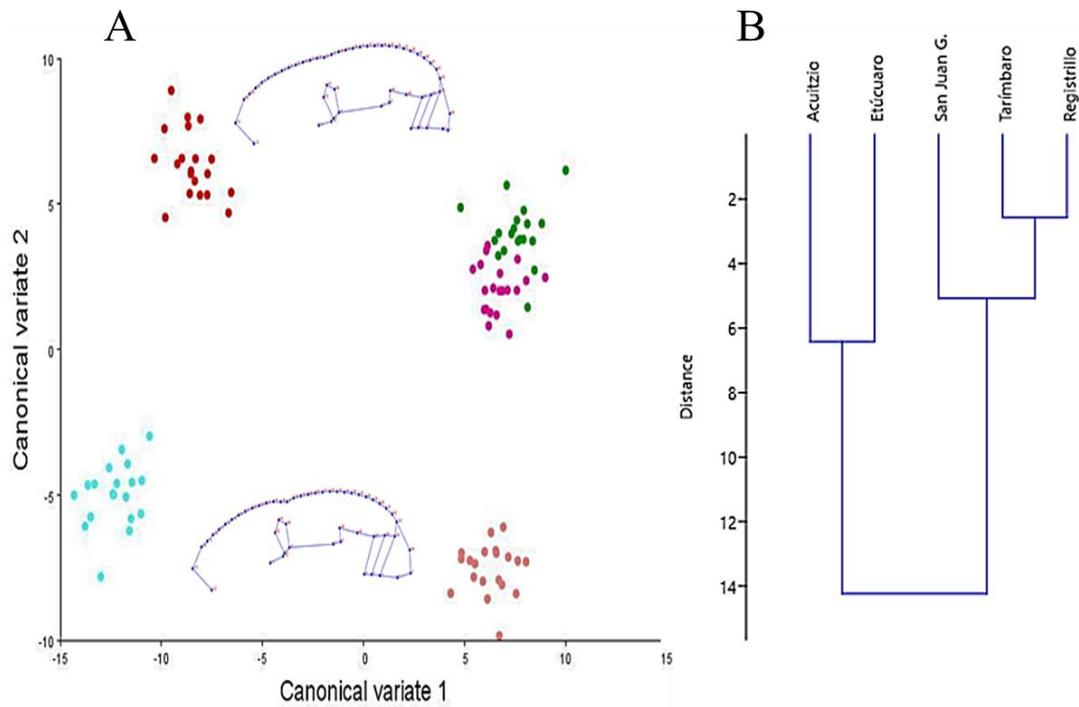
## **7.2 Morfometría geométrica.**

Los resultados de AVC y Procrustes ANOVA de las estructuras evaluadas mostraron que la vista lateral del cuerpo y la vista dorsal del pronoto son útiles para separar a los individuos de *S. acupunctatus* por población y sexo. Similarmente, el terguito VIII y el lóbulo medio de la genitalia del macho sirve para separar las poblaciones de este insecto.

### **7.2.1 Vista lateral del cuerpo.**

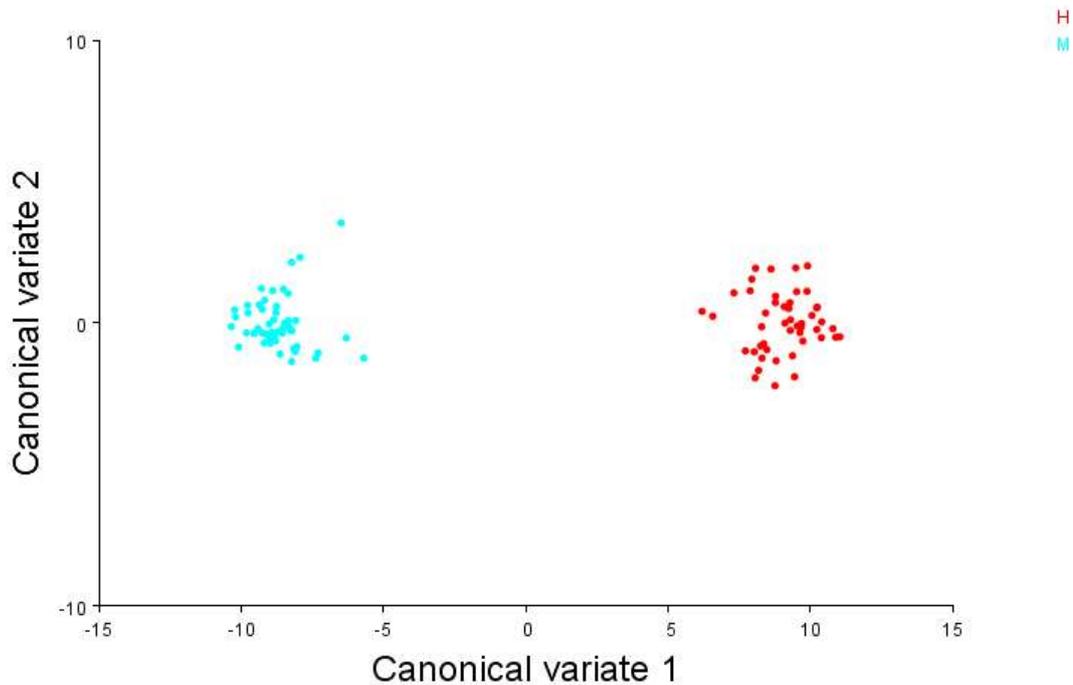
El AVC de la vista lateral del cuerpo de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus*, sin diferenciar machos y hembras, mostró una sola agrupación entre las poblaciones de Tarímbaro-Registrillo, misma que se separa de las poblaciones de Acuitzio del Canje, Etúcuaro y San Juan Guelavia. La variable canónica 1 (VC1), el cual explica el 53.68% de la variación, separa la agrupación Tarímbaro-Registrillo de las poblaciones de Acuitzio del Canje y Etúcuaro, mientras que la variable canónica 2 (VC2), que explica el 21.28% de la variación, separa a las poblaciones Tarímbaro-Registrillo de Etúcuaro y San Juan Guelavia (Figura 15a).

El análisis clúster de las cinco poblaciones, basado en las distancias de Mahalanobis, muestra que las poblaciones de Acuitzio del Canje y Etúcuaro son diferentes al resto de las poblaciones. También indica que los individuos pertenecientes a las poblaciones de Registrillo y Tarímbaro están relacionados entre sí, y que la población de San Juan Guelavia es una población con más afinidad a la agrupación Tarímbaro-Registrillo que de Acuitzio del Canje y Etúcuaro (Figura 15b).



**Figura 15.** A) Análisis de variación canónica de la vista lateral del cuerpo de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus*. Las imágenes en azul representan las formas representativas de cada variable canónica. Las poblaciones están diferenciadas por colores: Acuitzio del Canje (rojo), Registrillo (verde), Etúcuaro (celeste), San Juan Guelavia (naranja) y Tarímbaro (rosa). B) Análisis clúster de las distancias de Mahalanobis entre poblaciones de *S. acupunctatus*. Correlación cofenética: 0.9609. Distance= Distancia.

Por otra parte, el AVC por sexo mostró dos agrupaciones (Figura 16). La VC1, la cual explica el 100% de la variación, separa los machos de las hembras de las cinco poblaciones. El Procrustes ANOVA confirmó, al encontrar diferencias significativas, que la vista lateral del cuerpo agrupa a los individuos de *S. acupunctatus* por población ( $F = 4.87$ ,  $gl = 400$ ,  $P < 0.0001$ ) y sexo ( $F = 31.73$ ,  $gl = 100$ ,  $P < 0.0001$ ). También se encontraron diferencias significativas en la interacción población y sexo ( $F = 1.38$ ,  $gl = 400$ ,  $P < 0.0001$ ) para la forma lateral del cuerpo de *S. acupunctatus*.

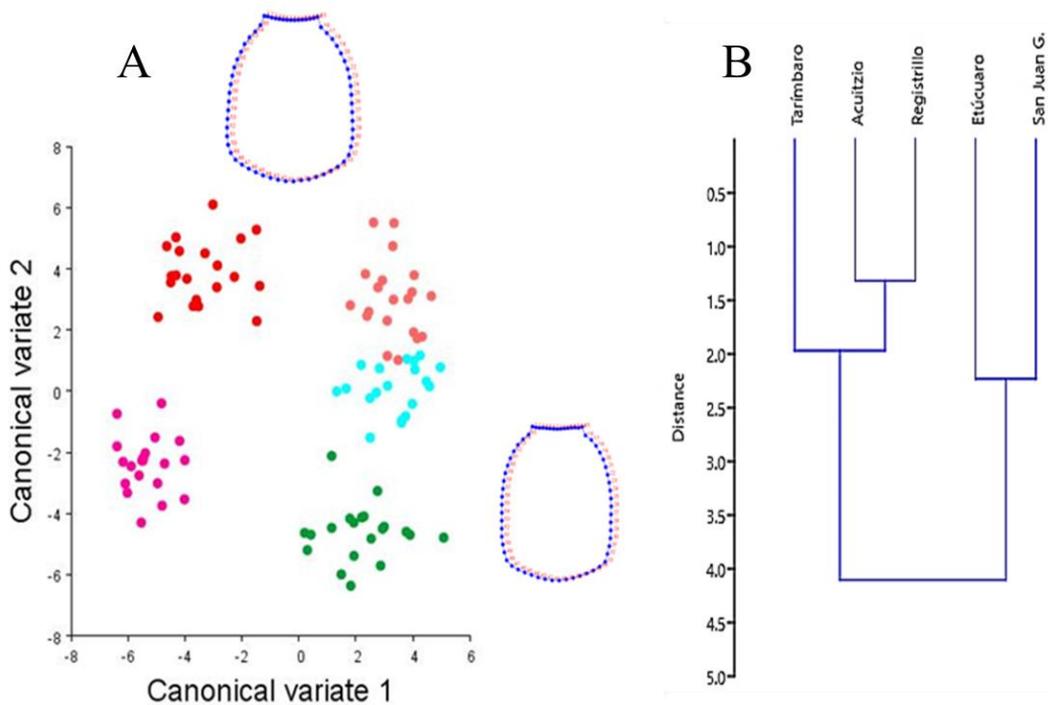


**Figura 16.** Análisis de variación canónica entre sexos de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus*. Los sexos se encuentran diferenciados por colores: Machos (azul) y Hembras (rojo).

### 7.2.2 Pronoto.

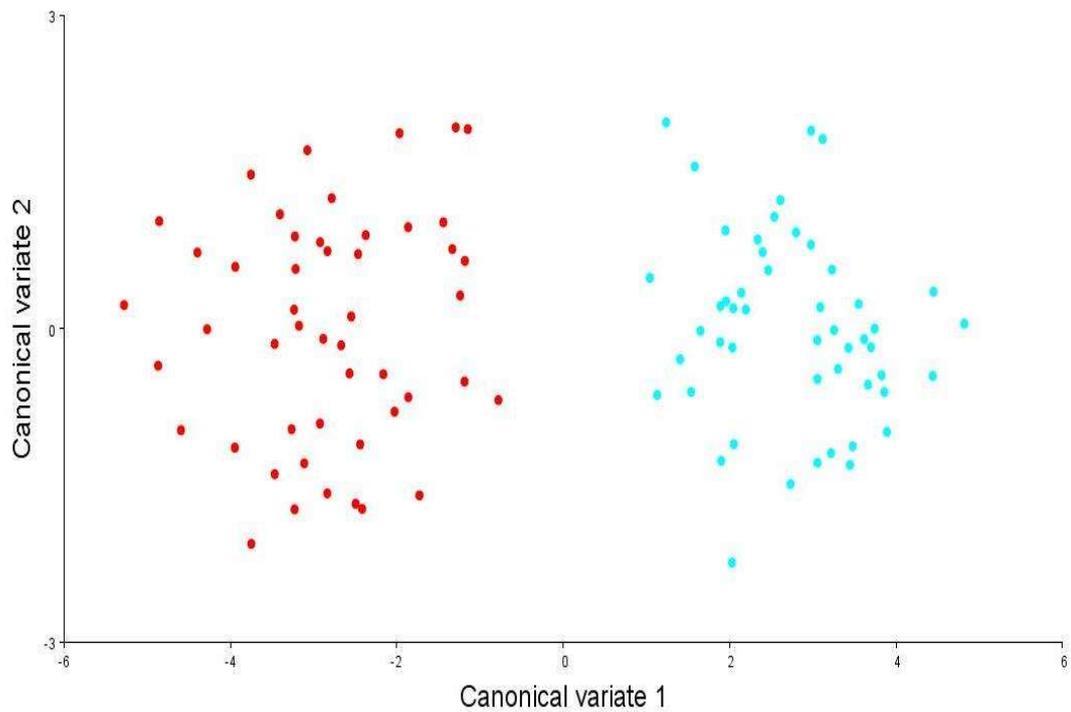
El AVC de la forma del pronoto de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus*, sin diferenciar machos y/o hembras, muestra la separación entre las cinco poblaciones. La VC1, el cual explica el 37.31% de la variación, señala la cercanía entre las poblaciones de San Juan Guelavia y Etúcuaro, mismas que se separan de Acuitzio del Canje y Tarímbaro. Por su parte, la VC2, el cual explica el 29.12% de la variación, señala también la cercanía entre San Juan Guelavia y Etúcuaro, pero muestra la separación con las poblaciones de Tarímbaro y Registrillo (Figura 17a).

El análisis clúster de las cinco poblaciones, basado en las distancias de Mahalanobis, muestra que las poblaciones de Acuitzio del Canje y Registrillo son muy diferentes al resto de las poblaciones. También indica que los individuos pertenecientes a las poblaciones de San Juan Guelavia y Etúcuaro están relacionados entre sí, y que la población de Tarímbaro es una población con más afinidad a la agrupación Acuitzio del Canje-Registrillo que de Etúcuaro-San Juan Guelavia (Figura 17b).



**Figura 17.** A) Análisis de variación canónica de la forma del pronoto de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus*. Las imágenes en azul representan las formas representativas de cada variable canónica. Las poblaciones están diferenciadas por colores: Acuitzio del Canje (rojo), Registrillo (verde), Etúcuaro (azul), San Juan Guelavia (naranja) y Tarímbaro (rosa). B) Análisis clúster de las distancias de Mahalanobis de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus*. Correlación cofenética: 0.771. Distance= Distancia.

Por otra parte, el AVC por sexo también mostró dos agrupaciones bien definidas. La VC1, la cual explica el 100% de la variación, separa a los machos de las hembras de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus* (Figura 18). El Procrustes ANOVA confirmó, al encontrar diferencias significativas, que la forma del pronoto agrupa por poblaciones ( $F = 5.3$ ,  $gl = 504$ ,  $P < 0.0001$ ) y por sexo ( $F = 12.21$ ,  $gl = 126$ ,  $P < 0.0001$ ) de *S. acupunctatus*. En este caso, no se encontró diferencias significativas en la interacción población y sexo ( $F = 0.58$ ,  $gl = 504$ ,  $P > 0.05$ ) para la forma del pronoto de *S. acupunctatus*.

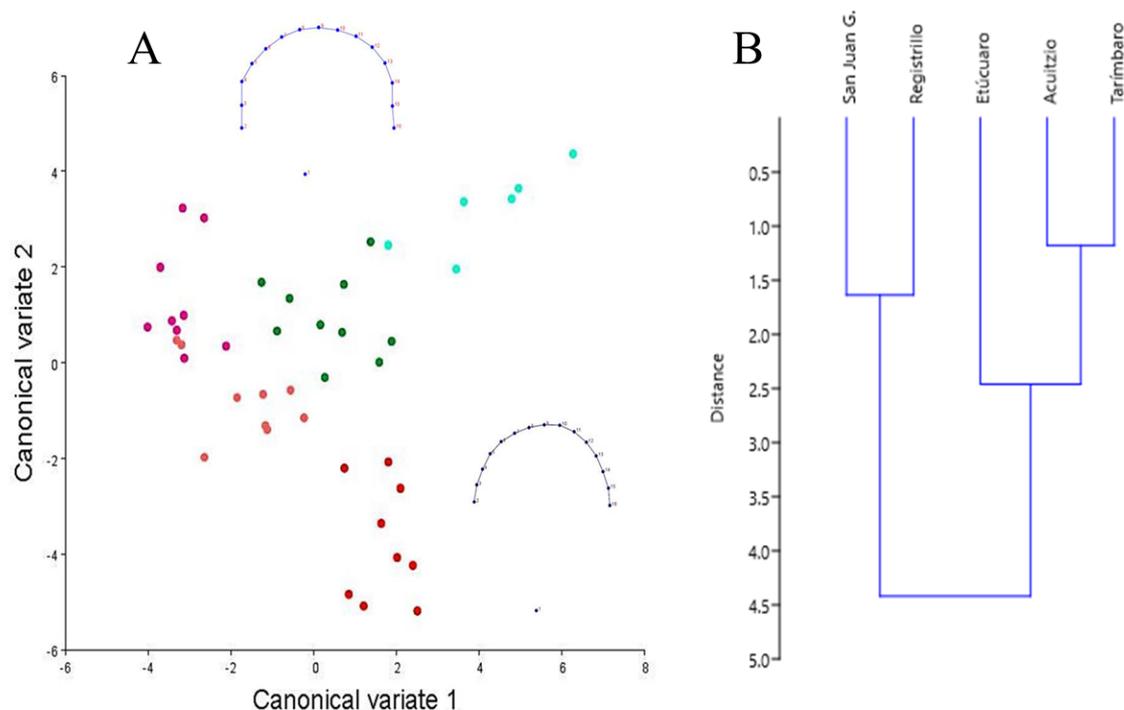


**Figura 18.** Análisis de variación canónica entre sexos de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus*. Los sexos se encuentran diferenciados por colores: machos (azul) y hembras (rojo).

### 7.2.3 Terguito VIII.

El AVC de la forma del terguito VIII de la genitalia de los machos de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus* muestra la separación entre poblaciones. La VC1, el cual explica el 40% de la variación, muestra la agrupación San Juan Guelavia-Tarímbaro-Registrillo, misma que se separa de la población de Etúcuaro. Por su parte, la VC2, el cual explica el 35% de la variación, indica la separación de la agrupación San Juan Guelavia-Tarímbaro-Registrillo con la población de Acuitzio del Canje (Figura 19a).

El análisis clúster de las cinco poblaciones, basado en las distancias de Mahalanobis, muestra que las poblaciones de Acuitzio del Canje y Tarímbaro son muy diferentes al resto de las poblaciones. También indica que los individuos pertenecientes a las poblaciones de San Juan Guelavia y Registrillo están relacionados entre sí, y que la población de Etúcuaro es una población con más afinidad a la agrupación Acuitzio del Canje-Tarímbaro que de San Juan Guelavia- Registrillo (Figura 19b). El ANOVA Procrustes confirmó, al encontrar diferencias significativas ( $F = 4.99$ ,  $gl = 112$ ,  $P < 0,0001$ ), que el terguito VIII agrupa por poblaciones a los individuos de *S. acupunctatus*.

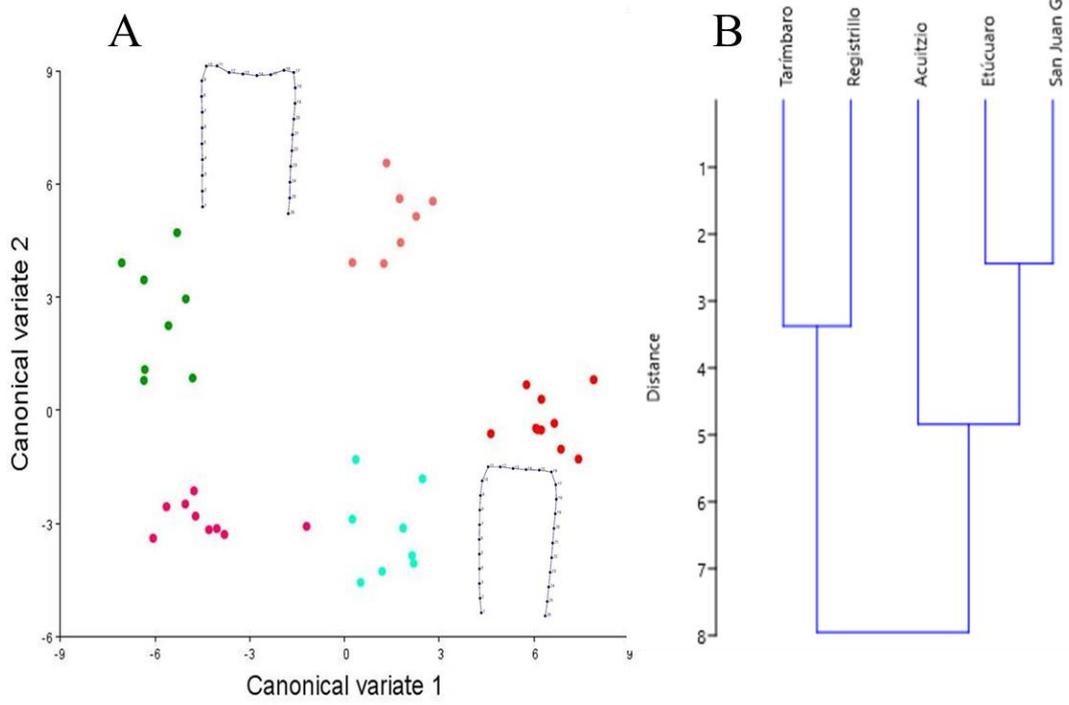


**Figura 19.** A) Análisis de variación canónica de la forma del terguito VIII de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus*. Las imágenes en azul representan las formas representativas de cada variable canónica. Las poblaciones están diferenciadas por colores: Acuitzio del Canje (rojo), Registrillo (verde), Etúcuaro (azul), San Juan Guelavia (naranja) y Tarímbaro (rosa). B) Análisis clúster de las distancias de Mahalanobis de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus*. Correlación cofenética: 0.5434. Distance= Distancia.

#### 7.2.4 Lóbulo medio.

El AVC de la forma del lóbulo medio de la genitalia de los machos de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus* muestra la separación entre poblaciones. La VC1, el cual explica el 61% de la variación, muestra la separación de las poblaciones de Tarímbaro y Registrillo con la de San Juan Guelavia y Etúcuaro, y éstas a su vez de Acuitzio del Canje. Por su parte, la VC2, el cual explica el 26% de la variación, indica la separación de las poblaciones de Tarímbaro, Etúcuaro y Acuitzio del Canje con la de Registrillo y San Juan Guelavia (Figura 20a).

El análisis clúster de las cinco poblaciones, basado en las distancias de Mahalanobis, muestra que las poblaciones de Tarímbaro y Registrillo son muy diferentes al resto de las poblaciones. También indica que los individuos pertenecientes a las poblaciones de Etúcuaro y San Juan Guelavia están relacionados entre sí, y que la población de Acuitzio del Canje es una población con más afinidad a la agrupación Etúcuaro-San Juan Guelavia que de Tarímbaro-Registrillo (Figura 20b). El ANOVA Procrustes confirmó, al encontrar diferencias significativas ( $F = 4.75$ ,  $gl = 192$ ,  $P < 0.0001$ ), que el lóbulo medio de la genitalia agrupa por poblaciones a los individuos de *S. acupunctatus*.



**Figura 20.** A) Análisis de variación canónica de la forma del lóbulo medio de la genitalia de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus*. Las imágenes en azul representan las formas representativas de cada variable canónica. Las poblaciones están diferenciadas por colores: Acuitzio del Canje (rojo), Registrillo (verde), Etúcuaro (celeste), San Juan Guelavia (naranja) y Tarímbaro (rosa). B) Análisis clúster de las distancias de Mahalanobis de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus*. Correlación cofenética: 0.8194. Distance= Distancia.

### 7.3 Estandarización para la amplificación de los *loci* de microsatélites en ADN de *S. acupunctatus*.

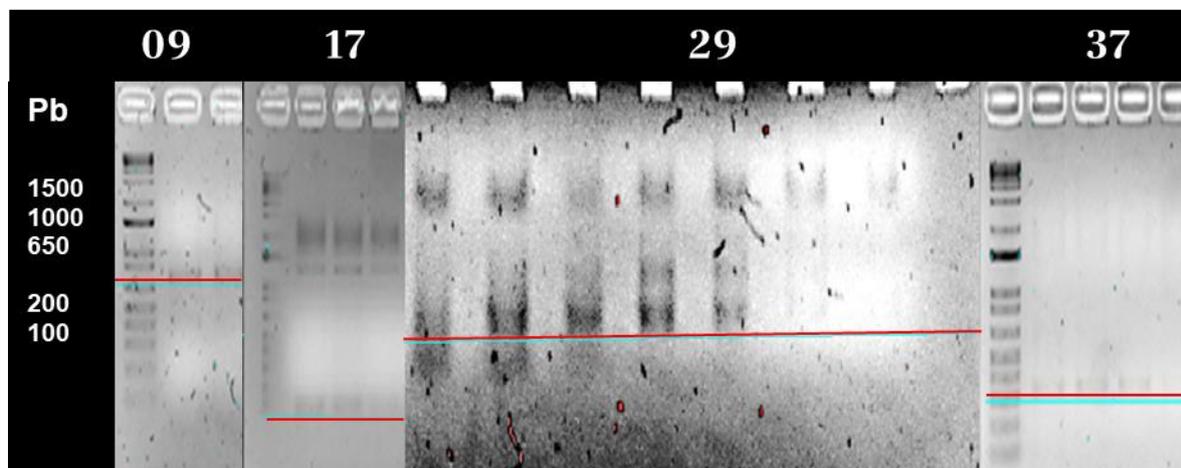
#### 7.3.1 Temperatura de alineamiento primers sin fluoróforo.

Se amplificaron exitosamente cuatro de los ocho pares de primers sintetizados sin fluoróforo añadido (Cuadro 9, Figura 21). A través de la PCR de gradiente con siete temperaturas diferentes, se logró determinar que la temperatura óptima de alineamiento fue de 45°. Esta temperatura se utilizó para las amplificaciones de los microsatélites.

**Cuadro 9.** Temperatura de alineamiento de cuatro pares de primers sin fluoróforo añadido reportado para el escarabajo *X. crassiusculus* (Husseneder *et al.* [2017] y modificado para *S. acupunctatus*).

<u>Primer</u>	<u>Rep</u>	<u>Secuencia</u>	<u><i>X. crassiusculus</i></u>		<u><i>S. acupunctatus</i></u>	
			<u>T° alin.</u>	<u>Tamaño (pb)</u>	<u>T° alin.</u>	<u>Tamaño (pb)</u>
<u>CR09</u>	<u>AGG</u>	<u>GCGTGTGGACAAACGATCCC</u> <u>GCTGCATACGAAGCATTGA</u>	<u>53</u>	<u>148</u>	<u>53.8, 55*,</u> <u>56.4</u>	<u>100-200</u>
<u>CR17</u>	<u>GAT</u>	<u>GCTTCCCGTAGAGCAATGAC</u> <u>CCAAAGGCTCCACTTCAATC</u>	<u>55</u>	<u>251</u>	<u>41.7,</u> <u>43.6,45*,46.2</u>	<u>100-200</u>
<u>CR29</u>	<u>ACC</u>	<u>TAATGAAACTGCCCCACCAT</u> <u>ACGGTCGGATTTCCTTATTC</u>	<u>55</u>	<u>240</u>	<u>41.7,</u> <u>43.6,45*,46.2</u>	<u>100-200</u>
<u>CR37</u>	<u>ATT</u>	<u>CCCCATTATACTACTGACAA</u> <u>AGGAAAAGTTGCCCAAAGGT</u>	<u>53</u>	<u>175</u>	<u>41.7,</u> <u>43.6,45*,46.2</u>	<u>100-200</u>

\*Indica que la banda obtenida es la de mejor calidad.

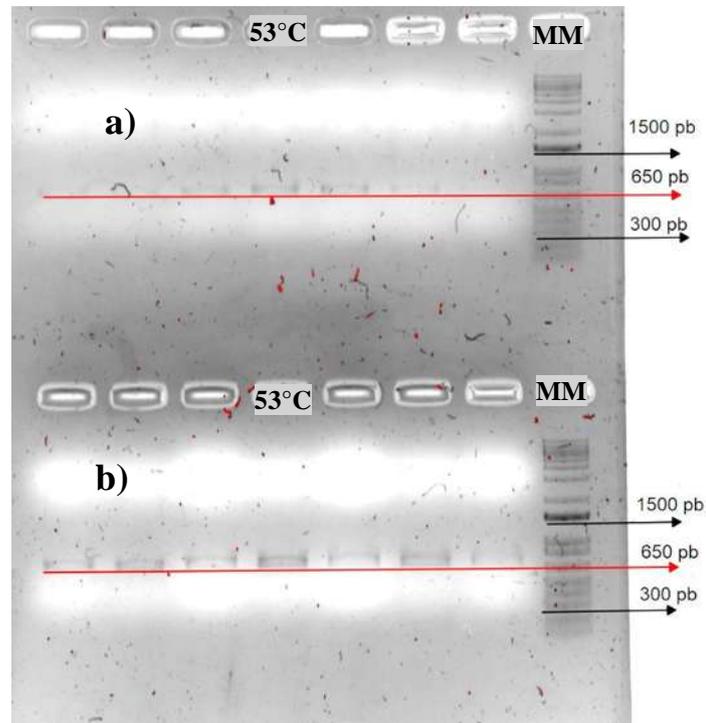


**Figura 21.** Electroforesis en gel de agarosa al 3% TAE de los productos de la PCR gradiente, la línea de color rojo indica en donde se encuentra el ADN de interés que ha sido amplificado, se esperan bandas de entre 140 a 278 pares de bases (pb). Los números sobre los carriles hacen referencia a los primers seleccionados.

### 7.4 Gen COI.

El gen COI fue amplificado en un total de 55 individuos de *S. acupunctatus*: 15 individuos de Etúcuaro, Michoacán, 16 de Registrillo, Durango, 15 de San Juan Guelavia, Oaxaca, seis de Tarímbaro, Michoacán y tres de Acuitzio del Canje (Figura 22). La temperatura óptima de

alineamiento se eligió a partir de la visualización del gel de agarosa en donde se corrieron los productos de PCR gradiente (40 °C – 60°C), y en la cual se observó que, de las siete temperaturas utilizadas del gradiente, la de 53 °C fue la que arrojó una banda de ADN nítida.

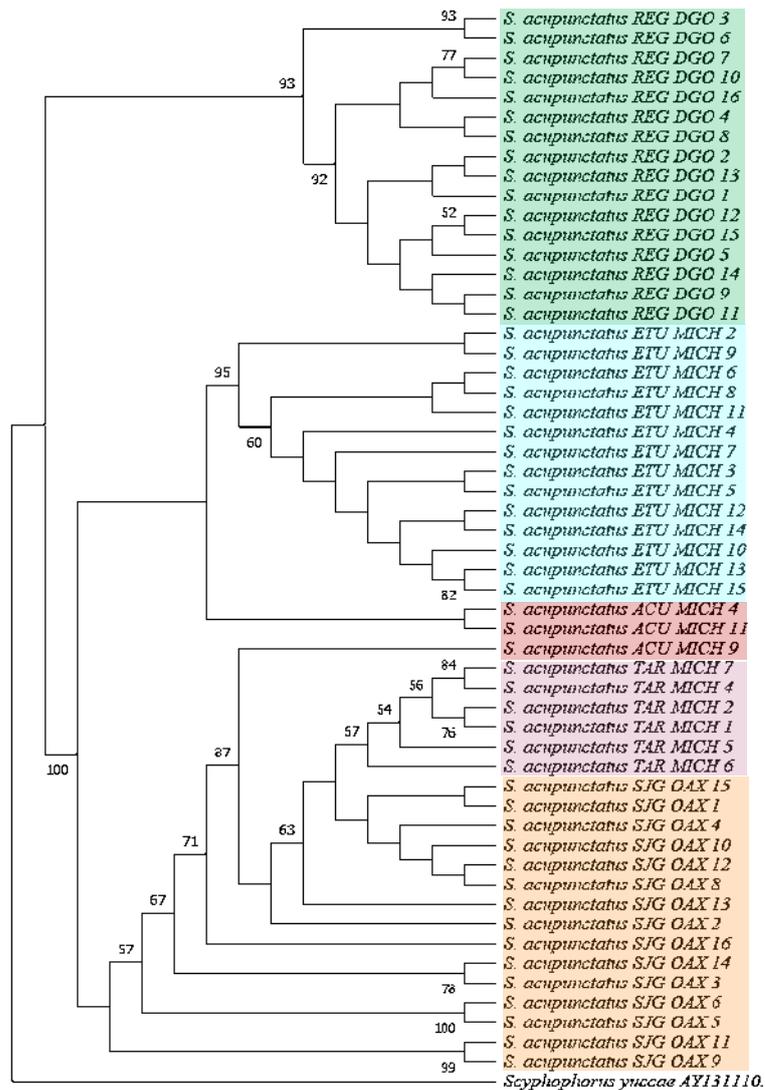


**Figura 22.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% TAE de los productos de PCR de gradiente del gen COI en dos individuos de *S. acupunctatus*: a) San Juan Guelavia, Oaxaca, b) Registrillo, Durango. La línea de color rojo indica el ADN de interés con un tamaño aproximado de 650-658 pares de bases (pb). MM=Marcador molecular (1Kb).

## 7.5 Variación genética intra e inter poblacional de *S. acupunctatus*.

### 7.5.1 Árbol filogenético UPGMA de haplotipos mitocondriales.

Se infirió un árbol óptimo con el método UPGMA. Este análisis involucró 55 secuencias de nucleótidos. Se resolvió un árbol enraizado donde separa el grupo externo (*S. yuccae*) de todos los demás individuos pertenecientes a *S. acupunctatus*, observando 574 posiciones. En la estructura del árbol (Figura 23) se observaron dos clados bien sustentados: 1) un clado (98/100), formado por individuos de Registrillo, Durango (97/100) y 2) otro conformado por cuatro subclados: Etúcuaro, Michoacán (92/100), San Juan Guelavia, Oaxaca (60/100), Acuitzio del Canje, Michoacán (68/100) y Tarímbaro, Michoacán (79/100).



**Figura 23.** Árbol Filogenético UPGMA de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus* y un grupo externo (*S. yuccae*). Los valores al inicio de cada nodo representan la robustez de cada rama (Bootstrap). Las poblaciones están diferenciadas por colores: Registrillo, Durango. (verde), Tarímbaro, Michoacán (rosa), San Juan Guelavia, Oaxaca (naranja), Acuitzio del Canje, Michoacán (rojo) y Etúcuaro, Michoacán (azul).

En total se observaron 55 haplotipos (H) entre las cinco poblaciones: 15 individuos de Etúcuaro, Michoacán, 16 de Registrillo, Durango, 15 de San Juan Guelavia, Oaxaca, seis de Tarímbaro, Michoacán y tres de Acuitzio del Canje, Michoacán (Cuadro 10). Los valores de distancia genética (Gst) observados (Cuadro 11 y 12) fueron menores a 0.05 entre las poblaciones y en el caso de San Juan Guelavia y Etúcuaro de cero. De la misma manera, las correlaciones más altas fueron para San Juan Guelavia y Acuitzio (0.04255); Etúcuaro y Acuitzio (0.042); y Registrillo y Acuitzio (0.044). La diversidad media haplotípica (HD: 1) y nucleotídica (PiT: 0.089) fueron elevadas.

**Cuadro 10.** Valores de diferenciación genética y sitios polimórficos.

POBLACIÓN	Núm. de secuencias	s	H	HD	PI
ACU, Michoacán	3	56	3	1	0.06760
ETU, Michoacán	15	100	15	1	0.04011
TAR, Michoacán	6	21	6	1	0.01443
SJG, Oaxaca	15	182	15	1	0.08906
REG, Durango	16	41	16	1	0.02254
<b>Estimación de datos totales</b>	55	247	55	1	<b>PiT: 0.08906</b>

\*s: número de sitios segregados; H: núm. de haplotipos; HD: diversidad media haplotípica; PI: diversidad de nucleótidos; PiT: diversidad nucleotídica. ACU= Acuitzio del Canje del Canje; ETU= Etúcuaro; TAR= Tarímbaro; SJG= San Juan Guelavia; REG= Registrillo.

**Cuadro 11.** Distancia genética de las cinco poblaciones estudiadas.

Población 1	Población 2	G <sub>st</sub>	N <sub>st</sub>	F <sub>st</sub>
SJG	ETU	0	0.62240	0.60175
SJG	REG	0.00003	0.72204	0.70048
SJG	ACU	0.04255	0.32535	0.30690
SJG	TAR	0.01060	0.21602	0.21795
ETU	REG	0.00003	0.79669	0.78143
ETU	ACU	0.04255	0.51346	0.49542
ETU	TAR	0.01060	0.80936	0.79723
REG	ACU	0.04428	0.70590	0.68619
REG	TAR	0.01170	0.89189	0.88070
ACU	TAR	0.01370	0.46505	0.45497

\*G<sub>st</sub>: coeficiente de diferenciación genética; N<sub>st</sub>: diferenciación genética (frecuencia haplotípica); F<sub>st</sub>: índice de fijación. ACU= Acuitzio del Canje del Canje; ETU= Etúcuaro; TAR= Tarímbaro; SJG= San Juan Guelavia; REG= Registrillo.

**Cuadro 12.** Matriz de distancia genética por pares (G<sub>st</sub>) entre cinco poblaciones de *S. acupunctatus*.

	ETU	TAR	ACU	SJG	REG
ETU	*	0.01060	0.00003	0	0.00003
TAR	0.01060	*	0.01370	0.01060	0.01170
ACU	0.04255	0.01370	*	0.04255	0.04428
SJG	0	0.01060	0.04255	*	0.00003
REG	0.00003	0.01170	0.04428	0.00003	*

ACU= Acuitzio del Canje del Canje; ETU= Etúcuaro; TAR= Tarímbaro; SJG=San Juan Guelavia; REG= Registrillo.

## VIII. DISCUSIÓN

El manejo de *S. acupunctatus* en los cultivos de agaves es complicado, especialmente porque todo su ciclo de vida ocurre dentro de las plantas, y solo sale de ese ambiente críptico cuando su alimento se agota y emigra a nuevos hospederos (Cruz *et al.*, 2019). Utilizar un sistema de trampeo basado en feromonas sintéticas de agregación y/o en trampas cebadas con atrayentes alimenticios es probablemente la alternativa más viable para su manejo (Ruiz-Montiel *et al.*, 2017), en particular porque al combinar ambos atrayentes se puede conseguir una mayor captura (Cruz *et al.*, 2019). La existencia de una amplia variación morfológica entre individuos de *S. acupunctatus* de diferentes áreas geográficas encontrado por Vaurie (1971) probablemente sugiera la presencia de biotipos o de un complejo de especies crípticas en este insecto, y es probable que esto explique la razón del por qué se capturan más individuos cuando se combinan ambos atrayentes (atrapan varios biotipos o un complejo de especies). Por ello, este trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la variabilidad morfológica y genotípica de cinco poblaciones diferentes de *S. acupunctatus* con la finalidad de discernir la existencia de biotipos o de especies crípticas.

Los caracteres morfológicos son variables que pueden servir para rastrear el progreso evolutivo que ha tenido una especie a través del tiempo (Mayr y Ashlock, 1991). Su medición puede ayudar a cuantificar la variación que existe entre los individuos de una especie (variación intraespecífica) y también puede servir para asignar los límites que ésta puede tener con respecto a otras especies (variación interespecífica) (Mayr y Ashlock, 1991). Según Benítez *et al.* (2020), estudiar las diferencias de tamaño y forma entre las especies, así como la variación de tamaños en individuos de una misma especie puede revelar información importante sobre las presiones evolutivas que han tenido las especies. den Boer (1986), por su parte, menciona que las variaciones encontradas en la forma y tamaño del cuerpo de los insectos se relacionan a demandas específicas del ambiente. Lo que permite que, dependiendo de las condiciones ambientales, los organismos expresen diferentes fenotipos (plasticidad fenotípica) (Agrawal, 2001).

En este estudio se emplearon técnicas integrativas (análisis multivariados [morfometría clásica y geométrica] y análisis genéticos) para documentar la variación intraespecífica entre cinco poblaciones de *S. acupunctatus*. Es importante comentar que, en especies de escarabajos, por muchos años se usó el tamaño del cuerpo como un carácter para diferenciar entre machos y hembras (dimorfismo sexual), así como para diferenciar individuos de diferentes poblaciones (Sukhodolskaya y Saveliev, 2017; Benítez *et al.* 2020, 2021). Esto debido a que, en la mayoría de las especies de insectos, las hembras son, por lo general, más grandes que los machos (Teder, 2014). En el presente estudio, con el propósito de discernir diferencias en medidas entre

hembras y machos, así como entre poblaciones de *S. acupunctatus*, se analizaron 34 caracteres morfológicos con morfometría clásica, así como también datos dimensionales de vista lateral del cuerpo, del pronoto y de las genitalias del macho con morfometría geométrica. De acuerdo con Sanaei *et al.* (2015), cuando se analizan formas de estructuras morfológicas, la calidad de las variables medibles se incrementa para un análisis estadístico, por lo que la morfometría geométrica se ha convertido en la mejor herramienta para la comparación estadística multidimensional.

### **8.1 Morfometría clásica.**

En insectos, la morfometría clásica ha sido una valiosa herramienta para evaluar variaciones de estructuras morfológicas (Marinho-Alvarenga *et al.*, 2011) en áfidos (Footitt, 1992), abejas (Daly, 1992) y escarabajos (Sanmartín y Martín-Piera, 1999). En coleópteros, pocos estudios se han realizado con especies de la familia Curculionidae y, hasta nuestro conocimiento, el presente estudio es el primero que se realiza con *S. acupunctatus*. A la fecha, se tiene el antecedente que esta especie posee una amplia variación morfológica entre individuos de diferentes poblaciones y que tiene un insignificante dimorfismo sexual (Vaurie, 1971). En el presente estudio, el análisis multivariado de los caracteres medidos confirma la observación hecha por Vaurie (1971), dado que no se encontró evidencia del dimorfismo sexual entre individuos de una misma población y tampoco hubo diferencia en tamaño entre individuos de diferentes poblaciones. Diversos estudios han registrado dimorfismo sexual con la longitud del cuerpo en escarabajos (algunos por citar: George *et al.*, 2015; Abd-Latip *et al.*, 2019; Benítez *et al.*, 2020), pero pocos han sido aquellos que registran hembras y machos con un tamaño corporal relativamente similar (sin diferencia significativa), como ocurrió en el presente estudio con *S. acupunctatus* y en el escarabajo *Carabus aeruginosus* F.W (Coleoptera, Carabidae) estudiado por Sukhodolskaya y Eremeeva (2013). Estos autores evidenciaron la variación morfométrica en esta última especie en diferentes ambientes con diferentes grados de perturbación por actividades antropogénicas en Kemerovo, Rusia. En dicho estudio se observó que la medición de determinadas estructuras (longitud del cuerpo) varió con los ambientes estudiados, es decir, en ambientes más urbanizados las hembras y machos de *C. aeruginosus* presentaron tamaños similares, mientras que en ambientes más naturales las hembras y machos presentaron dimorfismo sexual con relación al tamaño.

Por otra parte, para conocer el sexo de los individuos de *S. acupunctatus*, solo se puede conseguir con observaciones del último segmento abdominal en vista ventral, en donde se puede observar que las hembras terminan más agudamente que en los machos (Figuroa, 2009;

Figuroa *et al.*, 2015). En el presente estudio, se esperaba encontrar que las hembras tuvieran mayor talla que los machos, como en la mayoría de las especies de insectos (Rudoy y Ribera, 2017), y como se observó en el estudio de George *et al.* (2015). Estos últimos autores indicaron que el tamaño del cuerpo de las hembras de *Mylocherus undecimpustulatus undatus* Marshall (Coleoptera: Curculionidae) fue más grande que el de los machos. En contraste, en algunas especies de curculiónidos el tamaño de ambos sexos se invierte, es decir, los machos son más grandes que las hembras, como fue el caso del escarabajo polinizador de la palma de aceite, *Elaeidobius kamerunicus* Faust (Abd-Latip *et al.*, 2019). Si bien es cierto, que con morfometría clásica no se logró diferenciar individuos entre poblaciones de *S. acupunctatus*, no sería el único trabajo que registra estos resultados. Por ejemplo, Manjeri *et al.* (2013) en un estudio de cuatro poblaciones de *Oryctes rhinoceros* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae) procedentes de la Península de Malaysia y Sumatra, en Indonesia, encontraron superposición de la variación morfológica en individuos recolectados de diferentes poblaciones.

La estadística básica de los rasgos morfométricos sometidos a ANOVAs indicó que pocos caracteres muestran la variación morfológica entre solo hembras y entre hembras-machos de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus*, y no hubo un caracter que mostrara la variación cuando se comparan solo machos. En el primer caso (comparaciones entre solo hembras), se encontraron seis caracteres morfométricos que indicaron que las hembras de Registrillo fueron más grandes que las de Acuitzio del Canje (Cuadro 8). Similarmente, la comparación entre hembras-machos de las cinco poblaciones, el caracter amplitud del ápice del élitro fue el que evidenció que las hembras de Registrillo fueron más grandes que las hembras de Etúcuaro. Se desconoce la razón del por qué se encontró esta diferenciación de tamaño en estas poblaciones, aunque se asume que las diferencias encontradas entre estos sitios podrían ser debido a la plasticidad de los individuos, características del entorno donde habitan y a las diferencias del acervo genético propio de cada población (Benitez *et al.*, 2010). Además, de que cada población procedió de una especie de agave y de un entorno ecológico diferente. Finalmente, en las comparaciones entre hembras-machos de las cinco poblaciones, cuatro caracteres morfométricos evidenciaron que en la población de Acuitzio del Canje los machos fueron más grandes que las hembras (Cuadro 8). Una explicación a esto es que los machos más grandes son normalmente más agresivos y competitivos y a menudo logran un mayor éxito reproductivo a través de la selección intrasexual (Andersson, 1994; Benitez *et al.*, 2020). Según Blanckenhorn *et al.* (2004) el que el macho sea el sexo con tamaño corporal más grande suele ser un rasgo derivado en la mayoría de los linajes de insectos, puesto que pocas especies presentan esta condición, ya que, en la mayoría de los insectos, las especies a menudo muestran que las hembras son más grandes debido a una fuerte selección en la fecundidad. Un ejemplo

de excepción a la regla fue estudiado con poblaciones de la especie terrestre *O. babirusa* muestreada en Singapur y la Península de Malasia, donde todas las poblaciones de los machos fueron más grandes que las hembras (Toh *et al.*, 2021).

## **8.2 Morfometría geométrica.**

Actualmente, la morfometría geométrica ha sido usada con escarabajos para identificar especies crípticas, biotipos y como una herramienta para diferenciar entre machos y hembras. En los últimos años, se ha utilizado también para realizar mejores descripciones morfológicas y para determinar la variación de rasgos que podrían ser difíciles de ver a simple vista. Al respecto, este estudio describe con morfometría geométrica la variación de forma del cuerpo en vista lateral, del pronoto en vista dorsal y de la genitalia del macho de cinco poblaciones de *S. acupunctatus*. Las gráficas de los análisis de variación canónica de los tres caracteres mencionados mostraron una separación clara de cada población, situación que no se observó con la forma del terguito VIII de la genitalia del macho (aunque hubo diferencias significativas en la ANOVA Procrustes). Independiente del origen de cada población, los individuos de *S. acupunctatus* de cada población fueron muy similares entre sí y cada población fue diferente una de otra. Los análisis de morfometría geométrica de la forma del cuerpo y del pronoto, a diferencia de los clásicos, lograron diferenciar entre machos y hembras de las cinco poblaciones de *S. acupunctatus*, y de igual manera lograron diferenciar a las cinco poblaciones.

La utilidad de la morfometría geométrica también queda constatada en el trabajo de Benítez *et al.* (2021), quienes recientemente utilizaron esta herramienta para determinar dimorfismo sexual en la especie *Pterostichus dilutipes* (Motschulsky) (Coleoptera: Carabidae), así como para detectar pequeñas variaciones en la morfología de estos escarabajos en un gradiente altitudinal en la costa del lago Baikal, Rusia. A diferencia del actual estudio, los autores mencionados utilizaron únicamente la vista dorsal y ventral del cuerpo de los escarabajos para diferenciar dimorfismo sexual y diferenciar poblaciones. Otro trabajo similar que logró diferenciar machos y hembras, así como poblaciones, fue realizado por Sanaei *et al.* (2015) con *H. postica* en tres provincias de Irán (Karaj Jovein, Tuyserkan). En este caso, dichos autores analizaron la forma del pronoto, élitro y el rostrum para separar por sexo y población.

De las cinco poblaciones, los análisis individuales de variación canónica de la forma del cuerpo y del pronoto mostraron que la de Acuitzio del Canje es la única población que se mantiene más separada de las otras poblaciones restantes, no así con las poblaciones Registrillo y Tarímbaro, las cuales son más afines entre sí con la forma lateral del cuerpo, y la de Etúcuaro y San Juan Guelavia con la forma del pronoto (aunque en ambos análisis hubo diferencias

significativas en la ANOVA Procrustes indicando la separación de las poblaciones). Al respecto, la población de Acuitzio del Canje podría definirse como una población especial ya que procede de plantas de agave que forman parte de vegetación natural del eje volcánico transversal y que no se destinan a la explotación comercial, lo que supone un entorno más rico de disponibilidad de alimentos y que se traduce probablemente en más eventos de reproducción. Por su parte, la población de Tarímbaro se recolectó de plantas de agave que estaban como ornato en una zona urbanizada con áreas aledañas de cultivos. Contrario a esto, las poblaciones de Etúcuaro, Registrillo y San Juan Guelavia procedieron de plantas de agave de áreas de explotación comercial con manejo convencional de las actividades agrícolas. Se desconoce la razón precisa del porqué en el análisis de la forma del cuerpo en vista lateral hubo más afinidad entre las poblaciones de Registrillo y Tarímbaro y en el análisis de la forma del pronoto entre Etúcuaro y San Juan Guelavia, por lo mismo se necesita continuar con estudios que conlleven a dilucidar esta revelación.

En este estudio, a diferencia de la forma del lóbulo medio de la genitalia del macho, en el terguito VIII no se visualizó una clara separación de las poblaciones de *S. acupunctatus* (aunque hubo diferencias significativas en la ANOVA Procrustes), lo que podría indicar que la forma de esta estructura se podría utilizar como último recurso para separar poblaciones, esto supondría que tendría poca utilidad. Un caso similar, fue documentado por Przybycień y Waclawik (2015), donde se muestra que las mediciones asociadas a la genitalia del macho de seis poblaciones de tres especies (dos poblaciones por especie) del género *Bryodaemon* Podlussany (Coleoptera: Curculionidae) de Ucrania y Polonia no fueron importantes en la separación entre especies y entre poblaciones. Caso contrario, el estudio de morfometría geométrica de Valerio *et al.* (2017) con la especie *Dendroctonus brevicomis* LeConte (Coleoptera: Curculionidae) demostró que la forma del ducto seminal de la genitalia del macho fue útil para separar con otras especies y también para conocer la variación en tamaño y forma de dicha estructura en diferentes rangos de distribución de una misma especie en México.

#### **8.4 Variación genética intra e inter poblacional de *S. acupunctatus*.**

Los marcadores genéticos basados en el ADN ayudan a identificar individuos en forma precisa e independiente del ambiente, y también permiten determinar relaciones genéticas entre los mismos. El interés por detectar las variaciones a nivel genético entre y dentro de poblaciones de insectos plaga, como lo es *S. acupunctatus*, surge por la necesidad de encontrar nuevos y mejores sistemas de monitoreo y manejo de estas especies. Al respecto, el estudio de Chamorro *et al.* (2016, 2021), enfocado a proporcionar recomendaciones de manejo para proteger al A.

*eggersiana* contra *S. acupunctatus*, realizaron un análisis filogenético utilizando dos genes (*mtCO1* y *EF1a*), mismos que analizaron de manera conjunta y por separado. En dicho estudio los autores encontraron en su análisis un patrón claro de estructura filogeográfica sustancial donde los especímenes se agruparon por ubicación geográfica, muy similar a la forma en que se agruparon las poblaciones de *S. acupunctatus* en el presente estudio. Por otra parte, Azuara-Domínguez *et al.* (2013), quienes al estudiar la estructura genética en la respuesta electrofisiológica y de comportamiento de búsqueda de *S. acupunctatus*, señalaron que el hospedero es un factor que debe tomarse en cuenta para el manejo de las plagas. Esto debido a que encontraron que la respuesta de preferencia difería entre poblaciones de picudos de diferentes regiones geográficas, además de que dichas respuestas se correlacionaron con la edad y los patrones de variabilidad genética en el ADN mitocondrial de los adultos.

Además, debido a un proceso de selección muchas variantes del hospedero se han conservado y evolucionado al ser trasplantadas de su medio natural a zonas cercanas a los campamentos de los recolectores y parcelas de los agricultores, donde probablemente han ocurrido nuevas combinaciones genéticas tanto para el agave como para el picudo (Mora-López *et al.*, 2011; González-Vega, 2016). En comparación con otros géneros y especies, el nivel de conocimiento de la diversidad genética en *Agave* spp. es limitado y se basa principalmente en caracteres morfológicos y citológicos (Gil-Vega *et al.*, 2001). Los datos genético-moleculares que consideran la estructura y variabilidad existente en las poblaciones de *Agave* son escasos, así como las de sus plagas potenciales, por eso tan importante la complementación de nuestro estudio genético del picudo del agave con análisis moleculares.

Por otra parte, en este estudio se recolectaron 55 individuos de *S. acupunctatus* de cinco áreas geográficas diferentes y provenientes también de distintos hospederos (Cuadro 2). Probablemente ambos factores sean la razón del por qué este insecto presenta una diferenciación genética alta (diversidad haplotípica alta) entre las distintas poblaciones (Cuadro 10), indicando con ello un flujo genético mínimo para mantener la homogeneidad de estas. La alta diversidad haplotípica observada en cada una de las poblaciones de *S. acupunctatus* puede explicarse a los cambios sometidos por la presión ambiental en donde se desarrolla este insecto. Esto coincide con lo reportado por Nolasco-Soto *et al.* (2017), quienes estudiaron al escarabajo pelotero *Canthon cyanellus* Leconte (Coleoptera: Scarabaeidae) que vive en las costas del Pacífico, del Golfo, la Península de Yucatán y el Sur de México. Estos autores encontraron que las poblaciones con mayor diversidad haplotípica fueron aquellas que habitaban ambientes transformados, comparado con aquellas poblaciones que habitaban las áreas preservadas.

Finalmente, la estructura de rasgos (caracteres) genéticos y morfológicos (morfometría clásica y geométrica) en poblaciones naturales está moldeada en gran medida por la presión de selección que impone los factores ambientales (Barton y Turelli, 1989; Lynch *et al.*, 1999). Consecuentemente la variación genética en estos rasgos muchas veces se asocia con el potencial de las especies para adaptarse a los cambios ambientales (Hamrick, 1983; Lande y Barrowclough, 1987). Por otra parte, aunque la variación molecular y la de caracteres morfológicos pueden estar correlacionados, también existen estudios que revelan patrones discordantes entre ambos (Waldmann y Andersson, 1998; Merilä y Crnokrak, 2001), de ahí la importancia de estudiarlas en conjunto. La identificación del grado de concordancia entre ambos tipos de rasgos permite inferir tanto el papel de éstos en los procesos evolutivos, de adaptación y distribución (Edmands y Harrison, 2003), como la relación existente entre ellos (Butlin y Tregenza, 1998; Reed y Frankham, 2001). Estudios empíricos muestran que la diferenciación revelada por marcadores moleculares neutrales predice la diferenciación en rasgos morfológicos en algunos casos (McKay y Latta, 2002), aunque esto también depende de las fuerzas que generan y mantienen la diversidad genética entre las poblaciones (Butlin y Tregenza, 1998). De la misma manera, otros estudios sugieren que los marcadores y los caracteres morfológicos se comportan en forma diferente en cuanto a la divergencia adaptativa de poblaciones, su distribución, y su flujo genético; por lo tanto, la extrapolación e interpretación a partir de un tipo de carácter a otro se debe hacer con cautela (Butlin y Tregenza, 1998; Reed y Frankham, 2001; McKay y Latta, 2002), sin excluir una de la otra.

## **IX. CONCLUSIONES**

La técnica de morfometría clásica, analizada con 34 caracteres morfológicos, medidos para cada población, evidenció que *S. acupunctatus* es una especie que presenta una amplia variación en sus medidas entre poblaciones y entre individuos de una misma población (machos y/o hembras). En contraste, la morfometría geométrica, analizada con la vista lateral del cuerpo y la vista dorsal del pronoto, mostró que ambas formas evaluadas son de utilidad para separar individuos de *S. acupunctatus* por población y sexo.

La alta diferenciación genética encontrada entre las cinco poblaciones de *S. acupunctatus*, es un indicativo de que existe un flujo genético suficiente para mantener la variación entre y dentro de las poblaciones, debido posiblemente a la plasticidad fenotípica por presión ambiental y al impacto antropogénico en las zonas donde se cultivan especies del género *Agave*.

## **X. PERSPECTIVAS**

Este trabajo puede ser de mucha utilidad para el manejo de *S. acupunctatus*. Las diferencias encontradas en las poblaciones de este estudio pueden señalar divergencias tan grandes como para indicar la existencia de biotipos, aunque esto último debe de confirmarse con estudios que incluyan a más poblaciones de *S. acupunctatus* y analizar genéticamente a sus plantas hospederas. Desde el punto de vista práctico, se deben imitar la realización de prácticas agronómicas de los cultivos de *Agave* donde el manejo de este insecto está siendo exitoso.

## XI. LITERATURA CITADA

- Abd Latip, N. F., Abd Ghani, I., Hazmi, I. R., Abidin, C. M. R. Z., Sartiami, D., Yacob, S., & Nasir, D. M. (2019). Morphometric comparison of the oil palm pollinator *Elaeidobius kamerunicus* Faust (Coleoptera: Curculionidae) from Malaysia, Indonesia, and Liberia. *The Coleopterists Bulletin*, 73(3), 746-756. <https://doi.org/10.1649/0010-065X-73.3.746>.
- Agrawal, A.A., 2001. Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science* 294, 321e326. [doi:10.1126/science.1060701](https://doi.org/10.1126/science.1060701)
- Agroasemex, S. (2019). Las plagas producen pérdidas de hasta un 40 por ciento en la producción agrícola, revela estudio de la FAO. 1–4. Retrieved from <https://www.gob.mx/agroasemex/articulos/las-plagas-producen-perdidas-de-hasta-un-40-por-ciento-en-la-produccion-agricola-revela-estudio-de-la-fao?idiom=es>
- Andersson, M. *Sexual Selection*; Princeton University Press: Princeton, NJ, United States of America, 1994. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)81042-1](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)81042-1)
- Al-Samarai, F. R., & Al-Kazaz, A. A. (2015). Molecular Markers: an Introduction and Applications. *European Journal of Molecular Biotechnology*, 9(3), 118–130. <https://doi.org/10.13187/ejmb.2015.9.118>
- Aquino-Bolaños T, Ipaguirre CM, & Ruiz VJ. 2007. *Schyphophorus acupunctatus* (= *interstitialis*) Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae). Plaga del agave mezcalero: pérdidas y daños en Oaxaca, México. *Revista UDO Agrícola* 7: 175–180.
- Azuara-Domínguez, A., Cibrián-Tovar, J., Terán-Vargas, A. P., Segura-León, O. L., & Cibrián-Jaramillo, A. (2013). Factors in the response of agave weevil, *Scyphophorus acupunctatus* (coleoptera: Curculionidae), to the major compound in its aggregation pheromone. *Southwestern Entomologist*, 38(2), 209–220. <https://doi.org/10.3958/059.038.0206>
- Beltran, M. C. (2005). El picudo *Scyphophorus acupunctatus* Ghyll (Coleoptera: Curculionidae) y su microbiota asociado al tejido dañado de *Agave tequilana* Weber var. azul. Universidad de Guadalajara.
- Benitez, H. A. (2016). Sexual Dimorphism Using Geometric Morphometric Approach. *Intech, i(tourism)*, 13. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>.
- Benítez, H. A., Sukhodolskaya, R. A., Órdenes-Clavería, R., Avtaeva, T. A., Kushalieva, S. A., & Saveliev, A. A. (2020). Measuring the Inter and Intraspecific Sexual Shape

- Dimorphism and Body Shape Variation in Generalist Ground Beetles in Russia. *Insects*, 11(361). <https://doi.org/10.3390/insects11060361>.
- Benítez, H. A., Sukhodolskaya, R. A., Órdenes-Claveria, R., Vavilov, D. N., & Ananina, T. (2021). Assessing the shape plasticity between Russian biotopes in *Pterostichus dilutipes* (Motschulsky, 1844) (Coleoptera: Carabidae) a geometric morphometric approach. *Zoologischer Anzeiger*, 293, 163–167. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2021.06.008>
- Blanckenhorn, W. U., Kraushaar, U. R. S., Teuschl, Y., & Reim, C. (2004). Sexual selection on morphological and physiological traits and fluctuating asymmetry in the black scavenger fly *Sepsis cynipsea*. *Journal of Evolutionary Biology*, 17(3), 629–641. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2004.00693.x>
- Bouchard, P., Smith, A. B. T., Douglas, H., Gimmel, M. L., Brunke, A. J., & Kanda, K. (2009). Biodiversity of Coleoptera. *Insect Biodiversity: Science and Society*, I, 265–301. <https://doi.org/10.1002/9781444308211.ch11>
- Butlin R. K. & T. Tregenza (1998) Levels of genetic polymorphism: marker loci versus quantitative traits. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences* 353(1366):187198. <https://doi.org/10.1098/rstb.1998.0201>
- CABI. (2021). Invasive species compendium. <https://doi.org/10.1094/PDIS>.
- Centre for Biodiversity Genomics, University of Guelph (2021). The Global Taxonomy Initiative 2020: A Step-by-Step Guide for DNA Barcoding. Technical Series No. 94. Secretariat of the Convention on Biological Diversity, Montreal, 1-66.
- Chamorro, M. L., de Medeiros, B. A., & Farrell, B. D. (2021). First phylogenetic analysis of Dryophthorinae (Coleoptera, Curculionidae) based on structural alignment of ribosomal DNA reveals Cenozoic diversification. *Ecology and evolution*, 11(5), 1984-1998. <https://doi.org/10.1002/ece3.7131>
- Chamorro, M. L., Persson, J., Torres-Santana, C. W., Keularts, J., Scheffer, S. J., & Lewis, M. L. (2016). Molecular and Morphological Tools to Distinguish *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal, 1838 (Curculionidae: Dryophthorinae): A New Weevil Pest of the Endangered Century Plant, *Agave eggersiana* from St. Croix, U.S. Virgin Islands. *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 118(2), 218–243. <https://doi.org/10.4289/0013-8797.118.2.218>
- CIPF, S. de la C. I. de P. F. (2002). Plagas no cuarentenarias reglamentadas

- Clark, W. E. (1977). Male Genitalia of Some Curculionoidea (Coleoptera): Musculature and Discussion of Function. 31(2), 101–115. <http://www.jstor.org/stable/3999978>
- Cruz-Faustino, J. J., Figueroa-Castro, P., Alcántara-Jiménez, J. Á., López-Martínez, V., & Silva-García, F. (2019). Vegetal synergists for trapping the adult of *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal, in pheromone baited traps, in *Agave angustifolia* Haw., in Morelos, Mexico. *Acta Zoológica Mexicana (N.S.)*, 35, 1–9. <https://doi.org/10.21829/azm.2019.3502187>
- Cuervo Parra, A. J., Pérez España, V. H., López Pérez, P. A., Morales Ovando, M. A., Arce Cervantes, O., Aparicio Burgos, J. E., & Romero Cortes, T. (2019). *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Dryophthoridae): A Weevil Threatening the Production of *Agave* in Mexico. *Florida Entomologist*, 102(1), 1. <https://doi.org/10.1653/024.102.0101>
- Daly, H. V. 1992. A statistical and empirical evaluation of some morphometric variables of honeybee classification [pp. 127–153]. In: *Ordination in the Study of Morphology, Evolution and Systematics of Insects: Applications and Quantitative Genetic Rationals* (J. T. Sorensen, and R. Footitt, editors). Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- De la Mora, M., Piñero, D., Oyama, K., Farrell, B., Magallón, S., & Núñez-Farfán, J. (2018). Evolution of *Trichobaris* (Curculionidae) in relation to host plants: Geometric morphometrics, phylogeny and phylogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 124, 37–49. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.02.018>
- den Boer, P. J. 1986. Carabids as objects of study. In: *Carabid Beetles. Their Adaptations and Dynamics*. XVIIth International Congress of Entomology (P. J. den Boer, editor), Gustav Fischer, Stuttgart, Germany.
- Edmands, S., & Harrison, J. S. (2003). Molecular and quantitative trait variation within and among populations of the intertidal copepod *Tigriopus californicus*. *Evolution*, 57(10), 2277–2285. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb00239.x>
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2014. PQR database. European and Mediterranean Plant Protection Organization, Paris, France. <http://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>
- Espinoza Barrera, L. A. (2015). Generalidades e importancia de los agaves en México. Desde El Herbario CICY, 7, 161–164. Retrieved from [http://www.cicy.mx/sitios/desde\\_herbario/](http://www.cicy.mx/sitios/desde_herbario/)

- Figueroa Castro, P. (2009). Fluctuación poblacional y trampeo de *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) con feromona de agregación en plantaciones de agave tequilero en jalisco [Maestría en Ciencias en Protección Vegetal]. Universidad Autónoma de Chapingo.
- Figueroa-Castro, P., González-Hernández, H., Carrillo-Sánchez, J. L., del Real-Laborde, J. I., Solís-Aguilar, J. F., & Rojas, J. C. (2015). Both sexes of *Scyphophorus acupunctatus* (Coleoptera: Dryophthoridae) can start the colonization of the agave plant (Asparagaceae). *Acta Zoológica Mexicana*, 31(3), 495-497.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz & R. Vrijenjoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marinebiology and biotechnology*. 3(5): 294-299.
- Footit, R. G. 1992. The use of ordination methods to resolve problems of species discrimination in the genus *Cinara Curtis* (Homoptera: Aphidoidea:Lachnidae) [pp. 193–219]. In: *Ordination in the Study of Morphology, Evolution and Systematics of Insects: Applications and Quantitative Genetic Rationals* (J. T. Sorensen and R. Footit, editors). Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- García Herrera, E. J., Méndez Gallegos, S. de J., & Talavera Magaña, D. (2010). El género *Agave* spp. En México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *Revista Salud Pública y Nutrición, Edición Especial*, 5(73), 109–129. Retrieved from <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2010/ee-05-2010/documentos/09.pdf>
- García-Mendoza, A. 2011. Agavaceae. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. 88:1-95.
- García-Román, J., Armendáriz Toledano, F., Valerio-Mendoza, O., & Zúñiga, G. (2019). An assessment of old and new characters using traditional and geometric morphometrics for the identification of *Dendroctonus approximatus* and *Dendroctonus parallelocollis* (curculionidae: Scolytinae). *Journal of Insect Science*, 19(1), 1–13. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iey131>
- Gelsvartas, J. (2007). Geometric morphometrics. *Annual Review of Anthropology*, 36(1), 261–281. <https://doi.org/10.1146/annurev.anthro.34.081804.120613>
- George, J., Morse, W. C., & Lapointe, S. L. (2015). Morphology and sexual dimorphism of the weevil *Myloccerus undecimpustulatus undatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Annals of*

- the Entomological Society of America, 108(3), 325–332.  
<https://doi.org/10.1093/aesa/sav013>
- Gil-Vega K, M G Chavira, O M de la Vega, J Simpson, & G Vandemark (2001) Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers. *Euphytica* 119:335-341. <https://doi.org/10.1023/A:1017553107303>
- González-Vega, M. E. (2016). *Polianthes tuberosa* L: revisión de sus aspectos filogenéticos, morfológicos y de cultivo. *Cultivos Tropicales*, 37(3), 120-136.  
<http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.1.2715.4161>
- González, E. G. (2003). Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*, 59(2–3), 377–388. <https://doi.org/10.3989/graellsia.2003.v59.i2-3.253>
- Gutiérrez, D. (2013). Short Tandem Repeats. Retrieved from Las Ciencias Forenses desde el punto de vista molecular STRs website: <https://forensemoleculare.es.tl/strs.htm>
- Halfpeter G. 1956. Plagas que afectan a las distintas especies de *Agave* cultivadas en México. Dirección General de la Defensa Agrícola. SAG (Secretaría de Agricultura y Ganadería). Distrito Federal, Mexico.
- Hamrick J. L. (1983) The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: *Genetics and Conservation: A Reference for Managing Wild Animals and Plant Populations*. C M Schonewald-Cox, S M Chambers, B MacBryde, W L Thomas (eds). The Benjamin/Cummings Publishing Company. Menlo Park, California, United States of America. pp:335-348. <https://doi.org/10.1086/665263>
- Hanley, R. S., & Ashe, J. S. (2003). Techniques for dissecting adult aleocharine beetles (Coleoptera: Staphylinidae). *Bulletin of Entomological Research*, 93(1), 11–18.  
<https://doi.org/10.1079/ber2002210>
- Harvey, M. L., Dadour, I. R., & Gaudieri, S. (2003). Mitochondrial DNA cytochrome oxidase I gene: potential for distinction between immature stages of some forensically important fly species (Diptera) in western Australia. *Forensic Science International*, 131(2-3), 134-139. <https://doi.org/10.1016/S0379-0738%2802%2900431-0>
- Hernández, R., Valdés, E., Aldana, L., Gutiérrez, O., & Figueroa, B. (2007). Developmental stages of the spikenard weevil *Scyphophorus acupunctatus* on *Polianthes tuberosa* L. In *Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture* (Vol. 51, pp. 276-278). Interamerican Society for Tropical Horticulture.
- Huala Jimenez, L., Rebolledo Ranz, R., Carrillo López, R., Elgueta, M., & Paredes Honorato, M. (2018). Morphometric and molecular differences among *Calvertius tuberosus* (Coleoptera: Curculionidae) populations associated with Andean and coastal

- populations of *Araucaria araucana* in the La Araucanía Region, Chile. *Revista Brasileira de Entomología*, 62(2), 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.rbe.2017.12.004>.
- Huerta-Alcocer, S.A., Larralde-Corona, C.P. & Narváez-Zapata, J.A. 2014. Aplicación de subproductos del agave para la producción de inulinasas microbianas. *Revista Bio ciencias*. 3(1):4-16.
- Husseneder, C., Park, J. S., Werle, C. T., & Adamczyk, J. J. (2017). Development of Microsatellites for Population Genetic Analyses of the Granulate Ambrosia Beetle (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology*, 110(3), 1107–1112. <https://doi.org/10.1093/jee/tox094>
- Ibacache, M. V. T., Soto, G. M., & Galdames, I. S. (2010). Morfometría geométrica y el estudio de las formas biológicas: De la morfología descriptiva a la morfología cuantitativa. *International Journal of Morphology*, 28(4), 977–990. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022010000400001>
- INEGI, & CAJ. (2019). Colección de estudios sectoriales y regionales. Conociendo la industria del Tequila y Mezcal.
- IPNI, International Plant Names Index (2020). *Agave amica*. Published on the Internet <http://www.ipni.org>.
- Jaramillo Ocampo N. 2010. Morfometría geométrica: principios teóricos y métodos de empleo. En O. Triana Chávez, A.M. Mejía Jaramillo, A. Mauricio Gómez Palacio (eds), *Fronteras de investigación en enfermedades infecciosas. Modelo enfermedad de Chagas* (pp.69 - 87), Universidad de Antioquia
- Klingenberg, C. P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular ecology resources*, 11(2): 353-357. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: molecularEvolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol BiolEvol*. 35(6):1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096
- Lande R. & G. F. Barrowclough (1987) Effective population size, genetic variation, and their use in population management. In: *Viable Populations for Conservation*. M E Soulé (ed). Cambridge University Press. Cambridge, UK. pp:87-123. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511623400.007>
- Lanteri, A. A. 2007. Código de barras del ADN y sus posibles aplicaciones en el campo de la Entomología. *Sociedad Entomológica Argentina*. 66 (3-4): 15-25.

- Lara de la Cruz, L. I. (2011). Efecto paterno sobre la adecuación de la progenie en *Chelonia mydas* de la costa Michoacana. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/175923>
- Lesieur, V., Jeanneau, M., Martin, J. F., & Bon, M. C. (2016a). Development and characterization of 11 microsatellite markers in the root-gall-forming weevil, *Ceutorhynchus assimilis* (Coleoptera: Curculionidae). *Applied Entomology and Zoology*, 51(3), 495–500. <https://doi.org/10.1007/s13355-016-0414-7>
- Lunt, D. H., Zhang, D.-X., Szymura, J. M., Hewlitt, M., & Hewitt, G. M. (1996). The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. In *Insect Molecular Biology* (Vol. 5, Issue 3).
- Lynch M., M. Pfrender, K. Spitze, N. Lehman, J. Hicks & D. Allen (1999) The quantitative and molecular genetic architecture of a subdivided species. *Evolution* 53:100-110. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1999.tb05336.x>
- Manjeri, G., Muhamad, R., Faridah, Q. Z., & Tan, S. G. (2013). Morphometric analysis of *Oryctes rhinoceros* (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae) from oil palm plantations. *Coleopterists Bulletin*, 67(2), 194–200. <https://doi.org/10.1649/0010-065X-67.2.194>
- Marinho Alvarenga, T., F. Fonseca e Silva, & M. Souza Silva. 2011. Analysis of morphometry and dimorphism in *Enhydrus sulcatus* (Wiedeman, 1821) (Coleoptera: Gyrinidae). *Neotropical Biology and Conservation* 6(3): 178–186. <https://doi.org/10.4013/nbc.2011.63.05>
- Martínez-Palacios, A., Castro, L. E. M., Alvarez, C. R. N., Vargas, N. M. S., Cervantes, L. A., Rodríguez, S. G., & Lobit, P. 2015. Monocultivo y sistemas agresivos de manejo asociados a plagas y enfermedades en plantaciones de *Agave cupreata* en Michoacán.
- Martínez - Palacios, A., Morales - García, J. L., & Guillén Rodríguez, S. (2016). Aspectos sobre el Manejo y la Conservación de Agaves Mezcaleros en Michoacán.
- Mayr E, Ashlock PD (1991) Principles of systematic zoology, 2nd edn. McGraw-Hill Inc, New York
- McKay J. K. and R. G. Latta (2002) Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. *Trends in Ecology & Evolution* 17:285-291.
- Merilä J. & P. Crnokrak (2001) Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits. *Journal of Evolutionary Biology* 14:892-903. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2001.00348.x>
- Molina MD. 2013. Contribución al conocimiento de la distribución actual de la especie invasora *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal, 1838 (Coleoptera: Dryophthoridae) en la Península Ibérica. *Revista Gaditana de Entomología* 4: 11–16.

- Mora-López, J. L., Reyes-Agüero, J. A., Flores-Flores, J. L., Peña-Valdivia, C. B., & Aguirre-Rivera, J. R. (2011). Variación morfológica y humanización de la sección Salmianae del género *Agave*. *Agrociencia*, 45(4), 465-477.
- Naturalista. 2020. Picudo del Maguey (*Scyphophorus acupunctatus*). Consultado el 30 de Julio de 2020. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. <https://www.naturalista.mx/taxa/269419-Scyphophorus-acupunctatus>
- Nolasco-Soto, J., González-Astorga, J., Espinosa de los Monteros, A., Galante-Patiño, E., & Favila, M. E. (2017). Phylogeographic structure of *Canthon cyanellus* (Coleoptera: Scarabaeidae), a Neotropical dung beetle in the Mexican Transition Zone: Insights on its origin and the impacts of Pleistocene climatic fluctuations on population dynamics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 109, 180–190. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.01.004>
- Olsen, G.J., & Woese, C.R., 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *Faseb J.* 7, 113–123.
- Pečňiar, Ž. F y E. V. Buzan. 2013. 20 years since the introduction of DNA barcoding: from theory to application. *Journal of Applied Genetics*. 55:43–5.
- Przybycien, M., & Waclawik, B., 2015. Morphometric measurements of *Bryodaemon* (Coleoptera: Curculionidae): contribution to phylogeny. *Baltic J. Coleopterol.* 15, 129–136.
- Ramos-Ortiz, S., Oyama, K., Rodríguez-Correa, H., & González-Rodríguez, A. (2016). Geographic structure of genetic and phenotypic variation in the hybrid zone between *Quercus affinis* and *Q. laurina* in Mexico. *Plant Species Biology*, 31(3), 219–232. <https://doi.org/10.1111/1442-1984.12109>
- Reed D. H. & R. Frankham (2001) How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution* 55:1095-1103.
- Riad, S. A., & Mahmoud, M. A. (2020a). Morphometric Comparison Between Different Populations of Darkling Beetles “*Pimilia nilotica* (Coleoptera: Tenebrionidae)” In Egypt. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences*, 13(2), 257–267. <https://doi.org/10.2113/gselements.7.6.393>
- Riba I Flinch, J. M., & Alonso Zarazaga, M. Á. (2007). El picudo negro de la pita o agave, o max del henequén, *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal, 1838 (Coleoptera: Dryophthoridae): primera cita para la Península Ibérica. *Boletín de La SEA*, 41(41), 419–422.
- Ríos, E., Mejía, H., & Álvarez, S. (2009). Marcadores moleculares: una Revolución en la Zoología. *Ciencia*, 5–13. Retrieved from [https://www.dartmouth.edu/~chemlab/techniques/vol\\_flasks.html](https://www.dartmouth.edu/~chemlab/techniques/vol_flasks.html)

- Romo, A., & J. J. Morrone. 2012. Especies mexicanas de Curculionidae (Insecta: Coleoptera) asociadas con agaves (Asparagaceae: Agavoideae). *Revista Mexicana de Biodiversidad* 83: 1025-1035.
- Rudoy A, & Ribera I. (2017) Evolution of sexual dimorphism and Rensch's rule in the beetle genus *Limnebius* (Hydraenidae): is sexual selection opportunistic? *PeerJ*. Mar 7;5: e3060. doi: 10.7717/peerj.3060. PMID: 28286715; PMCID: PMC5344018.
- Ruiz Funes, M. (2018, February 8). *Agave tequila*, ¿crisis en puerta? 08/02/2018.
- Ruiz-Montiel, C., Ramón-Domínguez, C. I., Domínguez-Reyes, L., Ainsa-Zarate, R., & Mendoza-López, M. R. (2017) Efecto de la trampa y atrayente sobre *Scyphophorus acupunctatus* en agave. *Southwestern Entomologist*, 42 (1), 237–247. <https://doi.org/10.3958/059.042.0121>
- Sanaei, E., Seiedy, M., & Momtazi, F. (2015). Evolutionary view on sexual dimorphism and shape variation in Iranian populations of *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae). *Zoomorphology*, 134(4), 541–552. <https://doi.org/10.1007/s00435-015-0279-2>
- Sanger, F., & Coulson, A.R. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Cell Biology*. 1975 25; 94(3): 441-448 pp.
- Sanmartin, I., & F. Martin-Piera. 1999. Amorphometric approach to the taxonomy of the genus *Ceramida* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae). *The Canadian Entomologist* 131: 573–592.
- Schauff, M. (2015). Collecting and Preserving Insects and Mites Techniques and Tools. Agricultural Research Service, p. 69. [https://doi.org/10.1016/S0168-1923\(02\)00252-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1923(02)00252-6)
- SENASICA, S. N. de S. I. y C. A., & DGSV, D. G. de S. V. (2016). Picudo del agave *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal 1838 (Coleoptera: Dryophthoridae) (Vol. 1838). Retrieved from
- SIAP. (2016a). El impacto de las plagas y enfermedades en el sector agrícola. 1–3. Retrieved from <https://www.gob.mx/siap/articulos/el-impacto-de-las-plagas-y-enfermedades-en-el-sector-agricola>
- SIAP, S. de I. A. & P. (2016b). En aumento el consumo mundial de tequila y mezcal. Retrieved from <http://www.gob.mx/siap/documentos/en-aumento-el-consumo-mundial-de-tequila-y-mezcal>
- Siller-Jasso, M.G. 1985. Ciclo biológico en el laboratorio del picudo del maguey *Scyphophorus acupunctatus* Gyll (Coleóptera: Curculionidae) y algunas consideraciones sobre su impacto económico. Tesis profesional. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 91 p.

- Smith, G. F. E., Figueiredo, R. R., Klopper, N. R., Crouch, C. J., & S. L., C. (2012). A new specific plant host for the agave snout weevil, *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal, 1838 (Coleoptera: Curculionidae) in South Africa: a destructive pest of species of Agave L. (Agavaceae). *Bradleya*. 30, 19–24.
- Sneath P.H.A. & Sokal R.R. (1973). *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco.
- Solís-Aguilar, J. F., González-Hernández, H., Luis Leyva-Vázquez, J., Equihua-Martínez, A., Flores-Mendoza, F. J., & Martínez-Garza, Á. (2001). *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal, plaga del Agave tequilero en Jalisco, México. In *El Agave*, Gaceta Informativa. Bernache P., F. y A. Avalos C.
- Soltis, P. S., & Soltis, D. E. 2003. Applying the bootstrap in phylogeny reconstruction. *Statistical Science*, 256-267. <https://doi.org/10.1214/ss/1063994980>.
- Souza Campos, P. C. (2017). Morfometria geométrica, dimorfismo sexual e avaliação da atratividade de *Cratosomus flavofasciatus* (coleoptera: curculionidae) ao feromônio sintético (Universidade Federal de Sergipe). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Sukhodolskaya, R. A., & Eremeeva, N. I. (2013). Body size and shape variation in Ground Beetle *Carabus aeruginosus* F.-W., 1822 (Coleoptera, Carabidae). *Contemporary Problems of Ecology*, 6(6), 609–615. <https://doi.org/10.1134/S1995425513060127>
- Sukhodolskaya, R.A., & Saveliev, A.A., 2017. Impact of environmental factors on the body shape variation and sexual shape dimorphism in *Carabus granulatus* L. (Coleoptera: Carabidae). *Zoological Systematics* 42, 71e89.
- Sukirno, S., Tufail, M., Rasool, K. G., Husain, M., & Aldawood, A. S. (2020). Diversity of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Oliv. (Coleoptera: Curculionidae) in the Kingdom of Saudi Arabia: studies on the phenotypic and DNA barcodes. *International Journal of Tropical Insect Science*, 40(4), 899–908. <https://doi.org/10.1007/s42690-020-00148-1>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). *MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11*.
- Teder, T. (2014). Sexual size dimorphism requires a corresponding sex difference in development time: A meta-analysis in insects. *Functional Ecology*, 28(2), 479–486. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12172>
- Thangaraj, S. R., McCulloch, G. A., Subbarayalu, M., Subramaniam, C., & Walter, G. H. (2016). Development of microsatellite markers and a preliminary assessment of population structuring in the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). *Journal of Stored Products Research*, 66, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2015.12.005>

- Tribuna. (2019, August 30). El tequila y el mezcal los nuevos “pilares” para la economía nacional.
- Urbiola-Rangel, E. & O. Chassin-Noria. 2013. Conectividad genética de *Stegastes acapulcoensis* (Pomacentridae) en el Pacífico central de México *Hidrobiológica*. 23: (3) 415-419.
- Valerio-Mendoza, O., Armendáriz-Toledano, F., Cuéllar-Rodríguez, G., Negrón, J. F., & Zúñiga, G. (2017). The Current Status of the Distribution Range of the Western Pine Beetle, *Dendroctonus brevicomis* (Curculionidae: Solytinae) in Northern Mexico. *Journal of Insect Science*, 17(5), 1–7. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iex070>
- Van Rossem G, Van de Bund CF, Burguer HC, & de Goffau LJW. 1981. Bijzondere aantastingen door insekten in 1980. *Entomologische Berichten* 41: 84–87
- Vaurie, P. 1971. Review of *Scyphophorus* (Curculionidae: Rhynchophorinae). *The Coleopterists Bulletin*, 25(1):1-8.
- Vergara P., O., Benítez A., H., Pincheira, M., & Jerez, V. (2014). Determinación del dimorfismo sexual en la forma corporal de *Chiasognathus grantii* (Coleoptera: Lucanidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 40(1), 104–110.
- Waldmann P. & S. Andersson (1998) Comparison of quantitative genetic variation and allozyme diversity within and between populations of *Scabiosa canescens* and *S. columbaria*. *Heredity* 81:79-86.
- Wanek, K.A., & Sturmbauer, C.H., 2015. Form, function and phylogeny: comparative morphometrics of Lake Tanganyika’s Cichlid tribe Tropheini. *Zool. Scr.* <http://dx.doi.org/10.1111/zsc.12110>
- Woese, C.R., & Fox, G.E., 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5088–5090.
- Toh, K. X., Yap, S., Goh, T., & Puniamorthy, N. (2021). Sexual size dimorphism and male reproductive traits vary across populations of a tropical rainforest dung beetle species (*Onthophagus babirussa*). Authorea. <https://doi.org/10.22541/au.162523536.63697220/v1>