



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Análisis de la variación morfológica de estructuras  
sexuales y no sexuales en dos especies de *Phyllophaga*  
Harris (Coleoptera: Melolonthidae)**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO  
DE:**

**Biólogo**

**P R E S E N T A :**

**Mauricio Daniel Suárez Hernández**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. Andrés Ramírez Ponce  
Ciudad de México, 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Suárez

Hernández

Mauricio Daniel

5540129469

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

307287045

2. Datos del tutor

Dr. Andrés

Ramírez

Ponce

3. Datos del sinodal 1

Dr. Santiago

Zaragoza

Caballero

4. Datos del sinodal 2

Dr. Atilano

Contreras

Ramos

5. Datos del sinodal 3

Dr. José Jaime

Zuñiga

Vega

6. Datos del sinodal 4

M. en C. Moisés Armando

Luis

Martínez

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia que siempre está presente con gran energía y son inspiración para mí.

A mi familia Hernández. A mi familia Moncada.

A mis amigos, personas extraordinarias: Aldo, Ana, Analí, Álvaro, Elsie, Frank, Esteban, Julianne, Leilani, Marco, Monse, José, Polo.

A Mengers y Angélica, seres auténticos.

A mis amigos, música fluida: Adyeni, Alan, Alex, Fer, Matty.

A María, reflejo sensato.

Mi gratitud al Dr. Andrés Ramírez Ponce, por su sabiduría, paciencia y amistad.

Mi gratitud a la Ma. Alicia Rojas Asencio, por su enseñanza y humanismo.

Mi gratitud al Dr. Miguel Ángel Morón, por ser un gran ejemplo formativo y por apoyarme en la primicia de esta investigación. En paz descanse.

Gracias Dr. Atilano Contreras Ramos, Dr. José Jaime Zuñiga, M. en C. Moisés Armando Luis Martínez, Dr. Santiago Zaragoza Caballero, por su presencia y contribución.

Gracias a la M. en F. Ana Isabel Bieler Antolin del Laboratorio de Micrococine (Facultad de Ciencias) y a la Biol. Susana Guzmán del Laboratorio de Microscopía y Fotografía de la Biodiversidad (Instituto de Biología), por su gran colaboración.

Mis agradecimientos de manera muy especial a la UNAM y al INECOL.

A todos los científicos y artistas que aman explorar y expresar la vida.



# CONTENIDO

<b>Resumen</b> .....	6
<b>Abstract</b> .....	7
<b>Introducción</b> .....	8
<b>Justificación</b> .....	11
<b>Antecedentes</b> .....	12
Los caracteres sexuales y el dimorfismo sexual.....	12
Hipótesis de la evolución de estructuras sexuales primarias.....	15
La morfometría geométrica y el análisis de la variación de la forma biológica.....	17
Estudios de selección sexual en Melolonthidae.....	22
Genitales en Phyllophaga.....	24
Generalidades de las especies de estudio .....	28
Estructuras de estudio .....	30
<b>Objetivos</b> .....	33
Objetivo general.....	33
Objetivo particular .....	33
<b>Hipótesis</b> .....	34
<b>Material y métodos</b> .....	34
Ejemplares .....	34
Procesamiento de material y toma de fotografías.....	36
Procesamiento de imágenes .....	39
Análisis morfológico.....	45
Análisis multivariados. ....	45
<b>Resultados</b> .....	48
Variación morfológica en élitros de <i>Phyllophaga obsoleta</i> . ....	48
Variación morfológica en protibias de <i>Phyllophaga obsoleta</i> .....	51
Variación morfológica en parámetros de <i>Phyllophaga obsoleta</i> .....	55
Variación morfológica en élitros de <i>Phyllophaga mucorea</i> . ....	57
Variación morfológica en protibias de <i>Phyllophaga mucorea</i> . ....	60
Variación morfológica en parámetros de <i>Phyllophaga mucorea</i> .....	63
Variación interespecífica en élitros.....	66

Variación interespecífica en protibias. ....	68
Divergencia de la forma entre estructuras sexuales y no sexuales. ....	70
Covariación de estructuras sexuales y no sexuales. ....	72
<b>Discusión</b> .....	<b>76</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>82</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>84</b>

## Resumen

Los caracteres que se encuentran bajo selección sexual tienden a ser fenotípicamente más variables que los no sexuales. Dentro de los caracteres sexuales se encuentran las estructuras genitales, involucradas directamente en la cópula, pero también se incluyen aquellas que participan indirectamente, como en la búsqueda de pareja o el cortejo. En este trabajo se utiliza la morfometría geométrica para cuantificar la variación intraespecífica e interespecífica de dos estructuras sexuales (genitales y protibias) y una no sexual (élitro) en dos especies del género *Phyllophaga*, con historias de vida y distribuciones diferentes, para analizar patrones de dimorfismo sexual. Los resultados de este estudio sostienen que una estructura sexual varía más que una estructura no sexual, además se encuentra que hay dimorfismo interespecífico e intraespecífico en la forma y tamaño de las protibias. Por otro lado, los élitros muestran únicamente dimorfismo en tamaño. Este estudio nos proporciona un panorama sobre los mecanismos selectivos y patrones que operan en la historia evolutiva de distintas estructuras.

## Abstract

Characters that are under sexual selection tend to be phenotypically more variable than non-sexual ones. Within the sexual characters are the genital structures, directly involved in copulation, but also those that participate indirectly (search for a partner, courtship). In this work, geometric morphometrics is used to quantify the intraspecific and interspecific variation of two sexual structures (genitals and protibias) and a non-sexual one (elytra), in two species of the genus *Phyllophaga* with different life histories and distributions, to analyze patterns of sexual dimorphism. The results of this study argue that a sexual structure varies more than a non-sexual structure. They also suggest that there is interspecific and intraspecific dimorphism in the shape and size of protibias. On the other hand, the elytra show only dimorphism in size. This study provides us with an overview of the selective mechanisms and patterns that operate in the evolutionary history of different structures.



## Introducción

La notable diversidad de los genitales masculinos que se observa entre muchos grupos de artrópodos, ha generado diversas hipótesis para su posible explicación y ha estimulado un buen número de investigaciones respecto a los factores evolutivos que contribuyen con este fenómeno (Polihronakis, 2006). En términos generales se admite que la evolución de los genitales masculinos está caracterizada por una rápida divergencia, por lo que sus múltiples formas, proporciona en la mayoría de los casos, estados de carácter taxonómicamente informativos al nivel de especie (Arnqvist, 1998, d'Hotman y Scholtz, 1990). Los genitales al ser estructuras directamente relacionadas con la reproducción se conocen como caracteres sexuales primarios (CSP) (Ghiselin, 2010).

En muchos grupos, la morfología genital masculina es más conocida que cualquier otra característica y en la mayoría de las investigaciones sobre la divergencia morfológica y la selección sexual, se han centrado en poner a prueba sólo patrones de selección en los genitales masculinos (Ah-King *et al.*, 2014; Eberhard, 2009; Polihronakis, 2006). Sin embargo, es importante destacar que, en el caso de los escarabajos, el mismo patrón evolutivo involucra también los genitales femeninos, aunque a menudo con características menos conspicuas y no tan fáciles de detectar como los masculinos. En el caso del género *Phyllophaga*, la genitalia es una característica taxonómica a nivel de especie (Coca-Abia *et al.*, 1993; Polihronakis, 2008a; Richmond *et al.*, 2016; Zunino, 2012).

El género de escarabajos fitófagos *Phyllophaga* Harris, 1827, es uno de los más diversos en la subfamilia Melolonthinae y sus especies se caracterizan por presentar una morfología externa conservada, pero una gran diversidad de genitales extraordinaria en ambos sexos (Morón, 2006; Polihronakis, 2008a; Smith, 1889). En este sentido, el género *Phyllophaga* es un buen grupo de estudio, ya que con ello se satisface la primera predicción de la selección sexual de acuerdo con Polihronakis (2006): "*los caracteres sexuales divergen, entre los individuos, más rápido que los no sexuales*".

Algunos de los rasgos que facilitan la diferenciación genital interespecífica son el grado de fusión de los parámetros, la longitud y presencia/ausencia de ornamentaciones en el edeago, en los machos, o el grado de convexidad de la placa pigidal, en el caso de las hembras. Además, se presenta una clara diferencia en la proporción de sexos, que oscila entre seis y quince machos por cada hembra, lo que propicia una intensa competencia por las hembras (Morón, 1986; 2006). Esto resulta interesante ya que a menudo, la divergencia evolutiva genital es más del doble en grupos en los que las hembras se aparean varias veces respecto a grupos donde las hembras se aparean sólo una vez (Arnqvist, 1998).

Además de los CSP, existen los caracteres sexuales secundarios (CSS), definidos por Darwin en 1871 (citado en Ghiselin, 2010), como aquellas diferencias entre los sexos (dimorfismo sexual), que de alguna forma están involucradas en la competencia por apareamientos entre los miembros de un mismo sexo y que no están directamente ligados a la reproducción. Algunos de los más evidentes en la

familia Melolonthidae, donde se incluye el género *Phyllophaga*, y que han sido analizados respecto a su función, son la longitud del cuerpo y de las antenas, el tamaño de las patas anteriores y de la proyección proesternal (Eberhard, 1993a), la superficie de las lamelas antenales (Romero-López *et al.*, 2004; citado por Martínez-Bonilla *et al.*, 2015), entre otros. Para este tipo de caracteres existen algunos trabajos donde se han estudiado su significado funcional, por ejemplo, para las especies de la familia Melolonthidae se cuenta con el trabajo de Eberhard (1993b), en el que se postula que la diversidad de modificaciones de algunos CSS en el género *Macrodactylus* Latreille, se debe a que funcionan como herramientas de cortejo para estimular la cópula. Entre los CSS más conspicuos en *Phyllophaga* se encuentran: sedas bien desarrolladas en la superficie del tórax y abdomen, espinas en la superficie ventral del fémur y tibias anteriores, "almohadillas" y pelos tarsales, longitud de maza antenal y número de antenómeros (Morón y Robbins, 2004; Morón, 2006).

Independientemente de las causas evolutivas de los CSS debido a la competencia entre machos, por selección de pareja por parte de la hembra o ambas, hay congruencia en el hecho de que los caracteres bajo selección sexual serán más variables fenotípicamente, a nivel de especie, que los caracteres no sexuales (Darwin, 1871; Eberhard, 1996), por la tendencia de la selección sexual de eliminar los intentos de la selección estabilizadora (Polihrnakis, 2006), lo cual sucede en una amplia diversidad de taxones animales, además de servir como señales de la calidad de los individuos (Muñoz y Cruz, 1999).

El propósito de este trabajo es analizar los patrones de variación inter e intraespecífico en dos especies del género *Phyllophaga* con historias de vida y distribuciones notablemente diferentes, con el objetivo de comparar los posibles efectos que tiene la presión de la selección natural en dos especies con condiciones ecológicas y posiblemente etológicas diferentes.

## Justificación

Las especies del género *Phyllophaga* se destacan por el particular contraste entre la heterogénea y compleja ornamentación de sus genitales contra una aparente morfología externa conservadora (Polihronakis, 2006; Morón, 2006) por lo que han funcionado como elementos modelo en el estudio de la selección sexual, para poner a prueba algunas de las predicciones que involucran este proceso (Morón, 2006; Polihronakis, 2006; 2008; 2008b; Richmond *et al.*, 2016). Es un género que se ha diversificado ampliamente a lo largo de la República Mexicana, teniendo especies cosmopolitas, como es el caso de *P. obsoleta*, y algunas aisladas, como *P. mucorea*.

El presente estudio se enfoca en estudiar la variación de genitales masculinos de dos especies del género *Phyllophaga* (*P. obsoleta* y *P. mucorea*) con historias de vida y distribución geográfica completamente diferentes, utilizando herramientas de morfometría geométrica, para analizar patrones de expresión morfológica de los genitales, y cuantificar, visualizar y contrastar esta información con la variación de un CSS (protibia) y un carácter sexualmente neutro (CSN)

(élitro), con el propósito de estudiar la evolución fenotípica y la selección sexual. Realizar comparaciones cuantitativas sobre la variación morfológica en rasgos genitales y no genitales, permite hallar patrones de la forma y tamaño en éstos, (Klaczko *et al.*, 2015; Rowe y Arnqvist, 2012; Song y Bucheli, 2010) y lograr un mejor entendimiento de su función biológica y de los mecanismos que actúan sobre ellos.

## **Antecedentes**

### **Los caracteres sexuales y el dimorfismo sexual**

Dentro del contexto sexual de un organismo se consideran como atributos sexuales aquellos caracteres que están involucrados en todo el proceso reproductivo, incluyendo procesos precigóticos y fertilización (Ghiselin, 2010). Una de las diferencias básicas entre los sexos son las gónadas: la posesión de ovarios en un lado y testículos en el otro, los cuales podemos definir como caracteres sexuales primarios (Darwin, 1871) (Figura 1). Además, hay estructuras que son consideradas genitales secundarios ya que se encuentran distantes a los genitales primarios (albergan el esperma desde el gonóporo masculino para luego introducirlo en la hembra) y muestran el mismo patrón evolutivo de divergencia rápida como los genitales primarios, por lo que generalmente han sido incluidos en discusiones de evolución genital de este tipo de caracteres (Eberhard, 2004b; Eberhard, 2010; Ghiselin, 2010; Song y Bucheli, 2010).

Hay otras estructuras que no están físicamente cerca a los genitales, y que se especializan en palpar partes no-genitales de la hembra, es decir, no están involucradas directamente con la reproducción sexual, pero funcionan en el cortejo para estimular o sujetar a la hembra (Eberhard, 1993b; 2009; 2010; Ghiselin, 2010). Este tipo de estructuras son considerados como caracteres sexuales secundarios (CSS), y también muestran un patrón similar de divergencia relativamente rápida y dimorfismo sexual (Eberhard, 2010; Ghiselin, 2010; Voje, 2016). Aquellos ornamentos involucrados en la elección de pareja o en el combate entre machos también son considerados CSS (Pizzo *et al.*, 2012) (Figura 1).

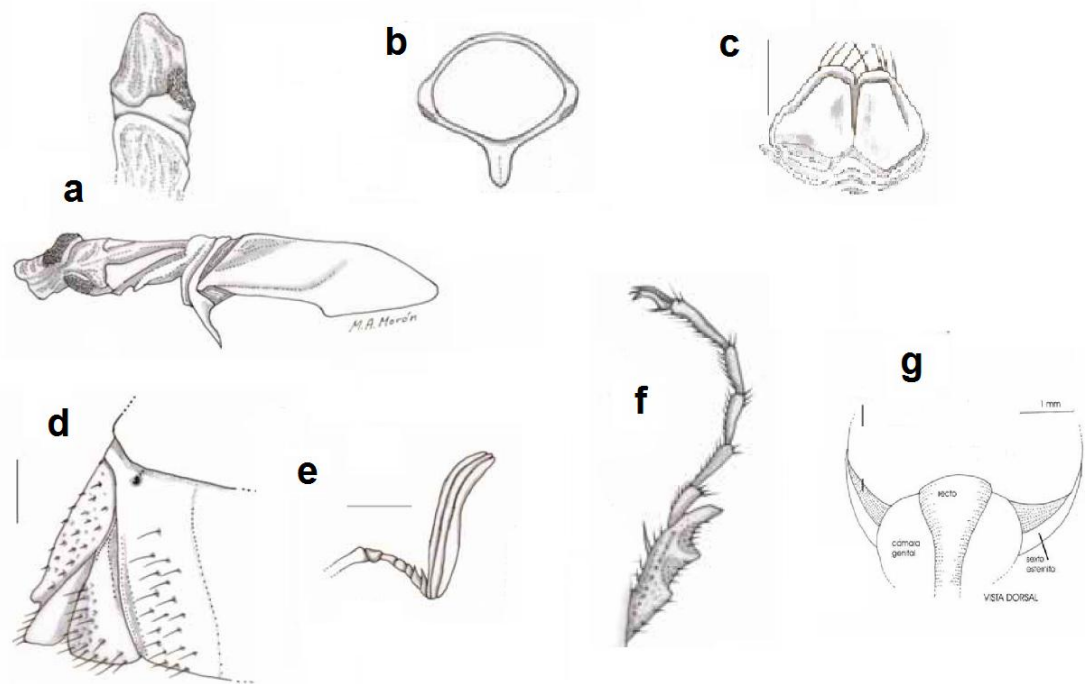


Figura 1. Caracteres sexuales en *Phyllophaga* sp. Caracteres sexuales primarios: (a) edeago; (b) parámetros; (c) placas genitales. Caracteres sexuales secundarios: (d) sedas en la superficie del abdomen; (e) lamelas antenales; (f) patas delanteras; (g) cámara genital femenina (Tomado de Morón, 2006; Romero-López *et al.*, 2009).

Darwin (1871) señaló que ciertas diferencias entre machos y hembras tienen que ver con la competencia por apareamientos, entre miembros del mismo sexo, lo que él había llamado selección sexual y que actualmente considera dos procesos: (1) competencia entre machos (competencia intrasexual) y (2) selección de pareja por parte de la hembra (Muñoz y Cruz, 1999). La selección sexual ha sido considerada el principal mecanismo responsable del dimorfismo sexual en insectos (Benítez, 2013; Eberhard, 2004a); sin embargo, también puede ser producto de otras presiones que operan bajo la selección natural, como son los factores ecológicos, la competencia interespecífica, fecundidad, etc. (Berns, 2013; Jannot y Kerans, 2003).

Una de las evidencias más notable y común del dimorfismo sexual es el tamaño corporal, pues generalmente las hembras son más largas que los machos, lo que puede significar una adaptación ligada a la fecundidad (Benítez, 2013; Jannot y Kerans, 2003). Además del dimorfismo sexual en tamaño, las hembras y los machos pueden diferenciarse por la forma (Berns, 2013; Virginio *et al.*, 2015) y aunque ésta puede contribuir de manera significativa a varias funciones como la alimentación, el apareamiento, el cuidado parental y otras características en la historia de vida, los patrones de dimorfismo de la forma han recibido históricamente menos atención que las diferencias sexuales en tamaño (Berns, 2013). Por lo tanto, una de las tendencias que actualmente se ha propuesto es explorar en conjunto la forma y el tamaño, logrando cuantificar de manera más completa y profunda los mecanismos que subyacen al dimorfismo sexual, ya que las distintas partes de un

cuerpo pueden tener múltiples funciones y estar bajo la influencia de distintos agentes selectivos (Berns, 2013; Lemic *et al.*, 2014; Tatsuta *et al.*, 2001).

### **Hipótesis de la evolución de las estructuras sexuales primarias**

Son cuatro hipótesis principales las que tratan de explicar la evolución de la diversidad de las formas de las estructuras genitales en insectos (Brennan y Prum, 2015; Eberhard, 2010; Shapiro y Porter, 1989; Zunino, 2012). Las dos últimas son las más aceptadas e involucran a la selección sexual (Eberhard, 2010):

1. **Hipótesis llave–cerradura o del ajuste morfológico entre los genitales masculinos y femeninos.** Considera que la morfología de los genitales masculinos se ha moldeado para corresponder estrictamente con la morfología genital femenina y viceversa. En este contexto, se logra evitar perder una inversión larga, debido a una fertilización por espermatozoides heteroespecífico, y además, los machos también se benefician, aunque en menor medida, debido a sus gametos menos costosos. Si esta correspondencia no es adecuada, el apareamiento e inseminación se complica o imposibilita (Arnqvist, 1997; Eberhard, 2009).
2. **Hipótesis del pleiotropismo.** Asume que la morfología de los genitales masculinos no está relacionada directamente con el éxito reproductivo, por lo que la forma genital no está influenciada por la selección sexual, sino que está genéticamente vinculada con otros caracteres morfológicos



involucrados positivamente en el éxito reproductivo (Arnqvist, 1997; Zunino, 2012).

3. **Elección críptica femenina (ECF).** Postula que la variación de los caracteres sexuales masculinos está relacionada con la elección críptica de la hembra, ya que, en el caso de los genitales masculinos, ésta puede beneficiar aquellos diseños que proporcionen un mejor ajuste o estímulo (Eberhard, 1985, 1996; Arnqvist 1997; Klaczko *et al.*, 2015). Por lo tanto, la selección sexual por elección femenina se produce después de la cópula (selección postcopulatoria), mediante procesos, tales como transporte de esperma, oviposición, re-apareamiento, etc., además, los machos pueden desarrollar adaptaciones que incrementan su control reproductivo sobre las hembras (Eberhard, 1996; 2009; 2010).

4. **Coevolución sexual antagonista (CSA).** Propone que los intereses tanto del macho como de la hembra respecto a situaciones asociadas a la cópula, inseminación y fertilización no son idénticos, y que los machos y hembras están comprometidos en carreras coevolutivas por el control de estos procesos (Alexander *et al.* 1997; Arnqvist y Rowe 2005; Chapman *et al.* 2003; Holland y Rice 1998). En este contexto los genitales en ambos sexos evolucionan bajo selección recíproca que actúa en todas las etapas de la cópula mediante interacción recíproca de estimulación mutua, por lo que el proceso de divergencia de estructuras sexuales estaría más acentuado de acuerdo con el papel que tiene cada estructura durante la cópula (Zunino,

2012).

Estas dos últimas hipótesis asumen la rápida divergencia de los genitales masculinos como resultado de su coevolución con los genitales femeninos, por lo que puede llegar a ser difícil discriminar entre ellas. En teoría, ambas podrían actuar simultáneamente, reforzándose o contrarrestando una a la otra, incluso secuencialmente sobre un mismo rasgo (Eberhard, 2010; Klaczko *et al.*, 2015). Una revisión llevada a cabo por Eberhard (2010), con la finalidad de discriminar entre estas dos últimas hipótesis, indica que es poco probable que la CSA, haya tenido una mayor influencia en explicar los patrones de evolución de los genitales por lo que resalta que es necesaria una aplicación experimental de pruebas más directas sobre la ECF, que incluyan modificaciones de la forma genital masculina y de las capacidades sensoriales de la hembra. De esta forma es posible lograr un análisis más directo del comportamiento genital y posibles interacciones hembra-macho durante la cópula.

### **La morfometría geométrica y el análisis de la variación de la forma biológica**

El análisis de la forma de las estructuras tiene un aporte relevante en estudios biológicos, ya que una gran variedad de procesos, como enfermedades o lesiones, desarrollo ontogenético, adaptación a factores geográficos locales, o diversificación evolutiva a largo plazo, entre otros, producen diferencias de la forma entre individuos o sus partes, y su aplicación se ha enfocado en entender diversas causas de la variación y transformación morfológica (Roth y Mercer, 2000; Zelditch

*et al.*, 2004). Las discrepancias en la forma pueden ser causa de diferentes funciones desempeñadas por las mismas partes, diferencias en las respuestas a las mismas presiones selectivas (o diferencias en las presiones selectivas), así como diferencias en procesos de crecimiento y morfogénesis (Zelditch *et al.*, 2004).

Tradicionalmente, la morfometría se realizaba aplicando estadística univariada o multivariada a medidas de longitud, profundidad, anchura, ángulos y radios, pero con el paso del tiempo ha sido evidente que tal conjunto de datos contiene relativamente muy poca o ninguna información sobre la forma, limitando las posibles interpretaciones biológicas (Adams *et al.*, 2013; Rohlf, 1990; Rohlf y Marcus, 1993; Zelditch *et al.*, 2004). Como resultado, en la década de los 80's, la morfometría tomó un cambio y enfoque diferente en el análisis y cuantificación de la variación de las estructuras morfológicas, pues se buscaba capturar la información geométrica de las estructuras (Adams *et al.*, 2004; 2013).

Gran parte de esta notable revolución resultó de definir con precisión qué es la "forma", y desarrollar y entender los procedimientos analíticos y las implicaciones matemáticas de esa definición (Mitteroecker y Gunz, 2009). Kendall (1977) definió la "forma" como "*toda la información geométrica que permanece cuando la ubicación, dimensión y los efectos de rotación se filtran de un objeto*". Los primeros trabajos que tenían sustento con esta definición, comenzaban sus análisis con el registro de coordenadas de los hitos o *puntos de referencia* (Adams, 1999; Toro *et al.*, 2010). Los hitos son puntos anatómicos homólogos, o al menos de correspondencia de ubicación, que pueden ser reconocidos como el mismo locus

en todas las muestras de un estudio (Elewa, 2010; Webster y Sheets, 2010), por lo tanto, son puntos fijos que pueden ser descritos por coordenadas cartesianas, tanto en formas bidimensional  $(x, y)$  como en formas tridimensionales  $(x, y, z)$  (Toro *et al.*, 2010). Cabe resaltar que en los estudios de morfometría geométrica se ha considerado que el tamaño de la muestra empíricamente debe ser tres (Monteiro *et al.*, 2002) o cuatro veces la cantidad de hitos (Bookstein, 1996).

Después de la adquisición de las coordenadas de los hitos, el siguiente paso se basa en una métrica conocida como distancia Procrustes, que mide la cantidad de diferencias de la forma (Richtsmeier *et al.*, 2002; Zelditch *et al.*, 2004). Esta técnica, llamada análisis Procrustes, superpone todas las configuraciones de hitos de todos los especímenes a un sistema común de coordenadas, generando un nuevo conjunto de variables, pues en este procedimiento todas las configuraciones son trasladadas a un origen, escaladas a un mismo tamaño (tamaño centroide) y rotadas hasta minimizar el total de la suma del cuadrado de las distancias de los hitos de las configuraciones respecto a una configuración de referencia, que es generalmente la media de la muestra (Adams *et al.*, 2013; Klingengber, 2013b; Rohlf 1999; Monteiro *et al.*, 2000). La configuración promedio es el punto en el espacio de la forma que tiene la suma mínima de distancias Procrustes desde cada punto (especimen) en la muestra, y puede ser estimada de forma iterativa por una serie de superposiciones (Monteiro *et al.*, 2000; Slice, 2007). Este procedimiento es conocido como análisis generalizado Procrustes (GPA) y es el más utilizado, aunque también existen otros métodos de superposición como

registro de deslizamiento de base (SBR), Coordenadas de la forma de Bookstein (BC) y Ajustes Resistente de Superposición (RFSP) (Zelditch *et al.*, 2004).

Todos estos métodos difieren principalmente en el grado en el cual el tamaño, posición y escala son removidos (Figura 2) (Webster y Sheets, 2010; Zelditch *et al.*, 2004). Una vez realizada la superposición, las configuraciones se encuentran ubicadas dentro de un espacio curvo de la forma llamado espacio de Kendall y para poder realizar análisis multivariados necesitan ser proyectadas ortogonalmente a un espacio lineal tangente (Adams *et al.*, 2013).



Figura 2. Variación ontogénica en el cuerpo de la piraña *Serrasalmus gouldingi* visualizada en tres métodos de superposición: (a) Coordenadas de la forma Bookstein con línea de base 1-7; (b) Registro de deslizamiento de línea de base, con la misma línea de base anterior; (c) Superposición Procrustes (Tomado de Zelditch *et al.*, 2004).

En este punto es posible aplicar la estadística multivariada como es el análisis de tipo exploratorio y el análisis para las pruebas de hipótesis (Mitteroecker *et al.*, 2013; Toro *et al.*, 2010). Con este cambio tan fundamental, en la teoría de medición, la morfometría geométrica se ha convertido en una poderosa herramienta para la evaluación objetiva de la variación de la forma, y actualmente es aplicada en los estudios de las ciencias morfológicas, como la morfología

descriptiva y/o la morfología evolutiva, pues su conocimiento no sólo es importante ya que representa una nueva técnica de análisis, sino que también lo es como parte del conocimiento general fundamental en la formación y actualización de un morfológico (Adams *et al.*, 2004; Cardini y Loy, 2013; Toro *et al.* 2010; Zelditch *et al.*, 2004).

### **Estudios de selección sexual en Melolonthidae**

Desde hace 40 años se comenzaron a realizar estudios de selección sexual en Melolontinos (Zunino, 2012). En México fue Morón (1988), quien se interesó en describir el dimorfismo sexual en las uñas tarsales de una especie del género *Phyllophaga*, así como, ilustrar los genitales de ambos sexos. Los estudios sobre conducta sexual en coleópteros comenzaron en los 90's, cuando Eberhard (1992) realizó observaciones de interacciones interespecíficas en tres especies sintópicas del género *Macroductylus* para tratar de explicar la divergencia genital de los machos. Encontró que generalmente las hembras tienen la habilidad de evitar inseminaciones conespecíficas, pero a la vez pueden aparearse múltiples veces. Junto a esto, observó que los machos se comportan en el cortejo como si estuvieran bajo selección por parte de la hembra. Un año después, amplió su estudio haciendo descripciones y observaciones de estructuras (cerdas, patas) de los machos de estas especies para entender su significado funcional en el contexto sexual y llegó a la conclusión de que las cerdas ventrales pueden tener función estimulante durante el cortejo, y que las patas en los machos les permiten frotar zonas de la hembra o son usadas para defensa en ambos sexos (Eberhard,

1993b). También estudió el acoplamiento de *P. obsoleta*, y observó que, durante la cópula, la prominencia preapical de la placa pigdial femenina coincide con el surco de la placa anal y el quinto esternito masculino, en tanto que la depresión esternal amplia del abdomen del macho cubierta con abundantes sedas yace sobre el extremo distal de los élitros de la hembra, y también que ambos sexos se estimulan mutuamente con sus patas en el proceso (Eberhard, 1993a; Morón, 2006)

Polihronakis (2006) realizó un análisis morfométrico en el género *Phyllophaga*, en el cual demuestra que los genitales varían en la forma significativamente más que el élitro, y en el año 2008, la misma autora hizo un estudio más completo donde analizó la evolución de ciertos rasgos dimórficos en algunas especies de este género. La primera parte de la investigación propone una hipótesis filogenética para trazar la evolución de los genitales masculinos y femeninos. Sus resultados muestran que, en los genitales masculinos, los parámetros simétricos son un carácter ancestral que fue evolucionando de manera direccionada hacia la asimetría, y en los femeninos ha sido más ramificada, ya que en muchos grupos se comparten muchas formas. También analizó la estructura geográfica con ADN mitocondrial y la forma de los genitales de ambos sexos, encontrando que los genitales femeninos tienen mayor estructuración geográfica que los masculinos.

Romero López *et al.* (2004) hallaron varios tipos de sensilas en las lamelas antenales de *P. obsoleta*, las cuales pueden estar involucradas en la recepción de feromonas. Complementando este estudio, Romero-López *et al.* (2009),



describieron parte del "*llamado sexual*" de *P. obsoleta*, donde caracterizaron la parte terminal del abdomen y la cámara genital femenina, una estructura en forma de bolsa ubicada en la terminalia posterior del octavo segmento abdominal, que libera feromonas para atraer a los machos. Finalmente, Martínez-Bonilla *et al.* (2015) retomaron la línea de investigación de *Macroductylus* e hicieron un estudio comparativo de morfometría lineal en dos especies de este género para hallar dimorfismo sexual en antenas y cuerpo, donde encontraron diferencias significativas en la longitud de cuerpo, longitud del flagelo y maza antenal en ambas especies.

Muchos de estos estudios proveen las bases y sustento para las líneas de investigación evolutiva, en este caso, dirigidos a la teoría de selección sexual, además de que especies, como las de *Phyllophaga*, caracterizados por tener genitales conespecíficos, han funcionado adecuadamente en investigaciones de divergencia y evolución bajo selección sexual (Polihrnakis, 2006).

### **Genitales en *Phyllophaga***

En coleópteros, los genitales masculinos consisten en un sistema de doble tubo que se ajustan mutuamente; un tubo interior formado por el lóbulo medio y un tubo externo formado por el tegmen (pieza basal y parámetros) (Metcalf, 1932). El lóbulo medio es una estructura membranosa o esclerosada que forma parte del sistema interno genital junto con el saco interno y temonas (d'Hotman y Scholtz, 1990). En Scarabaeoidea, si bien hay una configuración general, también existe

mucha variación en forma, tamaño y grado de esclerosamiento, aunque en la mayoría de los Scarabaeoidea superiores, está reducido a una estructura membranosa que es continua y difícil de distinguir del saco interno (d'Hotman y Scholtz, 1990). Esta última, es una estructura membranosa que es evaginada a través de una abertura (llamada ostium) en el momento de la cópula y en muchos casos, su armadura es útil para la caracterización taxonómica de las especies (d'Hotman y Scholtz, 1990). Las temonas son una estructura alargada y pareada que se extienden dentro de la pieza basal y en *Phyllophaga* forman una estructura que envuelve al saco interno (d'Hotman y Scholtz, 1990) (Figura 3).

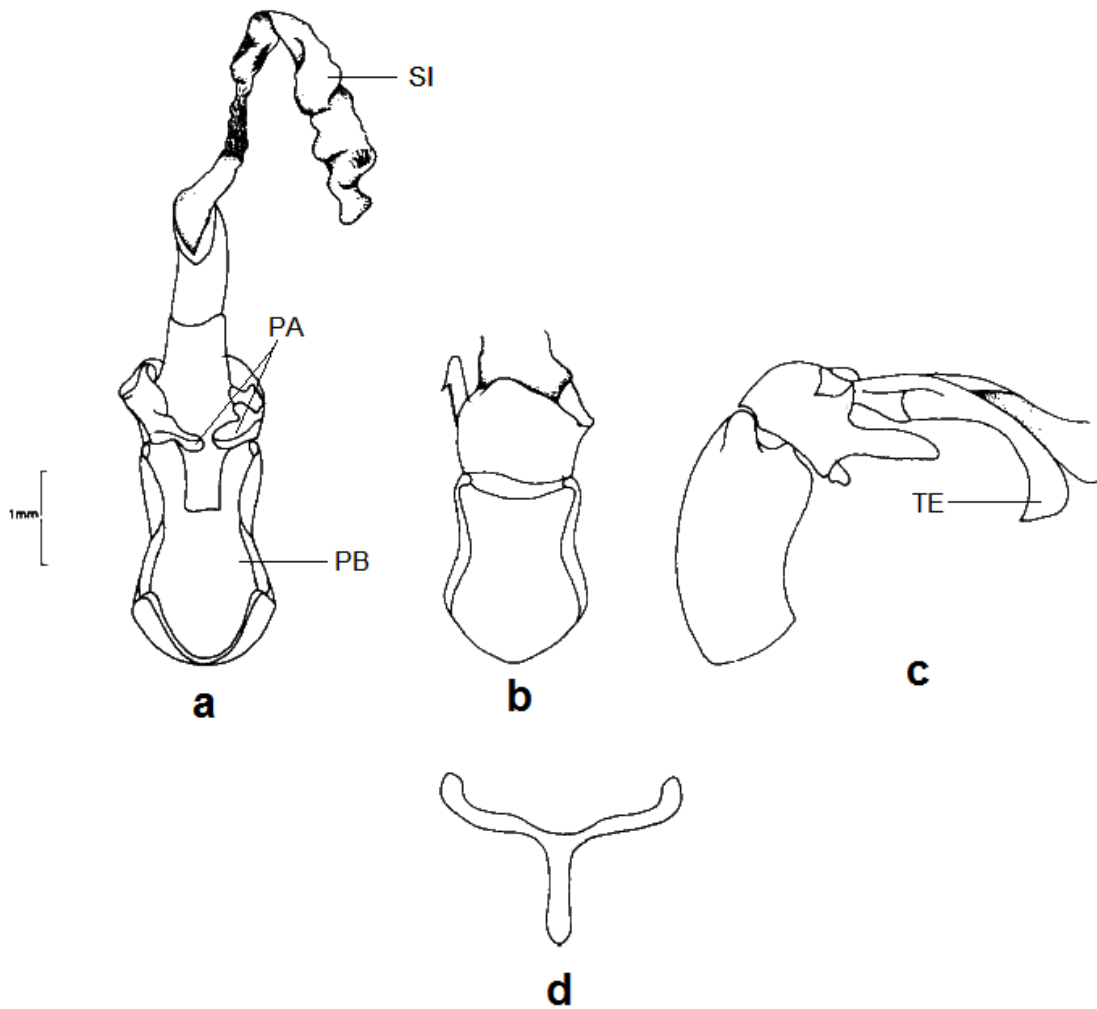


Figura 3. Esquema general de los genitales masculinos de *Phyllophaga* sp. (PB: Pieza basal, PA: parámetros, TE: temonas): (a) vista ventral; (b) vista dorsal; (c) vista lateral; (d) segmento genital o *spiculum gastrale* (Modificado de d'Hotman y Scholtz, 1990).

Los parámetros representan la parte distal del tegmen y son un par de escleritos que rodean al lóbulo medio (Figura 4), y en general, son las estructuras que presentan la mayor diversidad morfológica, aunque mantienen una gran especificidad a nivel especie (Morón, 2006; Richmond *et al.*, 2016). En la parte basal de los parámetros podemos encontrar una estructura menos quitinizada, en

forma de "Y" invertida, que se sujeta a éstos mediante membranas, es llamada *spiculum gastrale* (Benítez-Herrera *et al.*, 2015). Generalmente los parámetros son estructuras simétricas, sin embargo, hay casos de asimetría presente en muchos grupos, incluyendo a algunos subgéneros de *Phyllophaga* (Polihronakis, 2008b). Suelen ser estructuras móviles, pero en algunos casos, debido a su parcial o total fusión con la pieza basal, la movilidad es restringida. Su función principal es dar soporte al lóbulo medio, aunque se han encontrado sedas y sensilas que sugieren una función sensorial durante la cópula (d'Hotman y Scholtz, 1990; Vaz de Mello *et al.*, 2002).

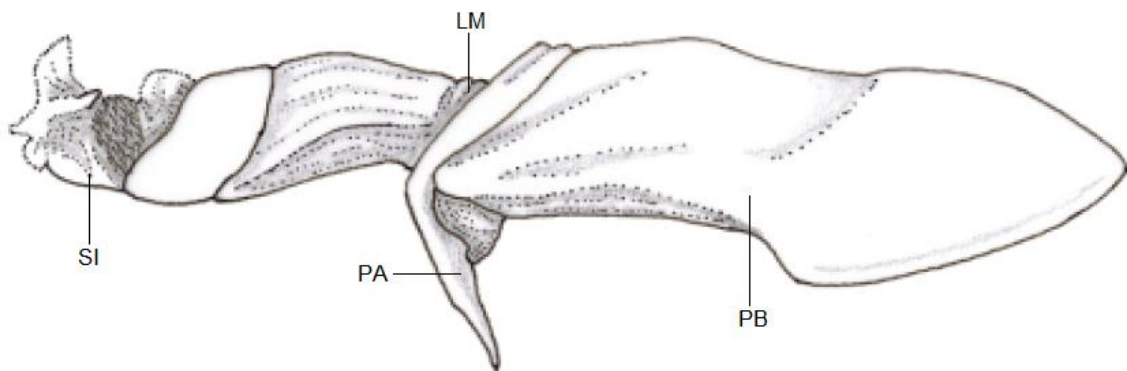


Figura 4. Vista lateral de los genitales masculinos de *P. obsoleta*: (SI) Saco interno (PA) Parámetros (LM) Lóbulo medio (PB) Pieza basal (Modificado de Morón, 2006).

Algunos autores se refieren al tegmen como "cápsula genital" y a toda la estructura genital interna (saco interno, lóbulo medio) como "edeago" (Morón, 2006), otros usan el término "edeago" para referirse a los genitales en su totalidad (d'Hotman y Scholtz, 1990), incluso hay quienes dividen el tegmen en pieza basal, tecto y parámetros (Ramírez-Ponce y Morón, 2012; Benítez-Herrera *et al.*, 2015).

En *Phyllophaga*, algunos de los rasgos que facilitan la diferenciación genital interespecífica son el grado de fusión y simetría de los parámetros, la longitud y presencia/ausencia de ornamentaciones en el edeago (Morón, 2006; Polihronakis, 2008b).

### **Generalidades de las especies de estudio**

***Phyllophaga obsoleta* (Blanchard, 1851).** La longitud corporal de esta especie oscila entre 16 a 20 mm, tienen cuerpo ovalado y robusto; coloración parda amarillenta o parda rojiza. Esta especie habita en los bosques tropicales, subtropicales, caducifolios, subcaducifolios y mesófilo de montaña, encinares, bosque de pino y encino, matorrales, así como en terrenos de cultivo ubicados desde el nivel de mar hasta los 2,667 m de altitud. Aparentemente en su etapa adulta no muestran preferencia específica de alimentación del follaje, ya que se les ha observado sobre diversas especies. Las larvas se desarrollan en el suelo, consumiendo principalmente raíces de gramíneas y en algunas regiones se han reportado como plagas agrícolas de los cultivos de maíz, alfalfa, caña de azúcar y papa (Morón, 2006; Morón *et al.*, 1997). Es una especie bastante común, con una amplia distribución geográfica desde el sur de los Estados Unidos, hasta Colombia y Venezuela (Figura 5). En México se localiza en los estados de Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Aguascalientes, Guerrero, San Luis Potosí, Estado de México, Nuevo León, Morelos, Hidalgo, Tamaulipas, Puebla, Veracruz, Oaxaca, Chiapas, Yucatán, Quintana Roo (Morón, 2006; Morón *et al.*, 1997). En etapa adulta se encuentran activos principalmente de abril a agosto (Morón, 2006; Aragón *et al.*,

2005).

***Phyllophaga mucorea* (LeConte, 1856)**. La longitud corporal de esta especie oscila entre 12.5-19 mm. Tienen cuerpo ovalado; coloración castaño-rojizo brillante. Se desconocen sus hábitos. En Estados Unidos ha sido colectada en los estados de Texas, California, Arizona, Kansas y Nuevo México, por lo que aparentemente es común en el suroeste de este país (Saylor, 1940). En México hay registros de Cabo San Lucas, Baja California Sur (Horn, 1878) (registro cuestionable de acuerdo con Saylor (1940)), y en Laguna Salada, en el norte de Baja California (los ejemplares de este trabajo provienen de esa zona) (Figura 5).



Figura 5. Distribución de *P. obsoleta* (círculos negros) y *P. mucorea* (círculos rojos) (Mapa realizado en <http://www.simplemappr.net/>).

## **Estructuras de estudio**

*Cápsula genital masculina* (CGM). Es una estructura compleja, pues consiste en un sistema doble: una estructura esclerosada básicamente a modo de cápsula (falobase y parámetros) (Figura 6b), que envuelve a otra membranosa, y es la estructura copuladora (edeago) (Figura 6c), y ambos componentes han sido descritos en muchas especies, aunque la segunda con menos atención. En *Phyllophaga obsoleta* la CGM presenta los parámetros completamente fusionados formando un anillo estrecho, pero con los ápices proyectados en forma de una laminilla media ventral ligeramente inclinada (Fig. 6 a y d). En *Phyllophaga mucorea* la CGM presenta los parámetros totalmente separados y solo se fusionan en la falobase, ambos ligeramente asimétricos, con una muesca distal y los ápices dirigidos hacia el centro; cada uno con forma de media luna, ensanchados en la zona media y adelgazados en la zona distal. Las caras de cada parámetro no son planas, pues en vista dorsal presentan concavidad (Figura 7) (Saylor, 1940). Se ha hipotetizado que los parámetros tienen un papel sensorial y mecánico durante la cópula (Eberhard, 1993a).

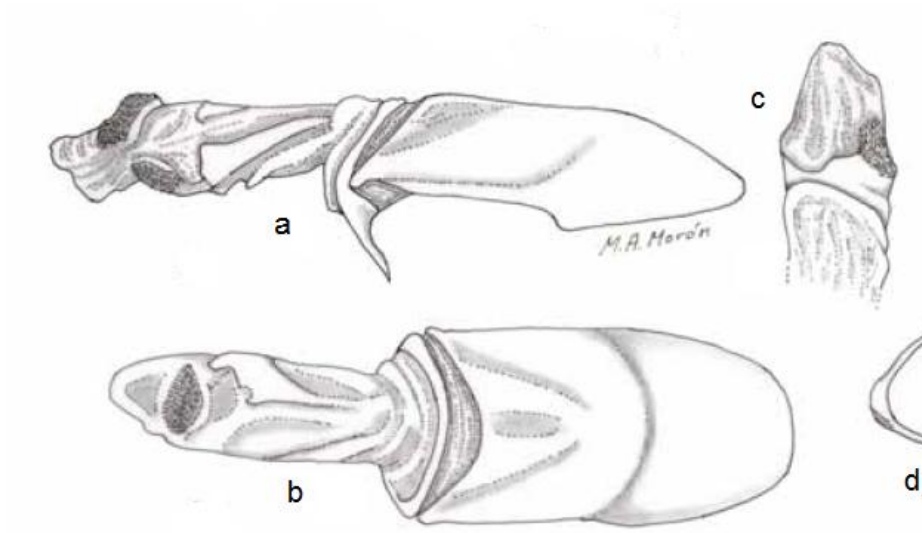


Figura 6. Genital masculino de *Phyllophaga obsoleta*. Jalisco, México. (a) Aspecto lateral de la cápsula genital con el edeago extendido; (b) Aspecto dorsal de la cápsula genital con el edeago extendido; (c) Detalle del ápice del edeago en vista central; (d) Aspecto dorsal de los parámetros, sin el edeago (Tomado de Morón, 2006).

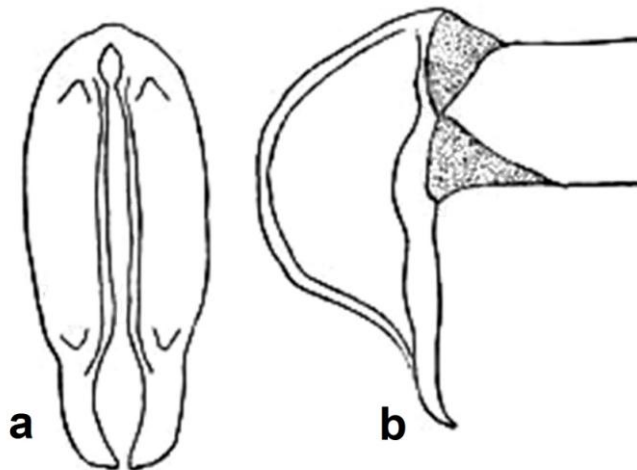


Figura 7. Genitales masculinos de *Phyllophaga mucorea*: (a) vista dorsal de los parámetros masculinos. (b) vista lateral de los parámetros masculinos (Tomado de Saylor, 1940).



*Protibia derecha* (CSS). Es el cuarto segmento de las patas delanteras y puede estar involucrado en asuntos que van más allá de la mecánica del traslado, pues en *Phyllophaga*, hay registros que durante la cópula ambos sexos se estimulan mutuamente con sus patas, por lo que podrían tener significado funcional durante el cortejo y la cópula (Eberhard, 1993a). Son estructuras que presentan sedas y ornamentaciones tuberculosas/espinosas, así como bordes con procesos particulares. En el caso de *Phyllophaga*, la protibia presenta tres procesos dentiformes en el borde externo y dimorfismo en el tamaño (Morón, 2006),

*Élitro derecho* (CSN). Son estructuras relativamente simples, pues cada élitro consiste de una sola pieza cóncava que protege y resguarda a su respectiva ala membranosa; sin embargo, son estructuras bastante rígidas que pueden variar en coloración, textura y tamaño (Morón, 2006). Ha sido considerada como sexualmente neutra debido a que no tiene ninguna función que la relacione con el cortejo y/o apareamiento (Polihronakis, 2006).

# Objetivos

## Objetivo general

Analizar la variación morfológica en dos estructuras sexuales y una sexualmente neutra en machos y hembras de dos especies de *Phyllophaga* Harris (*P. obsoleta* (Blanchard, 1851) y *P. mucorea* (LeConte, 1856)), para evaluar dimorfismo sexual y divergencia morfológica como un indicativo de tasas diferenciales de evolución.

## Objetivos particulares

1. Describir y comparar la variación morfológica intraespecífica e interespecífica de un CSP y CSS respecto a un carácter sexualmente neutro.
2. Describir la variación morfológica intraespecífica e interespecífica entre dos estructuras sexuales y una no sexual en machos de *Phyllophaga obsoleta* (Blanchard, 1851) y *Phyllophaga mucorea* (LeConte, 1856).
3. Describir la variación morfológica intraespecífica e interespecífica entre una estructura sexual y una no sexual en hembras de *Phyllophaga obsoleta* (Blanchard, 1851) y *Phyllophaga mucorea* (LeConte, 1856).
4. Cuantificar y describir la divergencia morfológica interespecífica entre dos estructuras sexuales y una no sexual de *Phyllophaga obsoleta* (Blanchard, 1851) y *Phyllophaga mucorea* (LeConte, 1856).
5. Evaluar covarianza intraespecífica entre dos estructuras sexuales y una no sexual de *Phyllophaga obsoleta* (Blanchard, 1851) y *Phyllophaga mucorea* (LeConte, 1856).

## Hipótesis

Los caracteres sexuales presentan mayor variación y divergencia morfológica que los caracteres no sexuales debido a que están sujetos a constantes selecciones direccionales en la competencia por apareamientos o en la elección de pareja.

## Material y métodos

### Ejemplares

Se obtuvieron 68 machos y 59 hembras de *Phyllophaga*, de la colección entomológica del Instituto de Ecología A.C. *Phyllophaga obsoleta* (n= 29 ♂; 25 ♀) (Figura 8) y *Phyllophaga mucorea* (n= 39 ♂; 34 ♀) (Figura 9).

Los ejemplares de *Phyllophaga obsoleta*, provienen de los estados de Veracruz, Chiapas, Hidalgo, Querétaro, Estado de México, Morelos, Guerrero, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Michoacán, mientras que los de *Phyllophaga mucorea* provienen de Laguna Salada, ubicada en el norte de Baja California.

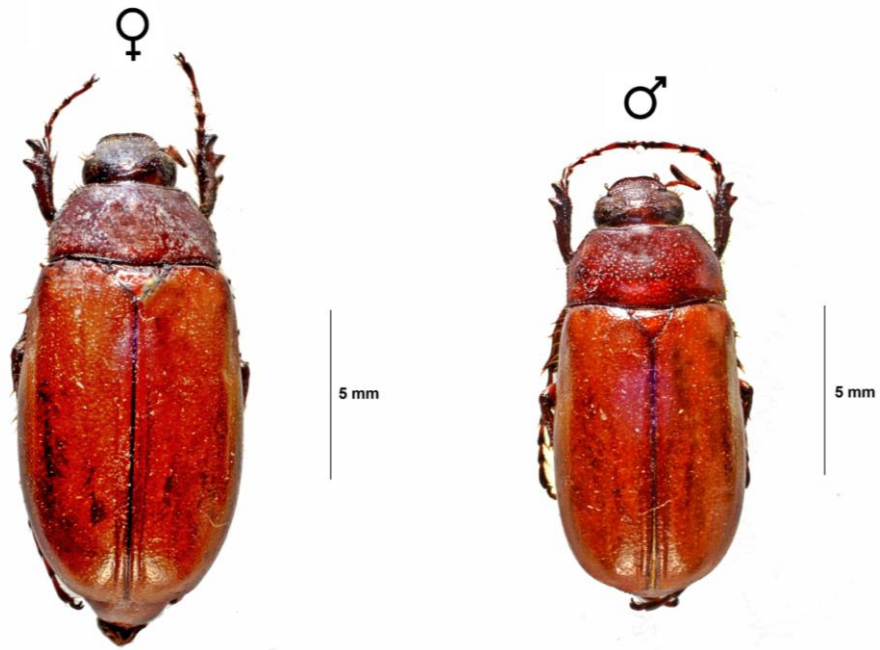


Figura 8. Ejemplares de *Phyllophaga obsoleta*.

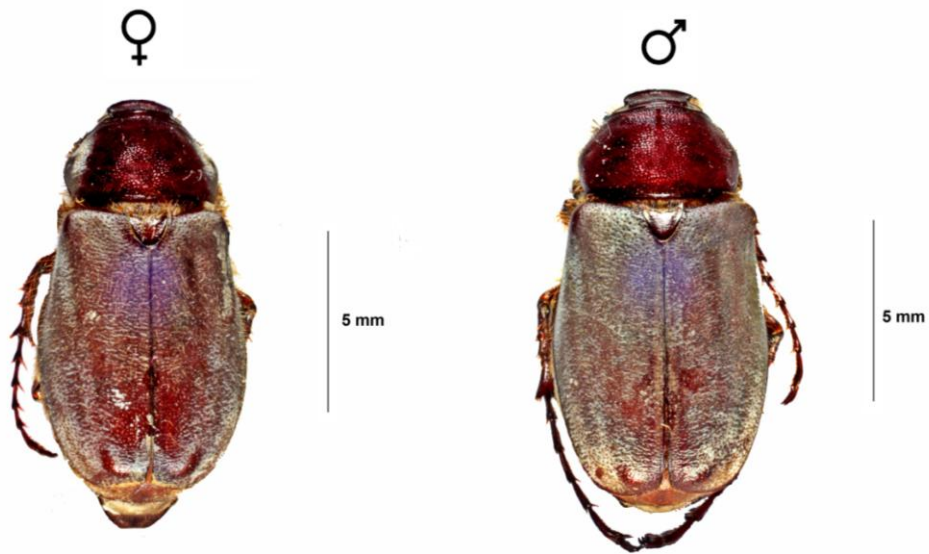


Figura 9. Ejemplares de *Phyllophaga mucorea*.

## **Procesamiento de material y toma de fotografías**

Los ejemplares fueron reblandecidos y remontados para diseccionar los genitales y facilitar el análisis de las estructuras. Las fotografías se tomaron con un microscopio estereoscópico multifocal Leica Z16AP0A y una cámara asociada Leica DFC 490 con el programa Leica Suites software V. 4.3., que se encuentra en el laboratorio de fotografía del Instituto de Biología de la UNAM, así como con un microscopio estereoscópico y una cámara digital ubicados en el laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias, UNAM. Las estructuras fotografiadas para el análisis fueron:

*Cápsula genital masculina (CSP)*. La cápsula genital de cada ejemplar fue montada sobre una lámina de cartulina y los parámetros, considerados como las estructuras con mayor variación morfológica interespecífica, se fotografiaron distalmente (Figura 10 y 11).

*Protibia derecha (CSS)*. Se fotografiaron dorsalmente, colocando la estructura en el plano horizontal (Figura 12). Es importante mencionar que en la mayoría de los ejemplares se trabajó con la protibia derecha, sin embargo, algunos la presentaron desgastada por lo que en estos casos se utilizaron las izquierdas, bajo el criterio de simetría bilateral.

*Élitro derecho (CSN)*. Se fotografiaron dorsalmente, colocando la estructura en el plano horizontal (Figura 13). En todos los ejemplares se trabajó con el élitro izquierdo, debido a que están libres del alfiler donde se montan los ejemplares.

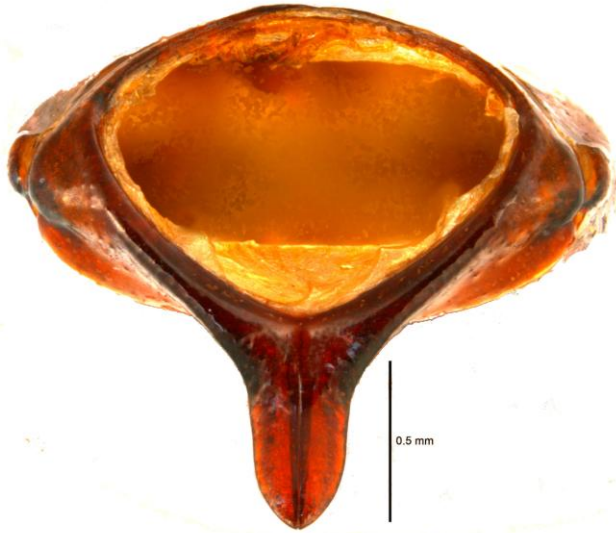


Figura 10. Genital masculino de *Phyllophaga obsoleta* en vista fronto-distal.



Figura 11. Genital masculino de *Phyllophaga mucorea* en vista fronto-distal.



Figura 12. Protibia derecha de *Phyllophaga mucorea* en vista dorsal.

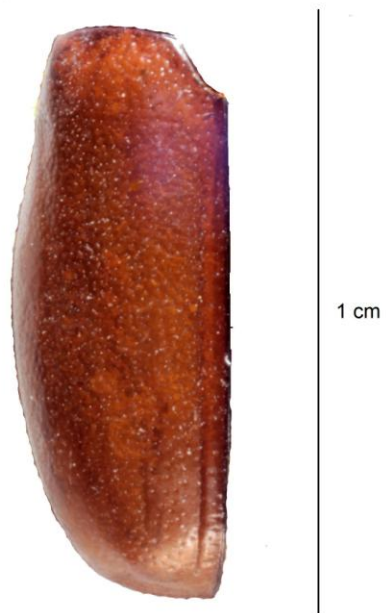


Figura 13. Élitro izquierdo de *Phyllophaga obsoleta* en vista dorsal.

## **Procesamiento de imágenes**

*Puntos de referencia y protocolos del registro de la forma.* El registro de la forma de las estructuras se llevó a cabo a partir de protocolos de plantillas diseñadas en el programa MakeFan6 (Sheets, 2006). Esto permitió generar las plantillas con el diseño de peines, abanicos y circunferencias, que sirvieron de guía en el registro de las coordenadas. Las plantillas fueron generadas a partir de puntos homólogos y están compuestas por líneas equidistantes para facilitar la captura de los contornos. Después de tener todas las fotos con las plantillas, se usaron tpsUtil versión 1.58 (Rohlf, 2015), para generar un archivo TPS, que juntara todas las fotos por cada estructura. Estos archivos se trabajaron en tpsDig versión 2.17 (Rohlf, 2013), para colocar las marcas que contienen el registro de coordenadas que se usaron en el análisis morfométrico, en este caso, en dos dimensiones (x,y).

*Diseño de plantillas en parámetros.* En el caso de *P. obsoleta*, los parámetros están completamente fusionados y se aprecian como una estructura anillada, por lo que el diseño de la plantilla para el registro de la forma y variación se ha definido con dos plantillas en forma de abanico a partir de tres puntos fijos que corresponden a la línea de fusión basal y apical de los parámetros; así como, el punto más lejano del ángulo lateral del anillo. Cada abanico está compuesto por 40 líneas y juntos definen la forma de todo el contorno (Figura 14).



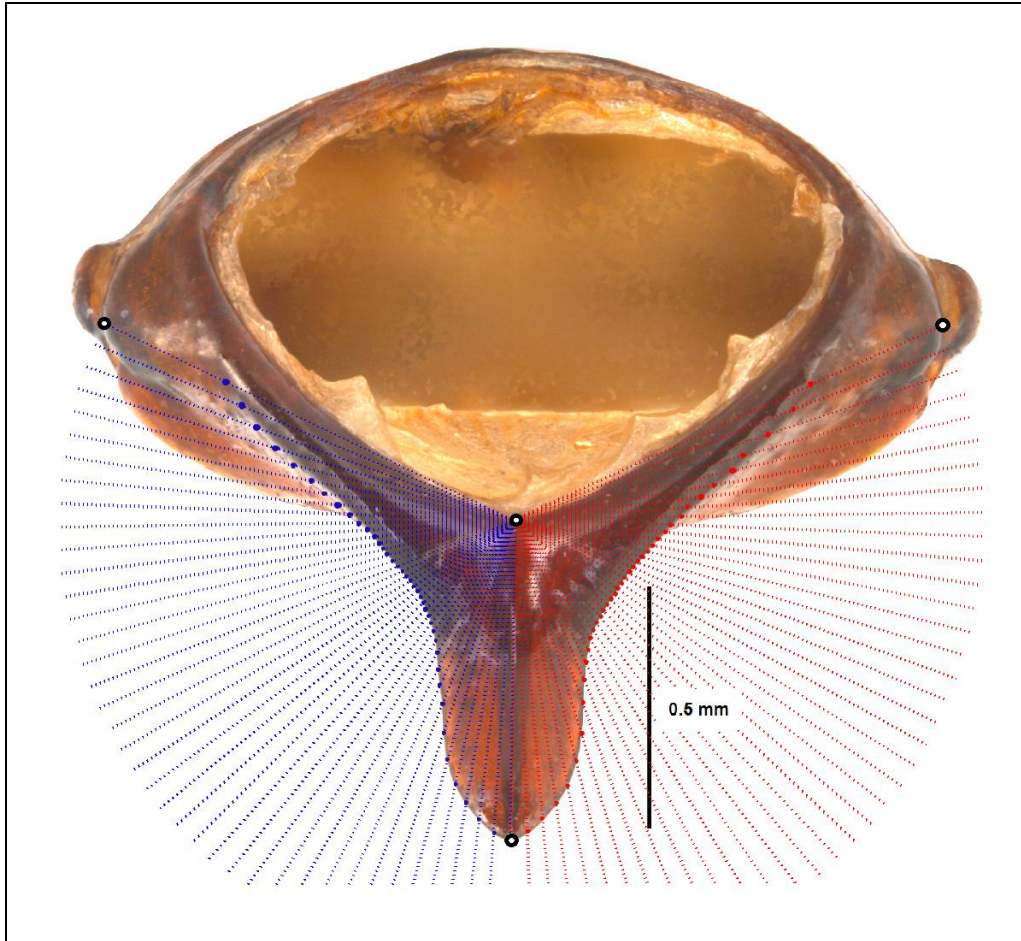


Figura 14. Genital masculino de *Phyllophaga obsoleta* en vista distal con el protocolo del registro de la forma del contorno de los parámetros definido por dos abanicos de 40 líneas cada uno, creados a partir de tres puntos fijos (círculos blancos).

En el caso de *P. mucorea*, los parámetros no se encuentran fusionados, y se aprecian como estructuras alargadas. Por lo tanto, ambos parámetros se trabajaron en imágenes independientes para facilitar la colocación de las marcas y sus formas se registraron mediante un protocolo de tres plantillas en forma de peine (Figura 15), colocadas en base a tres puntos fijos: uno en el ángulo superior interno de la sutura de los parámetros, otro en el ápice del dentículo ubicado en la parte basal y otro en el ápice del parámetro.

El protocolo de tres plantillas fue de la siguiente manera: 1) para el margen externo se definió un peine en con 40 líneas desde el ángulo superior interno de la sutura de los parámetros y el ápice del dentículo basal (Figura 16 a); 2) para el margen interno se diseñó un peine de 40 líneas fijado en el ángulo superior interno de la sutura de los parámetros, y en la parte más distal del ápice del parámetro (Figura 16 b); y, 3); el contorno externo del ápice de los parámetros con otro peine de 8 líneas ubicado en el ápice del dentículo basal y la parte más distal del ápice del parámetro (Figura 16 c). El mismo protocolo se aplicó para ambos parámetros.

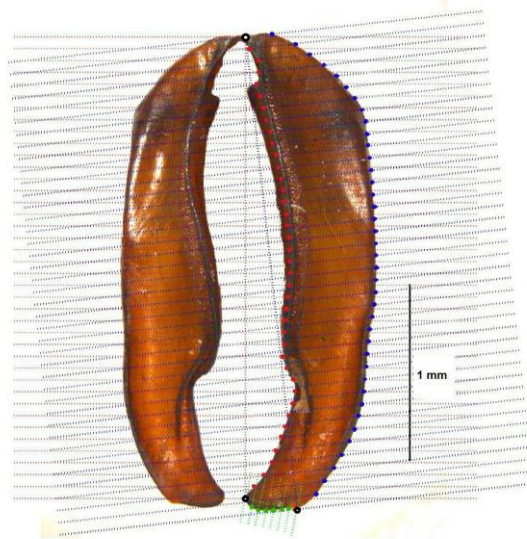


Figura 15. Genital masculino de *Phyllophaga mucorea* en vista distal con el protocolo del registro de la forma del contorno de los parámetros definido por tres peines, creados a partir de tres puntos fijos (círculos blancos).

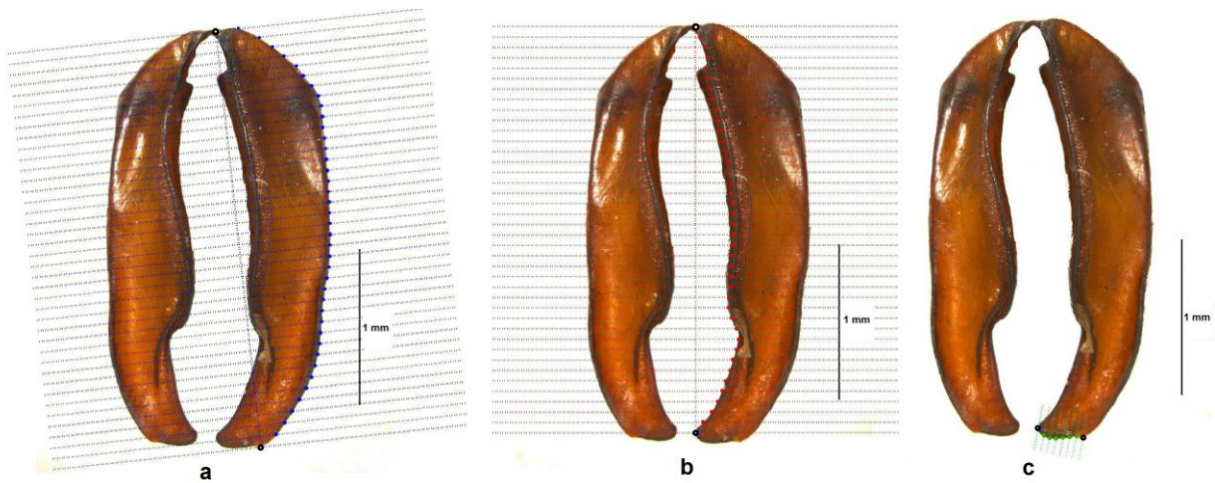


Figura 16. Registro a detalle de la forma de los parámetros de *Phyllophaga mucorea*: (a) Registro del margen externo del parámetro derecho; (b) Registro del margen interno del parámetro derecho; (c) Registro del margen externo del ápice del parámetro derecho. Los peines se hicieron a partir de tres puntos fijos (círculos negros con centro blanco).

*Diseño de plantillas en protibias.* En las dos especies de *Phyllophaga*, la protibia presenta tres dentículos externos que son puntos homólogos fácilmente reconocibles y a partir de los cuales se han fijado las marcas para el diseño de las plantillas. La variación de la forma de esta estructura se ha analizado, en ambas especies, con un protocolo de tres plantillas, un abanico y dos peines conectados a partir de tres puntos fijos: el ápice del dentículo superior e inferior, y el ángulo basal interno (Figura 17). El margen interno quedó definido con un abanico de 30 líneas fijado en el ápice del dentículo superior e inferior, y el ángulo basal interno (Figura 18a). Para el margen superior externo se diseñó un peine de 30 líneas fijado en el ápice del dentículo superior y el ápice del dentículo inferior (Figura 18b); y para el margen inferior externo se diseñó un peine de 20 líneas fijado en el ápice del dentículo inferior y el ángulo basal interno (Figura 18 c).

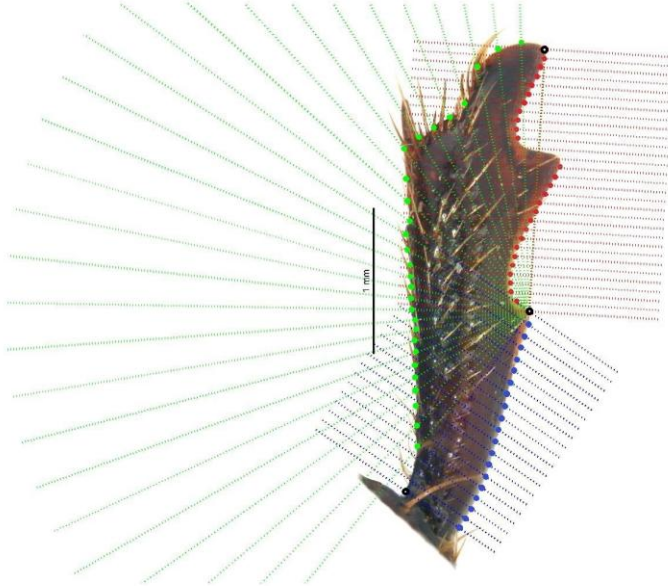


Figura 17. Protocolo para el registro de la forma de la protibia en vista dorsal de *Phyllophaga obsoleta*, creado a partir de tres puntos fijos (círculos negros con centro blanco).

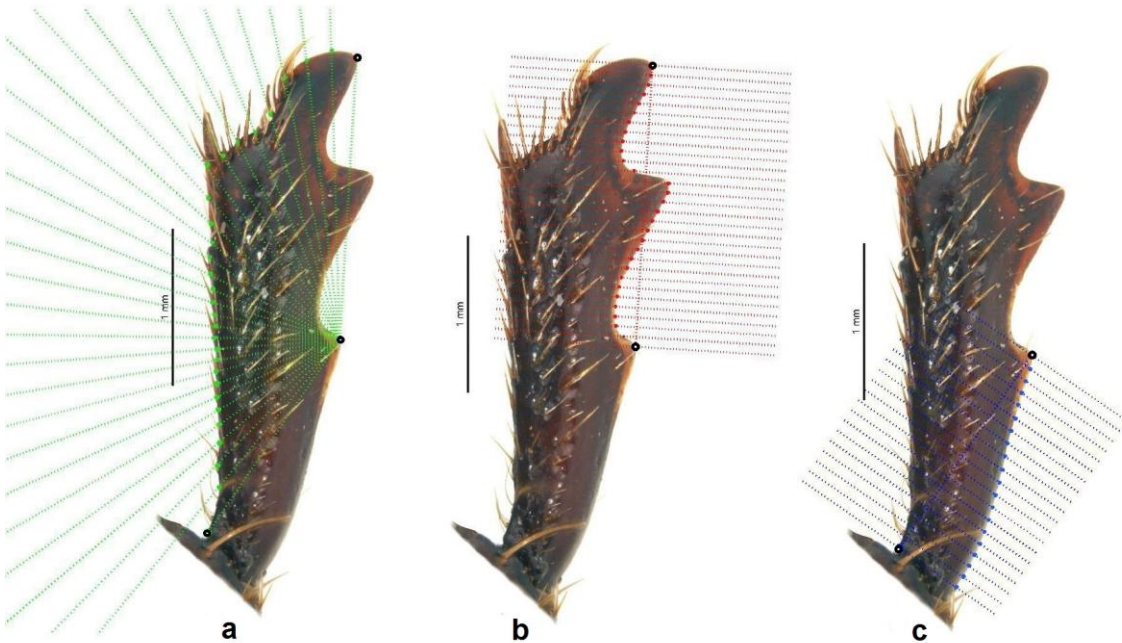


Figura 18. Registro a detalle de la forma de las protibias de *Phyllophaga obsoleta* en vista dorsal. El abanico y los peines se hicieron a partir de tres puntos fijos (círculos negros con centro blanco).

*Diseño de plantillas en élitros.* En las dos especies estudiadas, el élitro es una estructura semioval, con el margen interno casi recto y el margen externo ampliamente curvo y ligeramente ensanchado en la parte apical. La variación de la forma de esta estructura se ha analizado, con una plantilla en forma de abanico a partir de tres puntos fijos que corresponden al ángulo superior interno, el ángulo de inserción del ápice del escutelo y el ápice de la sutura elitral. El abanico está compuesto por 50 líneas para recuperar la forma del contorno del margen externo (Fig. 19).

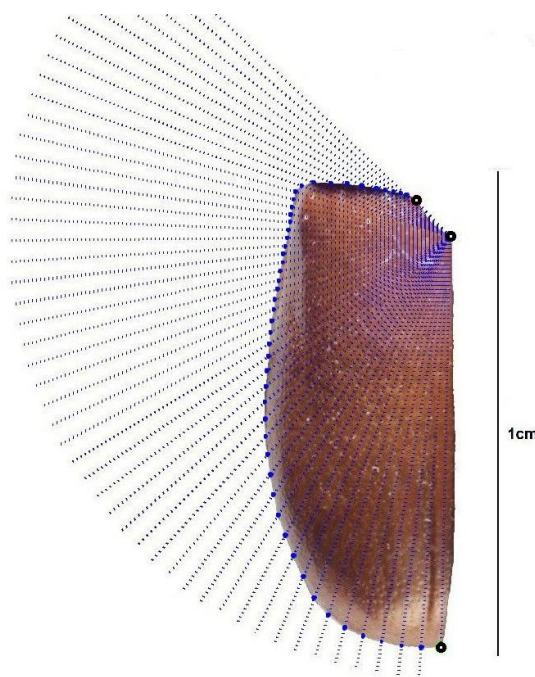


Figura 19. Protocolo para el registro de la forma de élitro en vista dorsal de *Phyllophaga obsoleta*, con un abanico de 50 líneas, creado a partir de tres puntos fijos (círculos negros con centro blanco).

## **Análisis morfológico**

Para el estudio de la forma y su variación, se implementó el análisis de las estructuras con morfometría geométrica de dos dimensiones que incluye los puntos de referencia para caracterizar la forma de los genitales masculinos, protibias, y élitros. Los protocolos de registro de la forma fueron realizados en MakeFan6 (Sheets, 2006), y la colocación de marcas en tpsDig versión 2.17 (Rohlf, 2013), ambos del paquete IMP6 (Sheets, 2006). El ajuste Procrustes que elimina efectos de posición, orientación y tamaño, dejando un nuevo conjunto de variables de la forma para los análisis multivariados subsecuentes, fue realizado en MorphoJ (Klingenberg, 2011). Los análisis multivariados fueron realizados en MorphoJ, tpsPLS versión 1.23 (Rohlf, 2015) y JMP (Jones & Sall, 2011). Las diferencias estadísticas fueron consideradas significativas a una  $T^2 < 0.0001$  y una  $p < 0.05$ .

## **Análisis multivariados**

*Análisis de Componentes Principales.* Este análisis se realizó para explorar y ordenar la variación y tratar de reconocer visualmente patrones de expresión morfológica o estructural de covarianza en los datos a nivel intra e interespecífico. Partiendo de una matriz de covarianza, consiste en encontrar transformaciones ortogonales de las variables originales (coordenadas de la forma) para conseguir un nuevo conjunto de variables incorreladas, denominadas Componentes Principales, los cuales se obtienen en orden decreciente de importancia. Los Componentes Principales muestran la cantidad y dirección de la variación de los

datos, en este caso, mediante plantillas de deformación, así como, la distribución de los especímenes dentro del morfoespacio (Abdi y Williams, 2010; Villardón, 2002). Este análisis se realizó con el software MorphoJ.

*Análisis de Funciones Discriminantes.* Este análisis valida la separación de dos grupos, asignados a priori, basándose en la regla de clasificación de Fisher. La confiabilidad de esta prueba es justificada mediante una validación cruzada y una prueba de permutación, que usa el estadístico  $T^2$  para diferenciar entre las medias de los grupos (Klingenberg, 2013a). En este caso fue realizado con machos y hembras, representando dos categorías, y se transformaron los datos Procrustes para probar dimorfismo sexual en la forma entre las estructuras. Para probar dimorfismo en el tamaño se realizó una ANOVA, usando el tamaño centroide, con su respectiva prueba F de Goodall. Este análisis se realizó con el software MorphoJ y JMP.

*Análisis de Divergencia Morfológica.* La cantidad de divergencia morfológica intra e interespecífica se realizó midiendo las distancias Procrustes entre los CSP, CSS y CSN como un indicativo para cuantificar el grado de divergencia en comparaciones pareadas intra e interespecíficos, y se evaluó su significancia con una prueba de permutación con 1000 réplicas (Klingenberg, 2011). Este análisis se realizó con el software MorphoJ.

*Análisis de Mínimos Cuadrados Parciales.* Este análisis explora los patrones de covarianza entre dos juegos de variables (Rohlf y Corti, 2000), que en morfometría

geométrica pueden ser dos juegos de datos de forma diferentes o uno de forma y el otro de alguna variable distinta (ecológica, condiciones experimentales, etc.) (Klingenberg, 2013a). Se analizó la covarianza entre estructuras diferentes dentro de la misma especie para evaluar la existencia de patrones de variación y expresión morfológica asociados con los CSP y CSS, utilizando el programa tpsPLS versión 1.23 (Rohlf, 2015). La condición del análisis es que deben compararse el mismo número de datos, y por ello incluimos para cada comparación el mismo número de ejemplares y los mismos individuos, en este caso machos, pues se cuenta con fotografías de la genitalia de éstos.



# Resultados

## Variación morfológica en élitros de *Phyllophaga obsoleta*

*Análisis de Componentes Principales.* Los primeros dos componentes describen un 77% de la variación en élitros (PC1: 67%; PC2: 10%; N=54). En la figura 20, se muestra el rango de variación de la forma del élitro izquierdo y fenotipos extremos representados en gradillas de deformación. Podemos observar en la gráfica de dispersión que en el morfoespacio descrito por los primeros dos componentes no hay una clara separación de grupos sobre ninguno de los ejes, por lo que se puede asumir que no hay dimorfismo sexual marcado en la forma de esta estructura. En la figura 21, se muestra la superposición de 51 puntos de referencia homólogos (Figura 21a), y gradillas de deformación resumiendo la variación de la forma del élitro izquierdo, donde se observa que la mayor variación, se concentra principalmente en la zona media y posterior (Figura 21b).

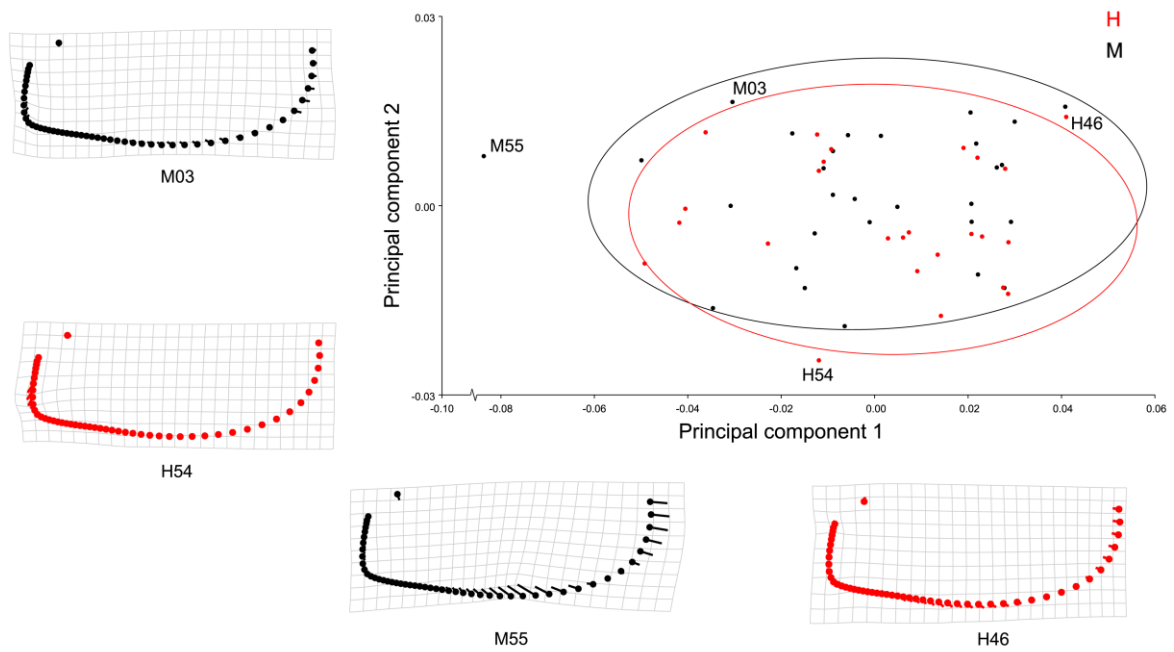


Figura 20. Análisis de Componentes Principales en élitros izquierdos de *Phyllophaga obsoleta*. (H: Hembra y M: Machos).

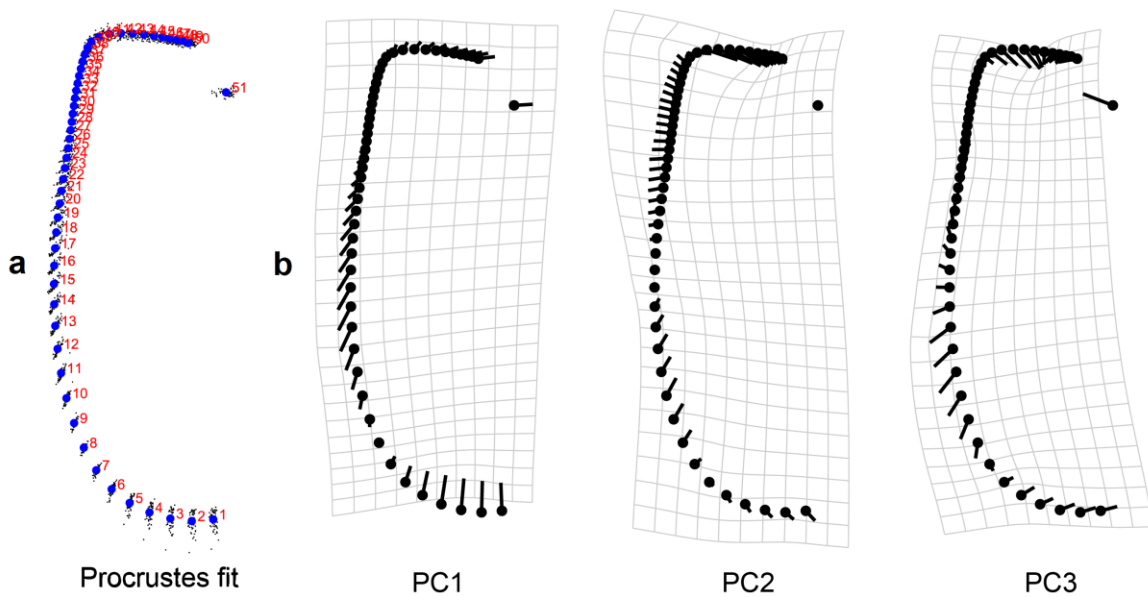


Figura 21. Superposición Procrustes y Componentes Principales (PC1, PC2, PC3) en élitros de *Phyllophaga obsoleta*.

*Análisis Discriminante.* La forma del élitro no fue diferente entre machos y hembras ( $T^2=0.0050$ ) (Tabla 1), como lo muestran las representaciones de las formas promedio (Figura 22a). El análisis de discriminación hizo una clasificación intersexual casi del 100%; sin embargo, la prueba de validación cruzada no halló dimorfismo sexual del élitro en esta especie, siendo su margen de error mayor al 30% (Tabla 2) (Figura 22b).

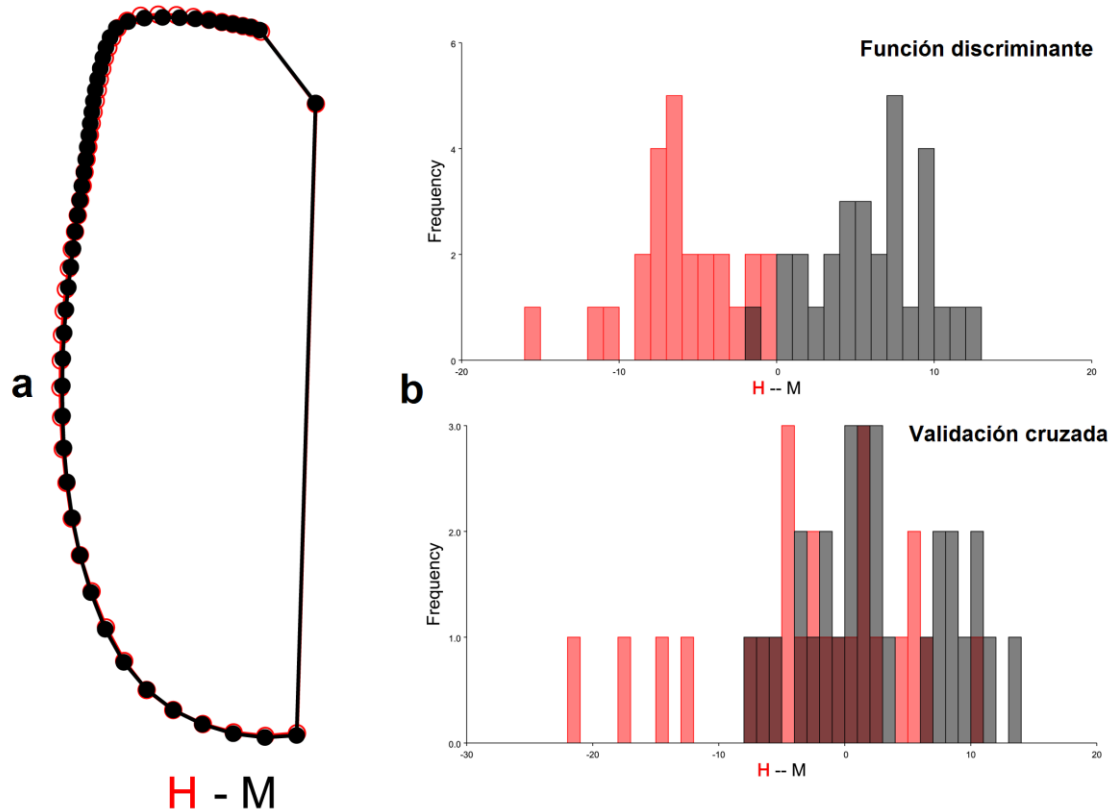


Figura 22. Análisis de función discriminante en élitros de *Phyllophaga obsoleta*. (H: Hembra y M: Machos).

Estructura	Distancia Procrustes	Distancias Mahalanobis	T <sup>2</sup>	Valor P	Distancias Procrustes (perm)	T <sup>2</sup> (perm)
Élitro	0.00783793	3.4612	160.8393	0.9999	0.4160	0.0050

Tabla 1. Análisis de función discriminante en élitros de *Phyllophaga obsoleta* con validación cruzada (1000 permutaciones).

Análisis	Grupo	Ubicadas	Errores	Total
Función discriminante	Hembras	25	0	25
	Machos	28	1	29
Validación cruzada	Hembras	15	10	25
	Machos	20	9	29

Tabla 2. Asignación de grupos de la prueba de permutación de los análisis discriminantes en base a la forma del élitro izquierdo en *Phyllophaga obsoleta*.

### Variación morfológica en protibias de *Phyllophaga obsoleta*

*Análisis de Componentes Principales.* Los primeros tres componentes describen el 76% de la variación de las protibias (PC1: 33%; PC2: 24%; PC3:19%; N=47). La figura 23 muestra el rango de variación de la forma de la protibia derecha, con dos conjuntos de datos en el morfoespacio definido por los primeros dos componentes. También se muestran los fenotipos extremos representados en gradillas de deformación.

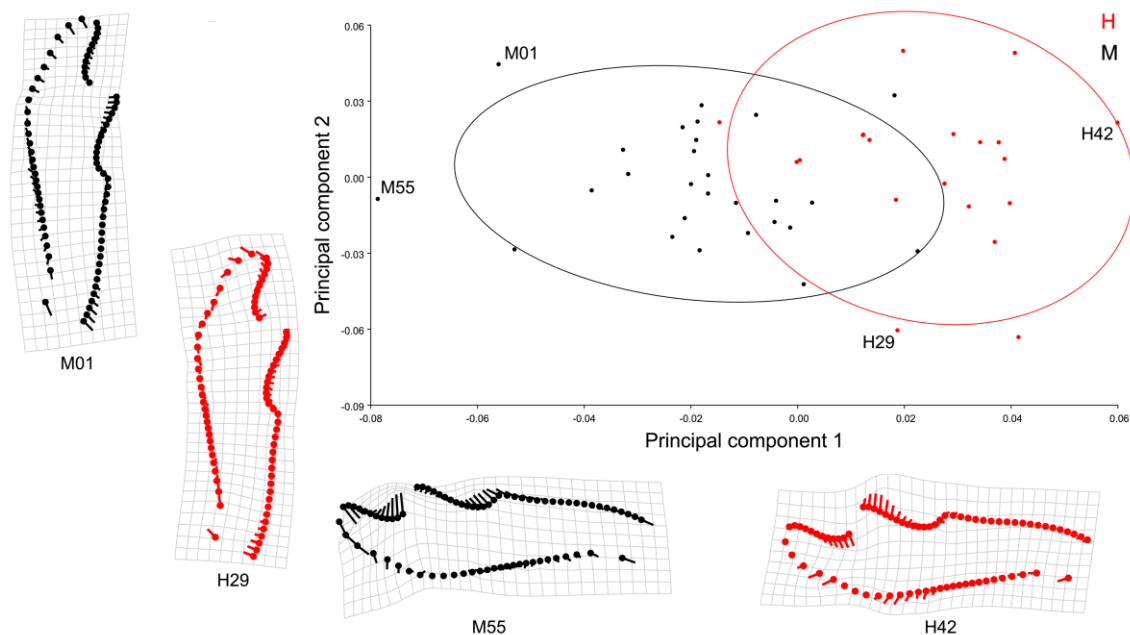


Figura 23. Análisis de Componentes Principales en protibias de *Phyllophaga obsoleta*. (H: Hembra y M: Machos).

La figura 24 muestra la superposición de los 78 puntos de referencia homólogos (Figura 24a) y las gradillas de deformación resumiendo la variación de la protibia derecha (Figura 24b). En PC1, se observa un cambio en la protibia donde el dentículo superior se ensancha y crece, el dentículo medio crece y la curvatura entre éste y el superior se desliza internamente. Este patrón describe en general la forma de las protibias femeninas (Figura 24b). En PC2, se muestra un cambio donde el dentículo superior se hace más corto y la curvatura entre éste y el dentículo medio ya no es tan pronunciada y se acorta. Este patrón describe en general la forma de las protibias masculinas.

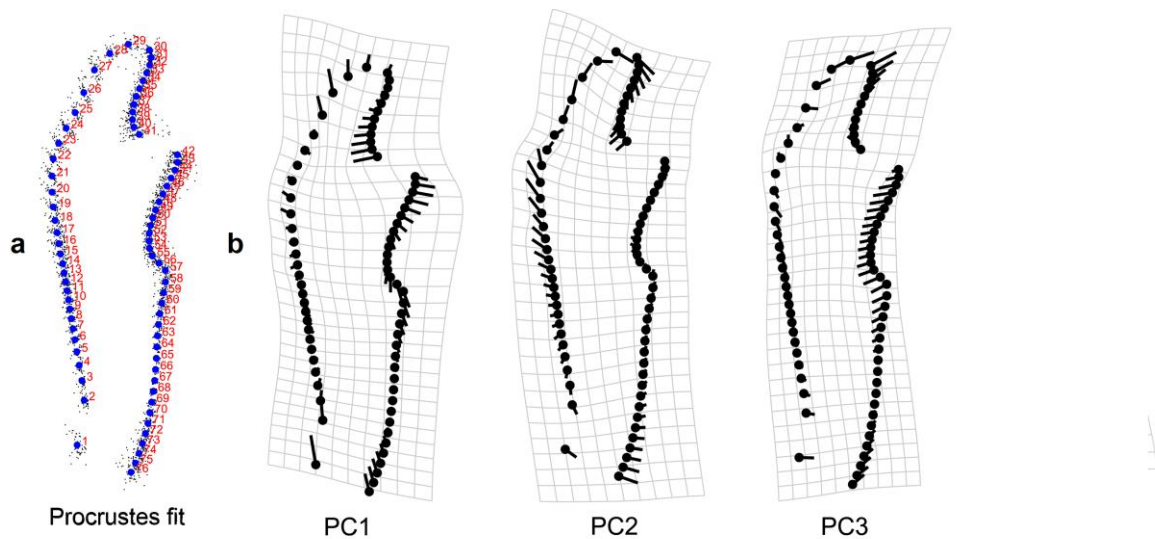


Figura 24. Superposición Procrustes y Componentes Principales en protibias de *Phyllophaga obsoleta*.

**Análisis Discriminante.** La forma de las protibias de *P. obsoleta*, fue significativamente diferente entre machos y hembras ( $T^2 < 0.0001$ ) (Tabla 3), como lo muestran las representaciones de las formas promedio (Figura 25a). La variación se concentra principalmente en las regiones del dentículo superior y medio; las protibias femeninas tienden a ser más anchas, largas y con dentículos más gruesos y redondeados; y las protibias masculinas son más delgadas, cortas y con los dentículos más pequeños y puntiagudos (Figura 25a).

Tanto en el análisis discriminante como en la validación cruzada la reclasificación intersexual fue exacta, por lo tanto, encontramos que hay dimorfismo sexual en la forma de las protibias (Tabla 4) (Figura 25b).

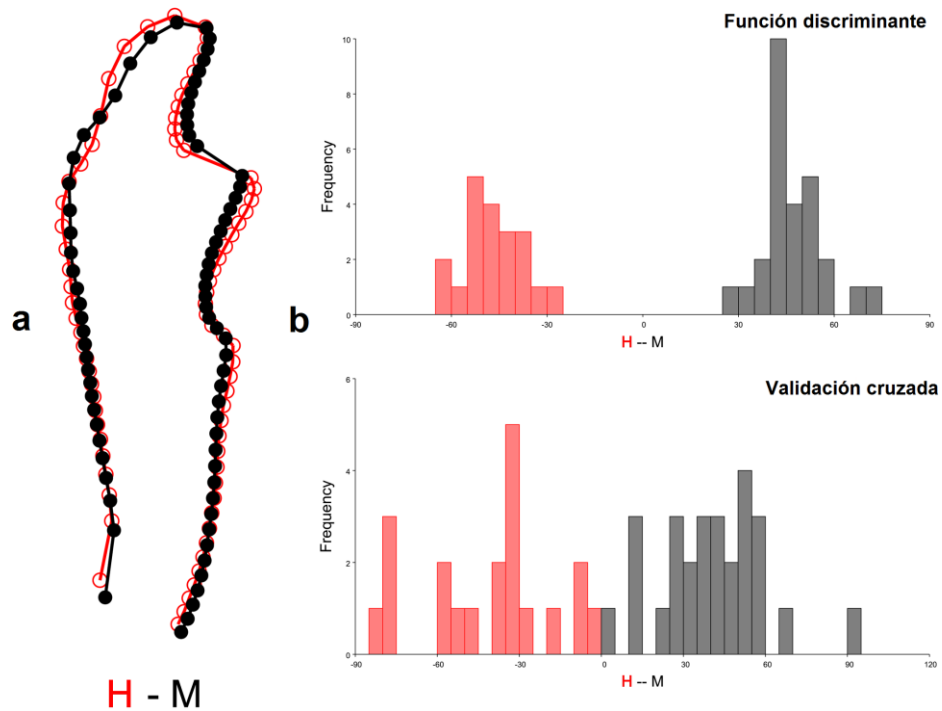


Figura 25. Análisis de función discriminante en protibias de *Phyllophaga obsoleta*. (H: Hembra y M: Machos).

Estructura	Distancia Procrustes	Distancias Mahalanobis	T <sup>2</sup>	Valor P	Distancias Procrustes (perm)	T <sup>2</sup> (perm)
Protibia	0.04711726	9.6914	1079.1177	0.8225	<.0001	<.0001

Tabla 3. Análisis de función discriminante en protibias de *Phyllophaga obsoleta* con validación cruzada (1000 permutaciones).

Análisis	Grupo	Ubicadas	Errores	Total
Función discriminante	Hembras	20	0	20
	Machos	27	0	27
Validación cruzada	Hembras	20	0	20
	Machos	27	0	27

Tabla 4. Asignación de grupos de la función discriminante en base a la forma de la protibia en *Phyllophaga obsoleta*.

### **Variación morfológica en parámetros de *Phyllophaga obsoleta***

*Análisis de Componentes Principales.* Los primeros dos componentes describen el 74% de la varianza en los genitales masculinos (PC1: 52%; PC2: 22%; N=22). La figura 26 muestra el rango de variación de la forma de los parámetros y fenotipos extremos representados en gradillas de deformación. En el morfoespacio definido por los primeros dos componentes no se genera un patrón de agrupamiento distintivo. La figura 27 muestra la superposición de 81 puntos de referencia homólogos (Figura 27a), y las gradillas de deformación resumiendo la forma de los parámetros (Figura 27b). El PC1 describe un cambio en el cual los parámetros se alargan ligeramente, la curvatura externa media se hace más angosta y el contorno en la zona superior se ensancha (Figura 27b). El PC2 describe un cambio en donde los parámetros se acortan, pero se ensanchan y la curvatura externa media no es tan pronunciada, y el contorno de la zona superior se hace más angosto (Figura 27b).



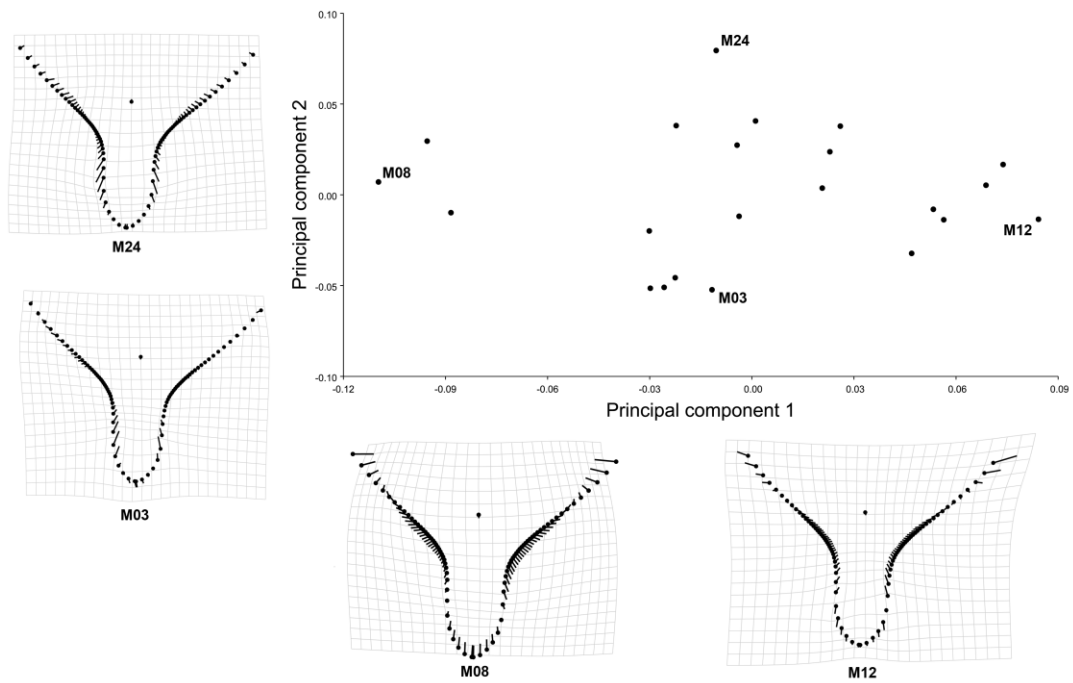


Figura 26. Gráfica de dispersión del análisis de Componentes Principales de los parámetros de *Phyllophaga obsoleta*.

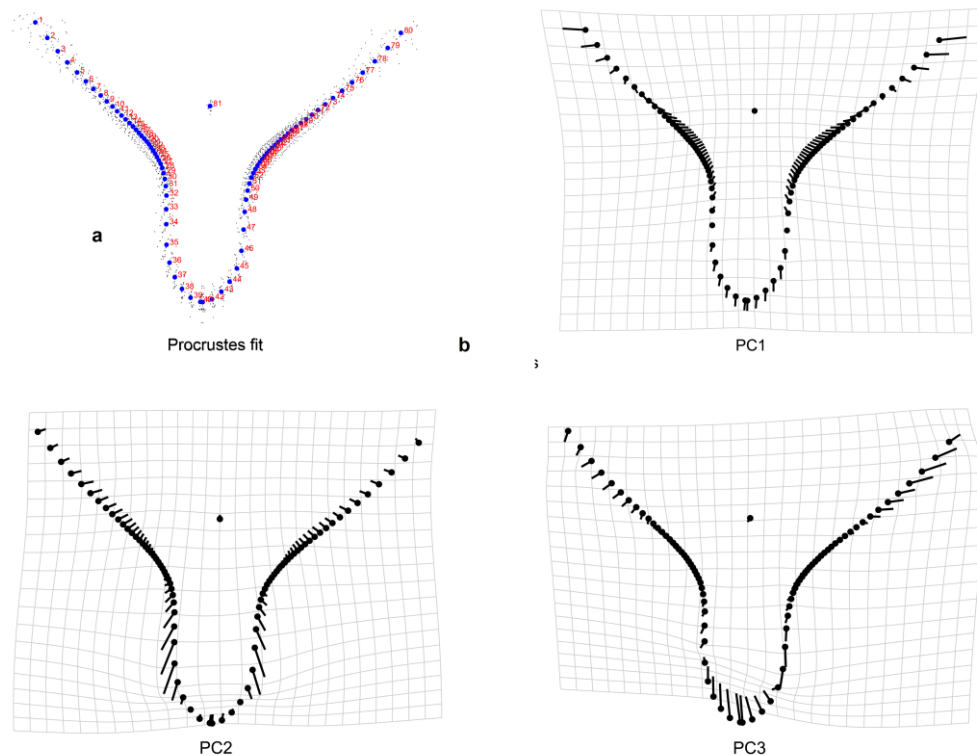


Figura 27. Análisis de Componentes Principales en parámetros de *Phyllophaga obsoleta*.

### Variación morfológica en élitros de *Phyllophaga mucorea*

*Análisis de Componentes Principales.* Los primeros dos componentes describen un 67% de la variación (PC1: 40%; PC2: 27%; N=73) de los élitros en *P. mucorea*. La figura 28 muestra el rango de variación de la forma del élitro derecho y fenotipos extremos representados en gradillas de deformación. En la gráfica del morfoespacio, definido por los dos primeros componentes, no se forman agrupaciones claras, por lo que se asume que no existe dimorfismo sexual para este carácter. La figura 29, muestra la superposición de 51 puntos de referencia homólogos (Figura 29a) y gradillas de deformación resumiendo la variación de la forma del élitro izquierdo (Figura 29b). Se puede apreciar que la mayor variación de

esta estructura se concentra generalmente en la zona media, posterior y cerca del húmero (Figura 29b).

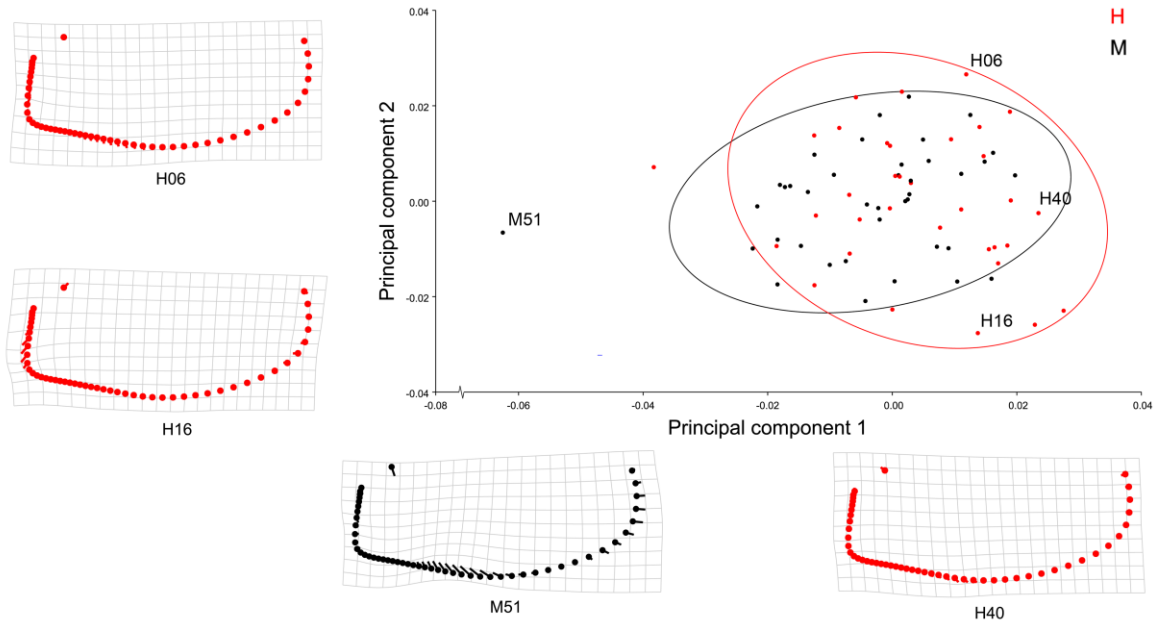


Figura 28. Gráfica de dispersión del análisis de Componentes Principales en élitros de machos y hembras de *Phyllophaga mucorea*.

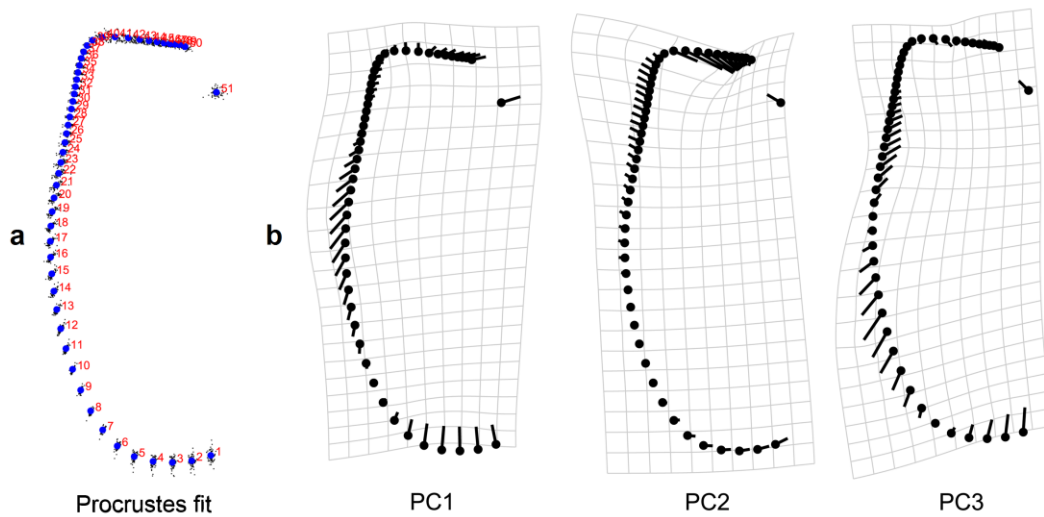


Figura 29. Superposición Procrustes y Componentes Principales en élitros de *Phyllophaga mucorea*.

*Análisis Discriminante.* La figura 30 muestra el cambio intersexual de la forma del élitro izquierdo y gráficas de valores discriminantes. La diferencia de la forma entre élitros de machos y hembras, no fue significativa ( $T^2=0.0770$ ) (Tabla 5), como lo muestran las representaciones de las formas promedio (Figura 30a). El análisis discriminante realiza una separación total por sexos, pero la validación cruzada no halló dimorfismo en esta estructura y su clasificación tuvo un margen de error mayor al 40% (Tabla 6) (Figuras 30b).

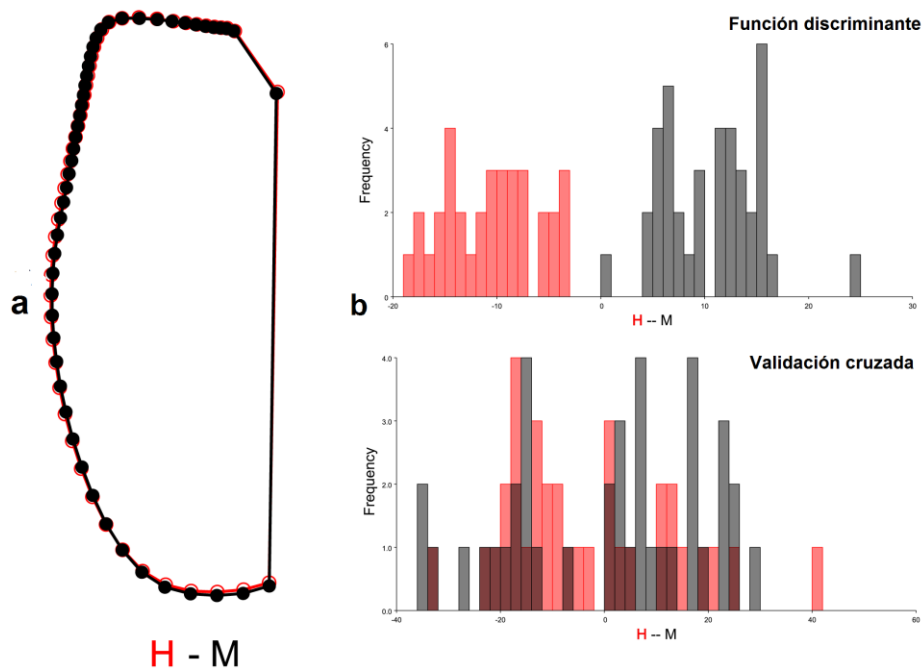


Figura 30. Análisis de función discriminante en élitros de *Phyllophaga mucorea*.

Estructura	Distancia Procrustes	Distancias Mahalanobis	T <sup>2</sup>	Valor P	Distancias Procrustes (perm)	T <sup>2</sup> (perm)
Élitro	0.00827120	4.6000	384.3510	0.9995	0.0580	0.0770

Tabla 5. Análisis de función discriminante en élitros de *Phyllophaga mucorea* con validación cruzada (1000 permutaciones).

Análisis	Grupo	Ubicadas	Errores	Total
Función discriminante	Hembras	34	0	34
	Machos	39	0	39
Validación cruzada	Hembras	20	14	34
	Machos	15	24	39

Tabla 6. Asignación de grupos de la función discriminante en base a la forma del élitro en *Phyllophaga mucorea*.

### Variación morfológica en protibias de *Phyllophaga mucorea*

*Análisis de Componentes Principales.* Los primeros dos componentes describen un 56% de la variación de la protibia derecha de *P. mucorea* (PC1: 43%; PC2: 13%; N=73). La figura 31 muestra el rango de variación de la forma la protibia derecha y los extremos representados en gradillas de deformación. En el morfoespacio definido por los primeros dos componentes, se observa que hay una clara separación sobre el primer eje. En la figura 32 se muestra la superposición de 76 puntos de referencia homólogos (Figura 32a) y gradillas de deformación resumiendo la variación de la forma de la protibia derecha (Figura 32b). En general, la mayor variación se concentra en el dentículo medio y el superior (Figura 32b).

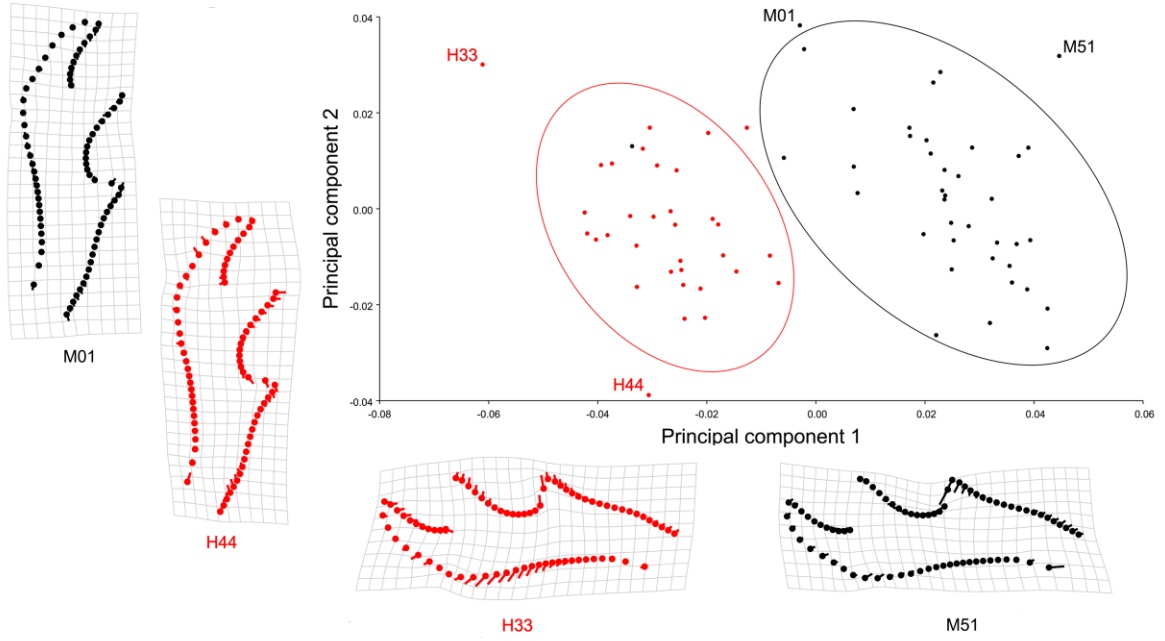


Figura 31. Gráfica de dispersión del análisis de Componentes Principales en protibias de *Phyllophaga mucorea*.

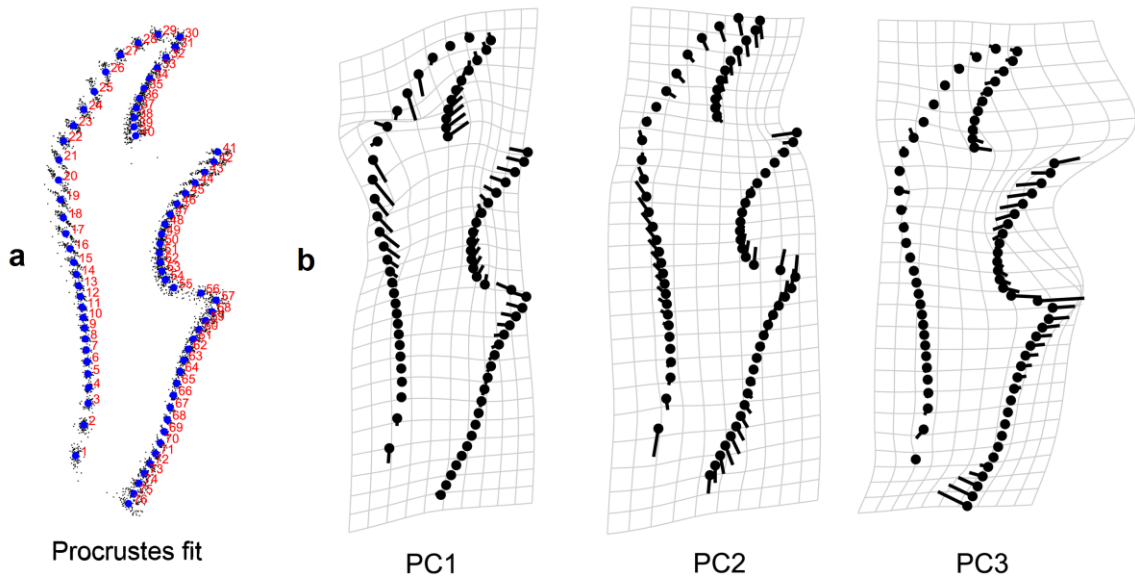


Figura 32. Superposición Procrustes y Componentes Principales en protibias de *Phyllophaga mucorea*.

*Análisis discriminante.* La diferencia de la forma de las protibias entre sexos es significativa ( $T^2 < .0001$ ) (Tabla 7), como lo muestran las representaciones de las formas promedio (Figura 33a). Los machos tienen protibias con el denticulo superior más delgado, y el denticulo medio más pequeño. Las hembras tienen el denticulo superior más ancho y el denticulo medio más largo (Figura 33a). Se observa una ligera variación sobre el denticulo inferior, que en las hembras es ligeramente más largo. En resumen, las protibias femeninas se caracterizan por ser más anchas que las masculinas, que exhibe un claro dimorfismo sexual. El análisis discriminante y su validación cruzada mostró una clasificación intersexual exacta (Tabla 8) (Figura 33b).

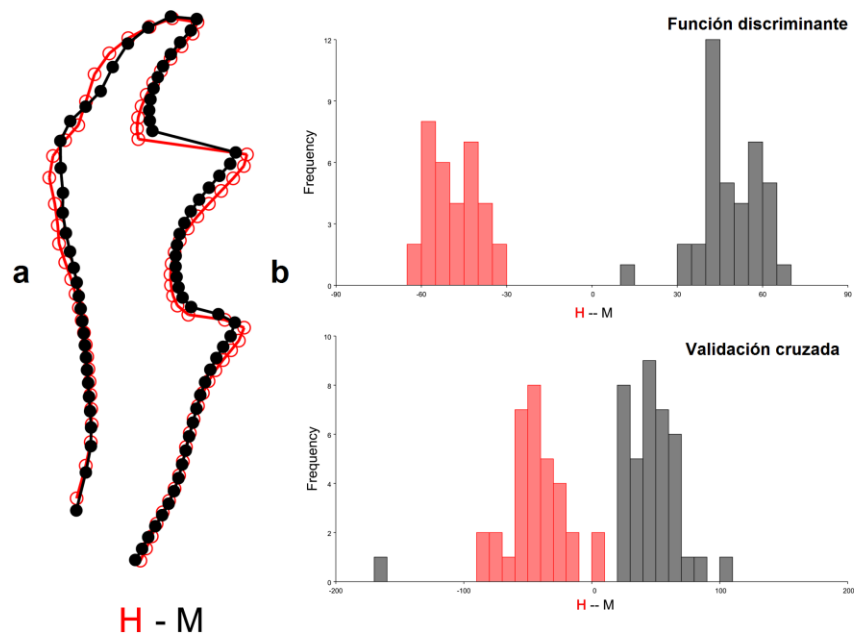


Figura 33. Análisis de función discriminante en protibias de *Phyllophaga mucorea*.

Estructura	Distancia Procrustes	Distancias Mahalanobis	T <sup>2</sup>	Valor P	Distancias Procrustes (perm)	T <sup>2</sup> (perm)
<b>Protibia</b>	0.05193572	9.8559	1736.3621	0.9026	<.0001	<.0001

Tabla 7. Análisis de función discriminante en protibias de *Phyllophaga mucorea* con validación cruzada (1000 permutaciones).

Análisis	Grupo	Ubicadas	Errores	Total
<b>Función discriminante</b>	Hembras	33	0	33
	Machos	39	0	39
<b>Validación cruzada</b>	Hembras	31	2	33
	Machos	38	1	39

Tabla 8. Asignación de grupos de la función discriminante en base a la forma de la protibia en *Phyllophaga mucorea*.

### Variación morfológica en parámetros de *Phyllophaga mucorea*

*Análisis de Componentes Principales.* Los primeros dos componentes describen un 74 y 73% de la varianza total en los parámetros izquierdos (PC1: 56%; PC2: 18%; N=33) y derechos (PC1: 53%; PC2: 20%; N=33) de *P. mucorea*, respectivamente. Las figuras 34 y 35 muestran el rango de variación del parámetro izquierdo y derecho en el morfoespacio definido por los dos primeros componentes; y fenotipos extremos representados en gradillas de deformación. La figura 36 muestra la superposición de 85 puntos de referencia homólogos (Figura 36a) y gradillas de deformación resumiendo la variación de los parámetros (Figura 36b-d). La variación en los parámetros es bastante prominente en el borde interno y externo de la zona media y en general, varían más en anchura que en longitud (Figura 36b-d).



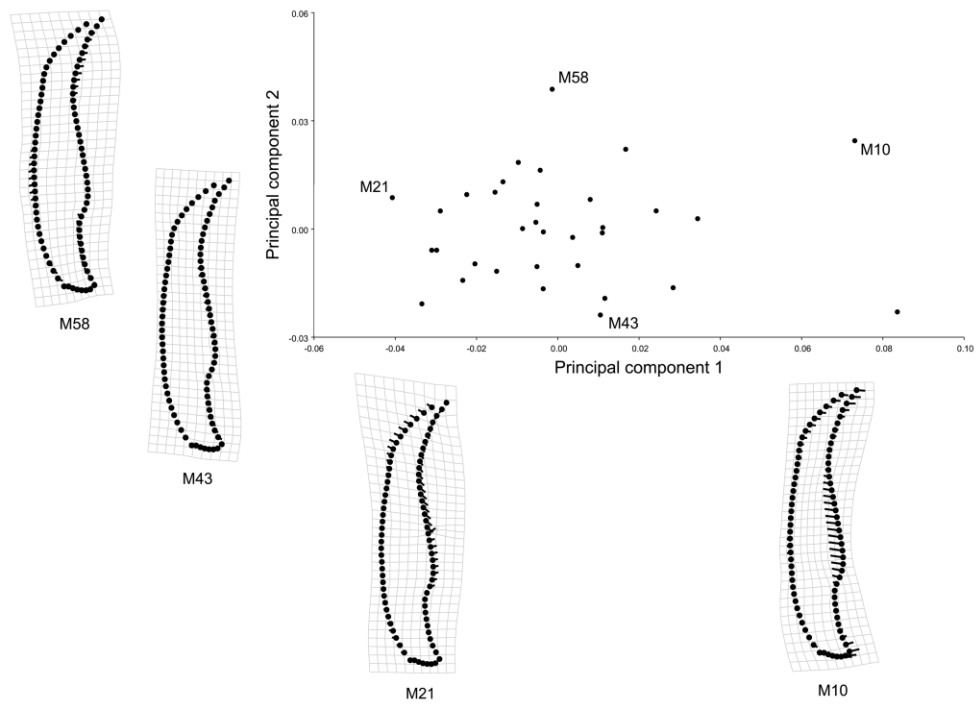


Figura 34. Gráfica de dispersión del análisis de Componentes Principales en los parámetros derechos de *Phyllophaga mucorea*.

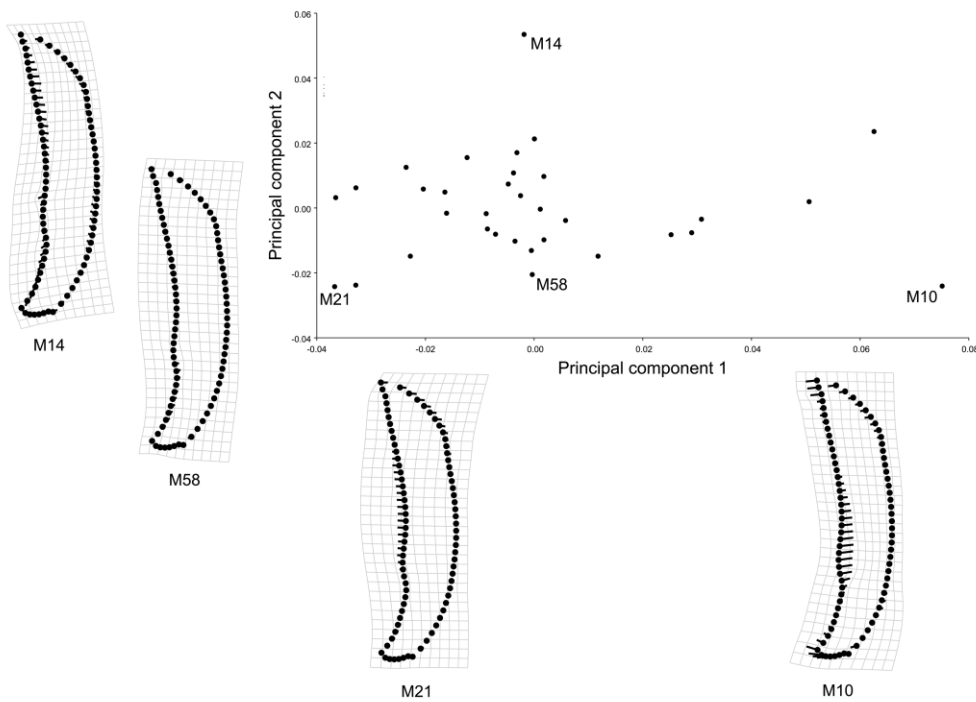


Figura 35. Gráfica de dispersión del análisis de Componentes Principales en los parámetros izquierdos de *Phyllophaga mucorea*.

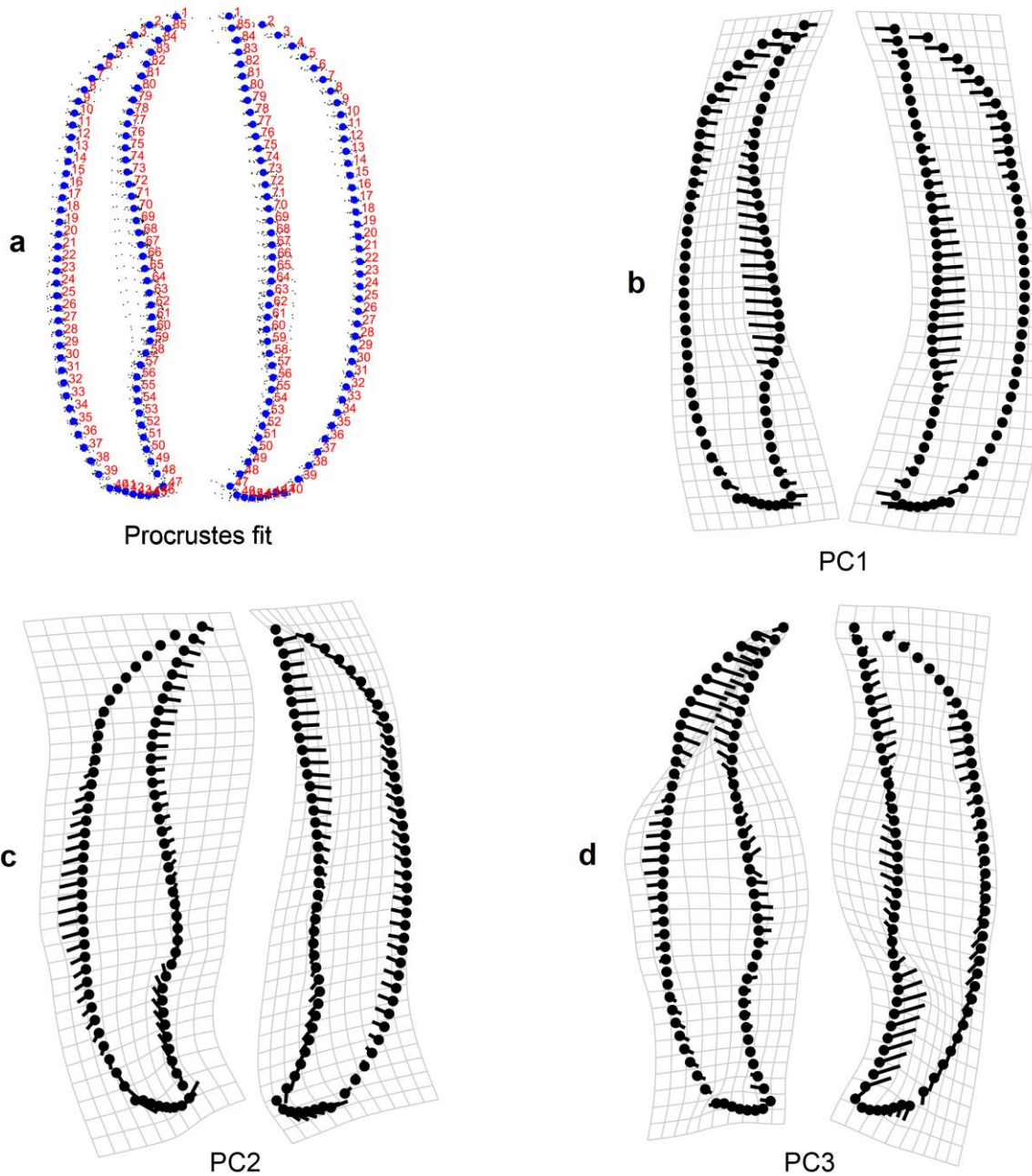


Figura 36. Superposición Procrustes y Componentes Principales en parámetros de *Phyllophaga mucorea*.

## Variación morfológica interespecífica en élitros

*Análisis de Componentes Principales.* Existe una clara diferencia en los patrones de ocupación del morfoespacio entre ambas especies (Fig. 37), con algunos pocos ejemplares de ambas especies superpuestos. La variación morfológica del élitro en *P. obsoleta* es mayor (Fig. 37).

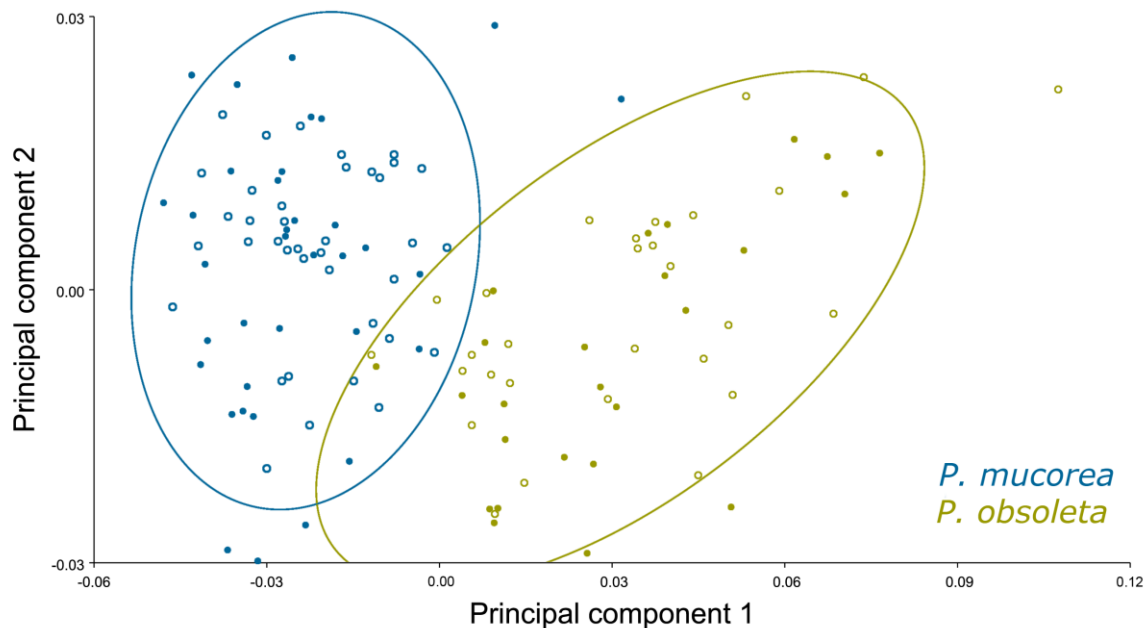


Figura 37. Gráfica de dispersión del Análisis de Componentes Principales interespecífico en élitros (machos = círculos abiertos; hembras = círculos cerrados).

*ANOVA.* Para ambas especies, los élitros son mayores en las hembras considerando el tamaño centroidal como referencia de tamaño ( $p < 0.05$ ). Las cajas de las gráficas representan la media y el 50% de la muestra mientras que las colas y bigotes representan los 25% superior e inferior (Fig. 38).

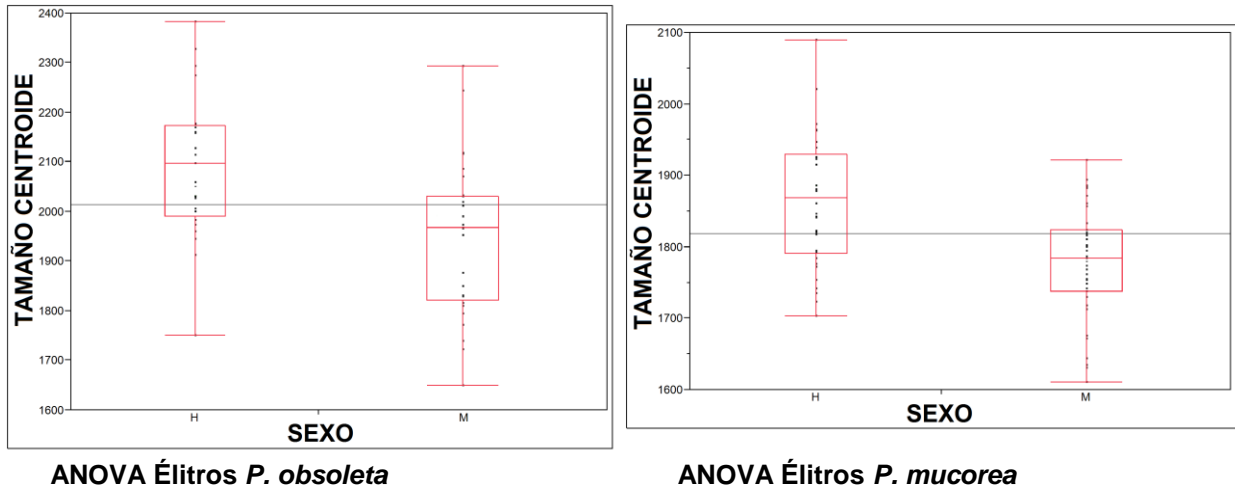


Figura 38. Diagramas de caja que muestran los tamaños centroides de los élitros para cada sexo en ambas especies (ANOVA Prob > F: *P. obsoleta* = < 0.0008; *P. mucorea* = < 0.0001).

*Análisis Discriminante.* La diferencia de la forma del élitro izquierdo entre ambas especies es significativa ( $T^2 < 0.0001$ ) (Tabla 9). La función discriminante muestra una clasificación interespecífica completa, y su validación cruzada resultó con un margen de error menor al 15% (Tabla 10). Esto nos indica que cada especie presenta un morfotipo elitral específico.

Estructura	Distancia Procrustes	Distancias Mahalanobis	T <sup>2</sup>	Valor P	Distancias Procrustes (perm)	T <sup>2</sup> (perm)
Élitro	0.05527979	11.2683	3941.2144	<.0001	<.0001	<.0001

Tabla 9. Análisis de función discriminante interespecífico en élitros de *P. obsoleta* y *P. mucorea* con validación cruzada (1000 permutaciones).

Análisis	Grupo	Ubicadas	Errores	Total
Función discriminante	<i>P. mucorea</i>	73	0	73
	<i>P. obsoleta</i>	54	0	54
Validación cruzada	<i>P. mucorea</i>	62	11	73
	<i>P. obsoleta</i>	47	7	54

Tabla 10. Asignación de grupos de la validación cruzada en el análisis discriminante interespecífico del élitro en *P. obsoleta* y *P. mucorea*.

### Variación morfológica interespecífica en protibias

**Análisis de Componentes Principales.** Existe una muy evidente diferencia en los patrones de ocupación del morfoespacio entre ambas especies (Fig. 39).

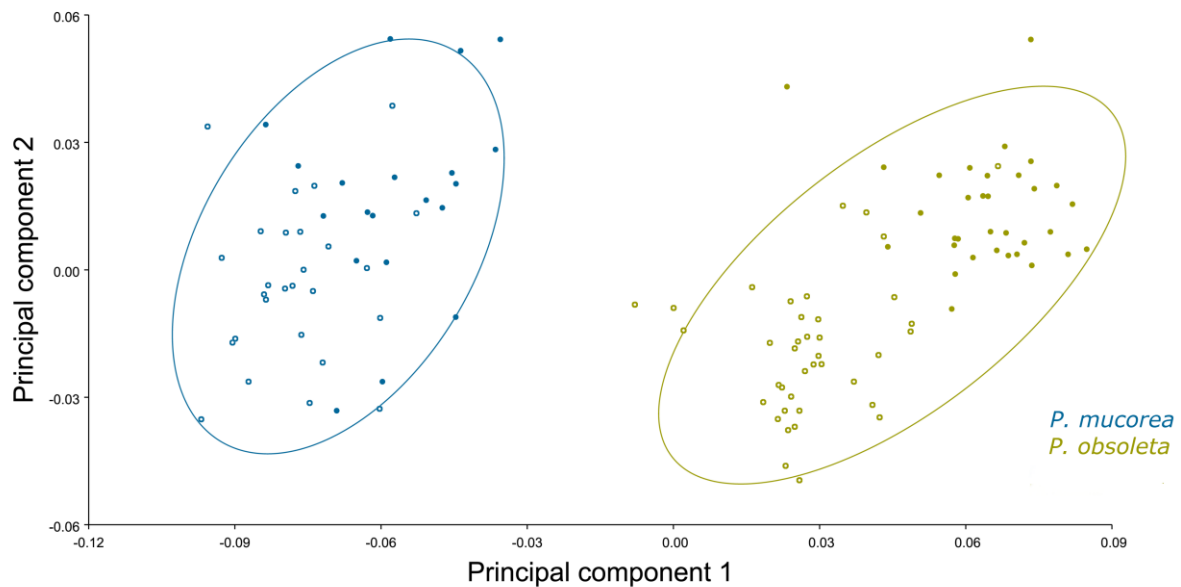


Figura 39. Gráfica de dispersión del Análisis de Componentes Principales interespecífico en protibias (machos=círculos abiertos; hembras=círculos cerrados).

ANOVA. Para ambas especies, las protibias son mayores en las hembras considerando el tamaño centroide como referencia de tamaño ( $p < 0.05$ ). Las cajas

de las gráficas representan la media y el 50% de la muestra mientras que las colas y bigotes representan los 25% superior e inferior (Fig. 40).

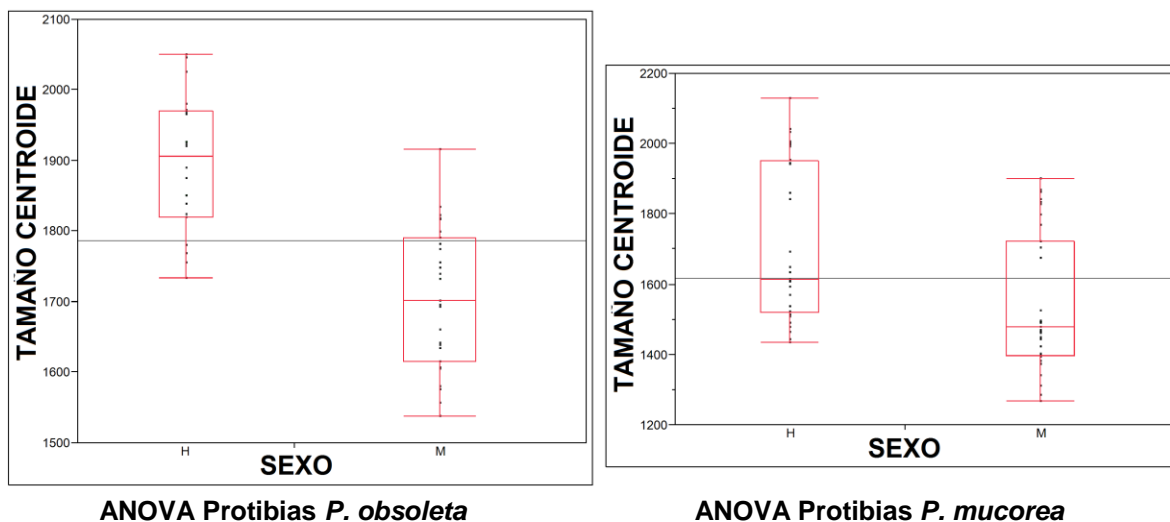


Figura 40. Diagramas de caja que muestran los tamaños centroides de las protibias para cada sexo en ambas especies (ANOVA, Prob > F: *P. obsoleta* = < 0.0001; *P. mucorea* = < 0.0011).

*Análisis Discriminante.* La forma de la protibia derecha fue significativamente diferente entre ambas especies ( $T^2 < 0.0001$ ) (Tabla 11). La función discriminante realizó una clasificación interespecífica completa de las protibias y su validación cruzada lo hizo de igual forma (Tabla 12). Cada especie presenta un morfotipo específico en protibias.

Estructura	Distancia Procrustes	Distancias Mahalanobis	T <sup>2</sup>	Valor P	Distancias Procrustes (perm)	T <sup>2</sup> (perm)
<b>Protibia</b>	0.11418527	49.4317	69485.6085	0.3420	<.0001	<.0001

Tabla 11. Análisis de función discriminante interespecífico en protibias de *P. obsoleta* y *P. mucorea* con validación cruzada (1000 permutaciones).

Análisis	Grupo	Ubicadas	Errores	Total
<b>Función discriminante</b>	<i>P. mucorea</i>	72	0	72
	<i>P. obsoleta</i>	47	0	47
<b>Validación cruzada</b>	<i>P. mucorea</i>	72	0	72
	<i>P. obsoleta</i>	47	0	47

Tabla 12. Análisis de función discriminante interespecífico en protibias de *P. obsoleta* y *P. mucorea* con validación cruzada.

### **Divergencia de la forma entre estructuras sexuales y no sexuales**

La divergencia morfológica de los élitros y protibias se comparó utilizando, como indicador, la distancia Procrustes obtenida para cada estructura. Se observa una clara divergencia intraespecífica mayor en la forma de las protibias que respecto a los élitros (Figura 41), y lo mismo ocurre si comparamos de manera interespecífica ambas estructuras. Las protibias de *P. mucorea* representan la estructura con mayor divergencia de la forma (Figura 42; Tabla 13).

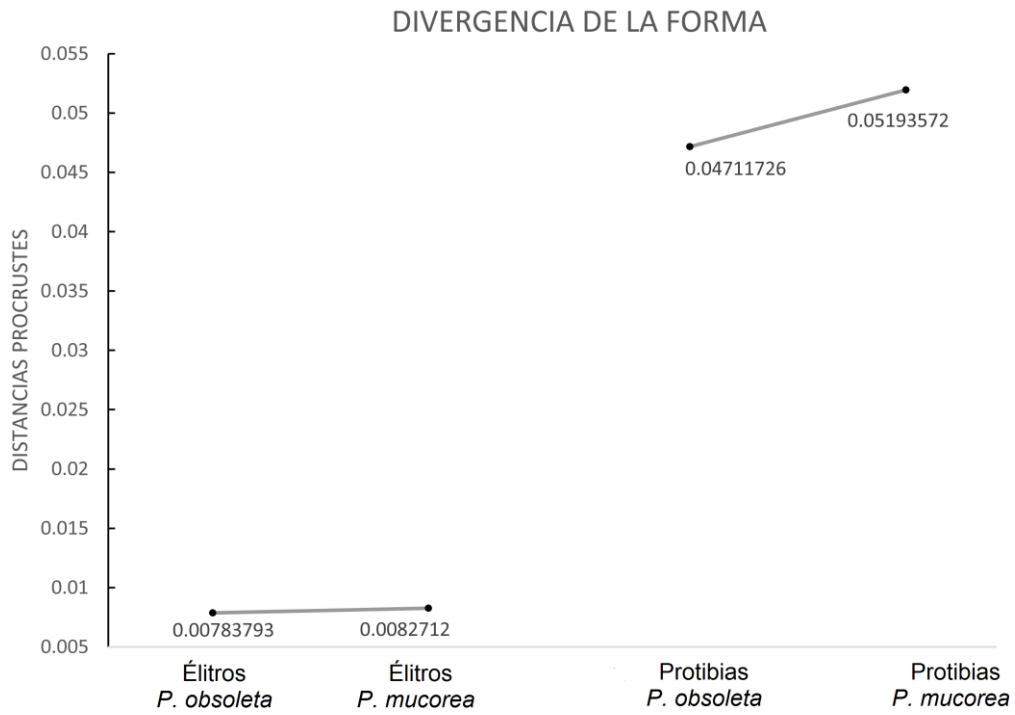


Figura 41. Divergencia intraespecífica de la forma entre Hembra – Macho.



Figura 42. Divergencia interespecífica de la forma entre *P. obsoleta* y *P. mucorea*.



	DIVERGENCIA INTRAESPECÍFICA H – M				DIVERGENCIA INTERESPECÍFICA <i>P. mucorea</i> - <i>P. obsoleta</i>	
	Élitros <i>P. obsoleta</i>	Élitros <i>P. mucorea</i>	Protibias <i>P. obsoleta</i>	Protibias <i>P. mucorea</i>	Élitros	Protibias
Diferencias entre medias						
Distancias procrustes (divergencia en la forma)	0.00783793	0.0082712	0.04711726	0.05193572	0.05527979	0.11418527
Distancias Mahalanobis	3.4612	4.6	9.6914	9.8559	11.2683	49.4317
T <sup>2</sup>	160.8393	384.351	1079.1177	1736.3621	3941.2144	69485.6085
Valore p (paramétrico)	0.9999	0.9995	0.8225	0.9026	<.0001	0.3420
Valor p de la prueba de permutación						
<b>Distancias Procrustes</b>	0.449	0.066	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
T <sup>2</sup>	0.019	0.084	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001

Tabla 13. Divergencia inter e intraespecífica de la forma en estructuras sexuales secundarias y neutras.

### Covariación de la forma entre estructuras sexuales y no sexuales

Los patrones de covarianza intraespecífica de la forma, muestran una correlación ligeramente mayor entre élitros-protibias en ambas especies, en comparación con la correlación entre protibias-parámetros; mientras que la menor correlación es entre élitros-parámetros. La prueba de permutación es congruente con estos resultados (Tabla 14).

Análisis	Especie	Estadístico	Élitros-protibias	Élitros-parámetros	Protibias-Parámetros
PLS	<i>P. obsoleta</i>	Valor SVD	0.0101	0.0132	0.0098
		SVD %	0.9305	0.8622	0.6623
		Correlación	<b>0.5574</b>	<b>0.4281</b>	<b>0.4481</b>
	<i>P. mucorea</i>	Valor SVD	0.0047	0.0046	0.0050
		SVD %	0.7157	0.8164	0.5604
		Correlación	<b>0.5802</b>	<b>0.4391</b>	<b>0.489</b>
Prueba de permutación	<i>P. obsoleta</i>	Correlación	<b>0.5574</b>	<b>0.4281</b>	<b>0.4481</b>
		Valores-p	0.000	0.000	0.000
	<i>P. mucorea</i>	Correlación	<b>0.5802</b>	<b>0.4391</b>	<b>0.489</b>
		Valores-p	0.000	0.000	0.000

Tabla 14. Análisis de Mínimos Cuadrados Parciales con su prueba de permutación.

## Discusión

Los resultados de este estudio respaldan una de las principales premisas de la selección sexual: que los caracteres sexuales presentan mayor divergencia morfológica que los caracteres no sexuales (Tabla 13 y Figura 41). Tanto los análisis exploratorios como los estadísticos muestran mayor divergencia morfológica en un carácter sexual (protibia y genitales) respecto a uno no sexual (élitro). Los mismos resultados también indican que en *P. obsoleta* y *P. mucorea* hay dimorfismo sexual en la forma y tamaño de las protibias (CSS) (Figuras: 25, 33 y 40), y únicamente en élitros (CSN) se demostró dimorfismo sexual en tamaño (Figura 38).

El presente estudio se suma a otros estudios realizados con especies de *Phyllophaga*. Morón (2006) describió la variación de los genitales, ilustrando la cápsula genital y los parámetros de varias especies de *Phyllophaga*, entre ellos *P. obsoleta*; Polihronakis (2006) hizo un estudio morfométrico en el cual demostró que los genitales de *Phyllophaga hirticula* varían morfológicamente más que el élitro derecho; también se ha descrito dimorfismo sexual en las antenas de algunas especies de *Phyllophaga*, carácter sexual secundario involucrado en la comunicación sexual y búsqueda de pareja, con diferencias entre sexos en la longitud antenal, longitud de lamelas y tipos de receptores (Romero-López y Morón, 2013; Romero-López *et al.*, 2010); Morón y Blas (2006) describieron el dimorfismo sexual de las antenas, ápice del abdomen y tibias de dos especies de *Phyllophaga*.

También se ha identificado dimorfismo sexual en otros caracteres como tarsos, abdomen, tamaño del cuerpo (Morón, 2006; 2015). Como podemos ver, hay evidencia suficiente de la variación morfológica de estructuras sexuales en especies de *Phyllophaga*, brindándole gran soporte al presente estudio.

La divergencia morfológica de las estructuras sexuales, muy probablemente puede estar relacionada con el modo e intensidad del comportamiento de cortejo. Eberhard (1993) detalló el acoplamiento de *P. obsoleta*, describiendo que, durante el cortejo, ambos sexos se estimulan con sus patas y durante la cópula, los genitales presentan una disposición donde el extremo apical de los parámetros se apoya en la cavidad interna correspondiente con la prominencia preapical de la placa pigdial femenina. Pomiankowski y Møller (1995) y Polihronakis (2006) mencionan que estos tipos de estructuras tienen un papel fundamental en el sistema reproductivo de las especies del género *Phyllophaga*, ya sea para su reconocimiento, cortejo, el acoplamiento mecánico, y/o como posibles indicadores de adecuación y su variación puede ser consecuencia de una historia evolutiva con selecciones direccionales constantes, que posiblemente resultaron de procesos de selección sexual. Por lo tanto, la divergencia morfológica (Figuras: 24, 27, 32 y 36) y el dimorfismo sexual (Figuras: 25, 33, 38 y 40) observado en estas estructuras puede ser producto de la selección sexual (Benítez, 2013). Otros factores determinantes del dimorfismo sexual, pueden ser el tamaño poblacional y la densidad de agregación durante la emersión de adultos, que en general puede ser masiva, pues forman agregados que se posan y compiten por recursos alimenticios

y pareja sobre el follaje, incluso podría influir las diferentes respuestas adaptativas a las condiciones ambientales (Benítez, 2013; Morón, 1986).

El dimorfismo sexual en tamaño observado en ambas especies, muestra que las protibias y los élitros son generalmente más grandes en las hembras (Figuras: 38 y 40). Este resultado podemos relacionarlo con el fenómeno conocido como: “female-biased sexual size dimorphism”, el cual ha sido investigado y documentado en un buen número de taxones, principalmente en animales ectotérmicos como los insectos (Blanckenhorn *et al.*, 2006; Fairbairn *et al.*, 2007). Este proceso, se refiere a los beneficios directos del tamaño, reflejado en la cantidad de recursos corporales para la puesta de un número mayor de huevos y de mejor talla; así como, en la lucha por territorio y recursos para la oviposición, o incluso, calidad en el cuidado maternal postnatal (Steiger, 2013).

Otra de las hipótesis más aceptadas tiene que ver con la fecundidad ya que, en los insectos, se ha correlacionado positivamente el rendimiento reproductivo (número de huevos) de las hembras con el tamaño del cuerpo (usualmente el tamaño del abdomen) (Jannot, 2000). De esta manera, una selección en el tamaño del cuerpo de la hembra para incrementar la fecundidad podría producir un incremento en el tamaño de las alas para así preservar la función de mantener a la hembra en vuelo. Esta hipótesis predice correlaciones directas entre el tamaño del ala, tamaño del cuerpo y fecundidad, que aún faltaría probar (Jannot, 2000). Por otra parte, el dimorfismo en la forma de la protibia, en el cual las hembras presentan dentículos más anchos y largos que los machos (Figuras 25 y 33),

podría también estar relacionado a la hipótesis de "femabel-biased sexual dimorphism" o podría tener un significado funcional en la reproducción de estas especies. Estudios de alometría serían útiles, al igual que observaciones del cortejo y experimentos de éxito reproductivo, para tener más claras las causas de la presencia del dimorfismo en la forma de estas estructuras.

Como ya hemos mencionado, los análisis exploratorios muestran la gran variación morfológica que presentan los parámetros de los genitales masculinos de ambas especies (Figuras 27 y 36). Los parámetros son estructuras muy dinámicas, ya que funcionan como una estructura mecánica de anclaje y probablemente también como una estructura que puede emitir estímulos sensoriales (Polihronakis, 2006; Eberhard, 1993a; Vaz de Mello *et al.*, 2002). Bajo una perspectiva de coevolución antagonista, la variación de éstos permitiría a aquellos machos con ciertos morfotipos lograr un acoplamiento seguro y así extender el periodo de cópula, lo que podría resultar en una respuesta contra-adaptativa por parte de la hembra para evitar este tipo de manipulación del macho. Otra posible explicación, es que la combinación particular de ambos genitales interactúa para extender el periodo de cópula y lograr un mayor éxito reproductivo. No sabemos cuál de estos posibles escenarios predomina o si actúan conjuntamente, sin embargo, son necesarios estudios experimentales donde se analice la correlación entre la variación morfológica de los genitales masculinos y el éxito de paternidad (Polihronakis, 2006).

Smith (1889) trabajó con ejemplares de *P. hirticula* muertos en la cópula, se dio cuenta de que era imposible separar el macho de la hembra sin desgarrar los genitales, a menos que se gire físicamente alguno de ellos aproximadamente 90 grados y de esta manera, sería posible que las hembras no puedan resistirse a los intentos de apareamiento. Eberhard (1993a) observó en ejemplares de *P. obsoleta* de Costa Rica, que durante el clímax de la transferencia espermática, el eje longitudinal del macho forma un ángulo de cerca de 90° con el eje de la hembra (a diferencia de otras especies donde este ángulo es mayor). La selección de la capacidad de la hembra de retirarse de esta posición podría conducir a una carrera de armamentos evolutivos entre machos y hembras por el control de este mecanismo de enlace interactivo, lo que llevaría a la evolución de genitales diversos y específicos (Figuras 10 y 11).

Este supuesto implica un nivel de elección femenina pre-copulatoria, que ocurre después de que los genitales se han insertado, pero es anterior a la inseminación (Polihronakis, 2008a). Estos escenarios hipotéticos posiblemente han generado la variación de la forma observada en los parámetros de ambas especies (Figuras 27 y 36), que sin duda nos reafirma que estas estructuras son bastante dinámicas y lábiles, a tal grado de constituirse como caracteres específicos a nivel especie, siendo de gran ayuda en la caracterización taxonómica (Morón, 2006; Polihronakis, 2008a).

Polihronakis (2008) hizo un estudio donde usó dos marcadores moleculares para poner a prueba la hipótesis nula de las relaciones del género *Phyllophaga*,

basándose en un cladograma inferido de un estudio de Böving (1942). Varios de los grupos de especies clasificados morfológicamente fueron respaldados por la filogenia molecular. Esta filogenia, fue utilizada para reconstruir estados de caracteres plesiomórficos y deducir los patrones de evolución morfológica de los estados de carácter de los genitales. Finalmente llegó a la conclusión de que la forma ancestral de los genitales masculinos era simétrica con los parámetros fusionados (Figura 10), teniendo una transición a parámetros separados (Figura 11) que precedió a varias transiciones con parámetros asimétricos.

Podríamos suponer que *P. mucorea* es una especie cuyo linaje tiene una historia evolutiva más reciente que *P. obsoleta*, y consideremos, que debido a su distribución restringida, viven en ambientes xéricos con condiciones ecológicas más severas, por lo tanto, estos factores pudieron ocasionar que las presiones de selección, la competencia sexual y de recursos, sean los factores que estén condicionando la evolución de los genitales con tasas de divergencia y complejidad morfológica entre ambos linajes (Figuras: 26, 34 y 35) (Morón, 2004 ).

¿Cómo es que las estructuras genitales pueden presentar una variación morfológica considerable sin llegar a comprometer el proceso reproductivo? (Figuras: 27 y 36). En estudios recientes se ha presentado evidencia de una evolución en mosaico en los genitales, sugiriendo que el tamaño y la forma de diferentes porciones de la misma estructura copulatoria pueden responder a diferentes presiones selectivas dependiendo de su función durante la cópula (House y Simmons, 2005; Macagno *et al.*, 2011; Song y Wenzel, 2008; Werner y

Simmons, 2008). Así mismo, estos estudios sugieren que el tamaño y la forma de los genitales y sus componentes, podrían tener un desarrollo genético lo suficientemente desacoplado para evolucionar independientemente (Macagno *et al.*, 2011). El tamaño de los genitales puede ser evolutivamente menos lábil ya que estaría bajo selección estabilizadora, debido a ciertos mecanismos selectivos como el de “*un tamaño se ajusta a todos*” y el mismo acoplamiento mecánico (Eberhard *et al.*, 1998; Eberhard, 2009; Macagno *et al.*, 2011).

Se ha propuesto que el tamaño de los genitales podría tener una evolución relativamente lenta debido a las constricciones de desarrollo impuestas por el crecimiento de otras estructuras, y varios estudios en insectos mencionan que los apéndices de estos, e incluso los genitales *per se*, presentan un proceso de trade-off durante etapas tempranas que influye en las decisiones de distribución. Esto sugiere que el tamaño de los genitales, y de apéndices en general, podría estar bajo fuertes constricciones pleiotrópicas, más que la forma y así presentar una divergencia menos rápida entre poblaciones y especies (Moczek y Nijhout 2004, Macagno *et al.*, 2011; Parzer y Moczek, 2008). De esta forma, la variación de la forma de los parámetros observada en este estudio puede ser producto de una evolución separada a la estructura genital en su totalidad (Figuras 27 y 36). Podríamos entender los niveles observados de variación fenotípica como una consecuencia de un balance entre selección natural y la sexual (Simmons, 2003).

El tamaño en protibias y élitros diverge más en *P. obsoleta* que en *P. mucorea* (Figuras 38 y 40), esto puede ser consecuencia de la facilidad con que *P.*



*obsoleta* se adapta a las perturbaciones naturales o inducidas, lo cual le ha permitido dispersarse de una comunidad a otra pasando por áreas restrictivas para otras especies del género por lo que, a la larga, la simpatría no ha permitido la fijación de caracteres en un grado similar al de otras especies con distribución restringida (Morón, 2006).

Otro aspecto interesante es la diferencia notable que se observa entre la variación de los CSN y los CSS (Figuras 41 y 42), que indican una mayor divergencia morfológica, pero más aún, que estas mismas diferencias son más acentuadas en *P. mucorea*, que, al mismo tiempo, tiene una distribución más restringida y pertenece a uno de los subgéneros de *Phyllophaga* con las más variables y ornamentadas estructuras genitales. Una posible explicación congruente con estos hechos es que, *P. mucorea* forme parte de un linaje en el cual, las presiones de selección por recursos ecológicos, pareja y competencia sexual sean mucho más acentuadas, situación que no sería rara para especies que habitan en condiciones desérticas o semidesérticas, además de que estas condiciones de complejidad morfológica genital, al parecer, son como ya se ha mencionado, caracteres derivados de estructuras más simples. En este sentido, es lamentable el no haber podido hacer comparaciones de variación y divergencia morfológica entre los genitales masculinos de ambas especies, pues la enorme diferencia entre estas imposibilitó la ubicación de puntos homólogos y el diseño de plantillas congruentes.

Los análisis de covarianza entre las tres estructuras no resultaron como se habían previsto (Tabla 14), ya que en general se esperaba una mayor asociación en los patrones de variación entre los CSS y los CSP, pues se ha documentado que los CSS sirven como indicativos de salud y vigor sexual, encontrando una relación positiva entre el tamaño de las patas y la longitud del edeago, sin embargo, la mayor correlación de variación se presentó entre los élitros y las protibias de los machos, a lo cual no podemos dar una respuesta en términos de éxito reproductivo o evolutivo en general.

## Conclusiones

El presente estudio respalda a la teoría de selección sexual y reafirma que la morfometría geométrica es una herramienta bastante útil para cuantificar la forma de estructuras y visualizar la variación de las mismas, ya que nos permitió describir la variación de manera detallada e incluso hallar diferencias en estructuras que a simple vista no son tan fáciles de distinguir. Además, cuantificar la variación de la forma junto con la variación del tamaño, nos permite ampliar nuestro panorama sobre la biología de las estructuras de estudio.

Cabe mencionar que son necesarios estudios donde se incluya la genitalia femenina y también estudios etológicos de competencia sexual, para poder tener un marco sólido donde se puedan soportar con evidencia los planteamientos que aquí se han expuesto.

Es importante realizar el análisis con los genitales femeninos, pues de todas las interacciones posibles, el contacto genital en especies con fertilización interna es la más directa. Por esta razón, es de esperarse que ambas partes coevolucionen, pues se ha observado particularmente una covariación morfológica y genética entre los genitales de ambos sexos de muchos taxones (Brennan y Prum, 2015).

Datos empíricos de comportamiento y un marco filogenético, podría ser el escenario ideal para poder explicar la dirección y la tasa del cambio en el tamaño y forma de los CSS y CSP. De igual manera, buscar una correlación con el comportamiento del cortejo y la intensidad de la competencia sexual, lo cual se ha

hecho con otros insectos [(vg (Hormiga *et al.*, 2000; Gidaszewski *et al.*, 2009)]. Este escenario ayudaría a explicar el origen y la evolución de estos rasgos y contribuir a una de las más interesantes y desafiantes áreas de investigación contemporánea en el campo de la evolución biológica, la selección sexual.

## Referencias

- Abdi, H., & Williams, L. J. (2010). Principal component analysis. Wiley interdisciplinary reviews: computational statistics, 2(4), 433-459.
- Adams, D. C. (1999). Methods for shape analysis of landmark data from articulated structures. *Evolutionary Ecology Research*, 1(8), 959-970.
- Adams, D. C., Rohlf, F. J., & Slice, D. E. (2004). Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology*, 71(1), 5-16.
- Adams, D. C., Rohlf, F. J., & Slice, D. E. (2013). A field comes of age: geometric morphometrics in the 21st century. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 24(1), 7-14.
- Ah-King, M., Barron, A. B., & Herberstein, M. E. (2014). Genital evolution: why are females still understudied?. *PLoS biology*, 12(5), e1001851.
- Alexander, R. D., Marshall, D. C., & Cooley, J. R. (1997). Evolutionary perspectives on insect mating. *The evolution of mating systems in insects and arachnids*. Cambridge University Press, United Kingdom, 4-31.
- Aragón, G., A., Morón, M. Á., López-Olguín, J. F., y Cervantes-Peredo, L. M. (2005). Ciclo de vida y conducta de adultos de cinco especies de *Phyllophaga* Harris, 1827 (Coleoptera: Melolonthidae; Melolonthinae). *Acta zoológica mexicana*, 21(2), 87-99.
- Arnqvist, G. (1997). The evolution of animal genitalia: distinguishing between hypotheses by single species studies. *Biological Journal of the Linnean Society*, 60(3), 365-379.
- Arnqvist, G. (1998). Comparative evidence for the evolution of genitalia by sexual selection. *Nature*, 393(6687), 784-786.
- Arnqvist, G., & Rowe, L. (2005). *Sexual conflict*. Princeton University Press. Princeton. New Jersey, USA, 352 pp.
- Benítez, H. A. (2013). Sexual dimorphism using geometric morphometric approach. In *Sexual Dimorphism*. InTech. 35 pp.
- Benítez-Herrera, L. N., Martínez-M, I., y Romero-López, A. A. (2015). Anatomía del Aparato Reprodutor de *Macroductylus mexicanus* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae) y su Posible Participación en su Comunicación Química Sexual. *Southwestern entomologist*, 40(1), 189-198.
- Berns, C. M. (2013). The evolution of sexual dimorphism: understanding mechanisms of sexual shape differences. In: Moriyama H, editor. *Sexual*

dimorphism. Rijeka: InTech. 1-16.

Blanckenhorn, W. U., Dixon, A. F., Fairbairn, D. J., Foellmer, M. W., Gibert, P., Linde, K. V. D., ... & Signorelli, M. (2006). Proximate causes of Rensch's rule: does sexual size dimorphism in arthropods result from sex differences in development time?. *The American Naturalist*, 169(2), 245-257.

Bookstein, F. L. (1996). Combining the tools of geometric morphometrics. In *Advances in morphometrics*. Springer US. 131-151.

Böving, A. G. (1942). A classification of larvae and adults of the genus *Phyllophaga* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Memoirs of the Entomological Society of Washington* 2: 1-95.

Brennan, P. L., & Prum, R. O. (2015). Mechanisms and evidence of genital coevolution: the roles of natural selection, mate choice, and sexual conflict. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(7), a017749.

Cardini, A., & Loy, A. (2013). On growth and form in the "computer era": from geometric to biological morphometrics. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 24(1), 1-5.

Chapman, T., Arnqvist, G., Bangham, J., & Rowe, L. (2003). Sexual conflict. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(1), 41-47.

Coca-Abia, M., Martín-Piera, F., y Morón, M. A. (1993). Anatomía y morfología de la genitalia femenina de las especies mexicanas del género *Phyllophaga* (sensu lato) (Coleoptera: Melolonthidae). Relaciones filogenéticas con otros géneros del área Mediterránea. *Giornale Italiano de Entomologie*, 6, 263-274.

Darwin, C. (1871). *The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex*. London: John Murray. *Animal Behaviour*, 4(7), 6.

d'Hotman, D., & Scholtz, C. H. (1990). Comparative morphology of the male genitalia of derived groups of Scarabaeoidea (Coleoptera). *Elytron*, (4), 3-39.

Eberhard, W. G. (1985). *Sexual selection and animal genitalia* (Vol. 244). Cambridge, MA: Harvard University Press.

Eberhard, W. G. (1992). Species isolation, genital mechanics, and the evolution of species-specific genitalia in three species of *Macrodactylus* beetles (Coleoptera, Scarabaeidae, Melolonthinae). *Evolution*, 46(6), 1774-1783.

Eberhard, W. G. (1993a). Copulatory courtship and morphology of genitalic coupling in seven *Phyllophaga* species (Coleoptera: Melolonthidae). *Journal of Natural History*, 27(3), 683-717.

Eberhard, W. G. (1993b). Functional significance of some secondary sexual characters in three species of *Macrodactylus* (Coleoptera: Melolonthidae). *The*

Coleopterists' bulletin, USA, 53-60.

Eberhard, W. G. (1996). *Female control: sexual selection by cryptic female choice*. Princeton University Press. 472 pp.

Eberhard, W. G. (2004a). Rapid divergent evolution of sexual morphology: comparative tests of antagonistic coevolution and traditional female choice. *Evolution*, 58(9), 1947-1970.

Eberhard, W. G. (2004b). Male–female conflict and genitalia: failure to confirm predictions in insects and spiders. *Biological Reviews*, 79(1), 121-186.

Eberhard W. G. (2009). Rapid divergent evolution of genitalia: Theory and data updated. In: Leonard J, Cordoba-Aguilar A (eds) *The evolution of primary sexual characters in animals*. Oxford University Press, Oxford, New York. 40–78.

Eberhard, W. G. (2010). Evolution of genitalia: theories, evidence, and new directions. *Genetica*, 138(1), 5-18.

Eberhard, W. G., Huber, B. A., Briceño, R. D., Salas, I., & Rodriguez, V. (1998). One size fits all? Relationships between the size and degree of variation in genitalia and other body parts in twenty species of insects and spiders. *Evolution*, 52(2), 415-431.

Elewa, A. M. (2010). *Morphometrics for nonmorphometricians* (Vol. 124). Berlin: Springer. 367 pp.

Fairbairn, D. J., Blanckenhorn, W. U., & Székely, T. (Eds.). (2007). *Sex, size and gender roles: evolutionary studies of sexual size dimorphism*. Oxford University Press. DOI: 10.1093/acprof:oso/9780199208784.001.0001.

Ghiselin, M.T. (2010). The distinction between primary and secondary sexual character. In: *The Evolution of Primary Sexual Characters in Animals* (J.L. Leonard & A. Cordoba-Aguilar, eds). Oxford University Press Inc, New York, USA. 9–14.

Gidaszewski, N. A., Baylac, M., y Klingenberg, C. P. (2009). Evolution of sexual dimorphism of wing shape in the *Drosophila melanogaster* subgroup. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 110.

Holland, B., & Rice, W. R. (1998). Perspective: chase-away sexual selection: antagonistic seduction versus resistance. *Evolution*, 52(1), 1-7.

Hormiga, G., Scharff, N., y Coddington, J. A. (2000). The phylogenetic basis of sexual size dimorphism in orb-weaving spiders (Araneae, Orbiculariae). *Systematic Biology*, 49(3), 435-462.

Horn, G. H. (1878). Revision of the species of *Listrochelus* of the United States. *Transactions of the American Entomological Society and Proceedings of the Entomological Section of the Academy of Natural Sciences*, 7, 137-148.

- House, C. M., & Simmons, L. W. (2005). The evolution of male genitalia: patterns of genetic variation and covariation in the genital sclerites of the dung beetle *Onthophagus taurus*. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(5), 1281-1292.
- House, C. M., Lewis, Z., Hodgson, D. J., Wedell, N., Sharma, M. D., Hunt, J., & Hosken, D. J. (2013). Sexual and natural selection both influence male genital evolution. *PLoS One*, 8(5), e63807.
- Jannot, J. E. (2000). Body size, sexual dimorphism and allometry in adult Hydropsychidae (Trichoptera) (Doctoral dissertation, Montana State University-Bozeman, College of Letters & Science). 149 pp.
- Jannot, J. E., & Kerans, B. L. (2003). Body size, sexual size dimorphism, and Rensch's rule in adult hydropsychid caddisflies (Trichoptera: Hydropsychidae). *Canadian Journal of Zoology*, 81(12), 1956-1964.
- Jones, B., & Sall, J. (2011). "JMP Statistical Software" *WIREs Comp Stat* 3:188–194 DOI: 10.1002/wics.162.
- Kendall, D. G. (1977). The diffusion of shape. *Advances in applied probability*, 9(3), 428-430.
- Klaczko, J., Ingram, T., & Losos, J. (2015). Genitals evolve faster than other traits in *Anolis* lizards. *Journal of Zoology*, 295(1), 44-48.
- Klingenberg, C. P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular ecology resources*, 11(2), 353-357.
- Klingenberg, C. P. (2013a). MorphoJ User's Guide. MorphoJ User's Guide. Tomado de: [http://www.flywings.org.uk/MorphoJ\\_guide/frameset.htm?index.htm](http://www.flywings.org.uk/MorphoJ_guide/frameset.htm?index.htm)
- Klingenberg, C. P. (2013b). Visualizations in geometric morphometrics: how to read and how to make graphs showing shape changes. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 24(1), 15-24.
- Lemic, D., Benítez, H. A., & Bažok, R. (2014). Intercontinental effect on sexual shape dimorphism and allometric relationships in the beetle pest *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae). *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, 253(3), 203-206.
- Macagno, A. L., Pizzo, A., Parzer, H. F., Palestrini, C., Rolando, A., & Moczek, A. P. (2011). Shape-but not size-codivergence between male and female copulatory structures in *Onthophagus* beetles. *PLoS One*, 6(12), e28893.
- Martínez-Bonilla, O. K., Romero-López, A. A., & Benítez-Herrera, L. N. (2015). Morfometría corporal y antenal de *Macrodactylus mexicanus* y *Macrodactylus nigripes* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae) y descripción de sus sensilas lamelares. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Entomología (nueva serie), número especial*, 1, 81-87.



- Metcalfe, M. E. (1932). The structure and development of the reproductive system in the Coleoptera with notes on its homologies. *Journal of Cell Science*, s2-75: 49-12.
- Mitteroecker, P., & Gunz, P. (2009). Advances in geometric morphometrics. *Evolutionary Biology*, 36(2), 235-247.
- Mitteroecker, P., Gunz, P., Windhager, S., & Schaefer, K. (2013). A brief review of shape, form, and allometry in geometric morphometrics, with applications to human facial morphology. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 24(1), 59-66.
- Moczek, A. P., & Nijhout, H. F. (2004). Trade-offs during the development of primary and secondary sexual traits in a horned beetle. *The American Naturalist*, 163(2), 184-191.
- Monteiro, L. R., Bordin, B., & dos Reis, S. F. (2000). Shape distances, shape spaces and the comparison of morphometric methods. *Trends in ecology & evolution*, 15(6), 217-220.
- Monteiro, L. R., Diniz-Filho, J. A. F., dos Reis, S. F., & Araújo, E. D. (2002). Geometric estimates of heritability in biological shape. *Evolution*, 56(3), 563-572.
- Morón, M. Á. (1986). The genus *Phyllophaga* in Mexico, morphology, distribution and supraspecies systematics (Insecta: Coleoptera). Instituto de Ecología. Xalapa, México. 341 pp.
- Morón, M. Á. (1988). Notas sobre *Phyllophaga* (III). Una nueva especie Mexicana con dimorfismo sexual extraordinario (Coleóptera: Melolonthidae). *Folia Entomológica Mexicana* No. 76: 73-81.
- Morón, M. Á. (2004). Escarabajos, 200 millones de años de evolución. Instituto de Ecología, AC y Sociedad Entomológica Aragonesa. Zaragoza, España, 204 pp.
- Morón, M. Á. (2006). Revisión de las especies de *Phyllophaga* (*Phytalus*) grupos *obsoleta* y *pallida* (Coleoptera: Melolonthidae: Melolonthinae). *Folia Entomológica Mexicana*, 45 (Su1). 1-104.
- Morón, M. Á. (2015). COLEOPTERA: *Phyllophaga* (s. str.) *santiagozai*, una nueva especie de la zona árida de Puebla, México (Coleoptera: Melolonthidae: Melolonthinae). *Dugesiana*, 17 (2). 167-170.
- Morón, M. Á., y Blas, M. (2006). Dos especies nuevas de *Phyllophaga* del grupo " *schizorhina*" (Coleoptera: Melolonthidae: Melolonthinae) de Chiapas, México. *Folia Entomológica Mexicana*, 45 (1). 35-46.
- Morón, M. Á., y Robbins, P. S. (2004). Especie nueva de *Phyllophaga* (*Chlaenobia*) (Coleoptera: Melolonthidae: Melolonthinae) de Honduras, América Central. *Anales del Instituto de Biología. Serie Zoología*, 75(2). 331-339.

Morón, M. Á., Ratcliffe, B. C., y Delya, C. (1997). Atlas de los escarabajos de México: Coleoptera Lamellicornia Vol. I Familia Melolonthidae Subfamilias Rutelinae, Dynastinae, Cetoniinae, Trichiinae, Valginae y Melolonthinae. México: Sociedad Mexicana de Entomología, 280 pp.

Muñoz, C. Z., y Cruz, J. J. S. (1999). Asimetría y selección sexual en insectos. Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa, (26), 703-712.

Parzer, H. F., & Moczek, A. P. (2008). Rapid antagonistic coevolution between primary and secondary sexual characters in horned beetles. *Evolution*, 62(9), 2423-2428.

Pizzo, A., Macagno, A. L., Dusini, S., y Palestrini, C. (2012). Trade-off between horns and other functional traits in two *Onthophagus* species (Scarabaeidae, Coleoptera). *Zoomorphology*, 131(1), 57-68.

Polihronakis, M. (2006). Morphometric analysis of intraspecific shape variation in male and female genitalia of *Phyllophaga hirticula* (Coleoptera: Scarabaeidae: Melolonthinae). *Annals of the entomological Society of America*, 99(1), 144-150.

Polihronakis, M. (2008a). Factors promoting the evolution of sexually dimorphic traits and their consequences on lineage diversification in *Phyllophaga* beetles (Coleoptera: Scarabaeidae). Dissertation, University of Connecticut, Storrs, CT.

Polihronakis, M. (2008b). Hierarchical comparative analysis of genetic and genitalic geographical structure: testing patterns of male and female genital evolution in the scarab beetle *Phyllophaga hirticula* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 96(1), 135-149.

Pomiankowski, A., & Møller, A. P. (1995). A resolution of the lek paradox. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 260(1357), 21-29.

Ramírez-Ponce, A., y Morón, M. A. (2012). Revision of the genus *Pachystethus* Blanchard with description of three new species from Mexico (Coleoptera: Scarabaeidae: Rutelinae: Anomalini). *Zootaxa*, 3394(1), 1-24.

Richmond, M. P., Park, J., & Henry, C. S. (2016). The function and evolution of male and female genitalia in *Phyllophaga* Harris scarab beetles (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of evolutionary biology*, 29(11), 2276-2288.

Richtsmeier, J. T., Burke DeLeon, V., & Lele, S. R. (2002). The promise of geometric morphometrics. *American journal of physical anthropology*, 119(S35), 63-91.

Rohlf, F. J. (1990). Morphometrics. *Annual Review of ecology and Systematics*, 21(1), 299-316.

Rohlf, F. J. (1999). Shape statistics: Procrustes superimpositions and tangent spaces. *Journal of Classification*, 16(2), 197-223.

- Rohlf, F. J. (2013). TpsDig2, digitize landmarks and outlines, version 2.17. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, 2013. [Electronic resource].
- Rohlf, F. J. (2015). The tps series of software. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 26(1), 9-12.
- Rohlf, F. J., & Marcus, L. F. (1993). A revolution morphometrics. *Trends in Ecology & Evolution*, 8(4), 129-132.
- Rohlf, F. J., & Corti, M. (2000). Use of two-block partial least-squares to study covariation in shape. *Systematic Biology*, 49(4), 740-753.
- Romero-López, A. A., Arzuffi, R., Valdez, J., y Morón, M. Á. (2009). Morfología y protrusión-retracción de la cámara genital femenina de *Phyllophaga obsoleta* (Coleoptera: Melolonthidae). *Acta zoológica mexicana*, 25(2), 315-321.
- Romero-López, A. A., Arzuffi, R., Valdez, J., Morón, M. Á., Castrejón-Gómez, V., & Villalobos, F. J. (2004). Sensory organs in the antennae of *Phyllophaga obsoleta* (Coleoptera: Melolonthidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 97(6), 1306-1312.
- Romero-López, A. A., & Morón, M. Á. (2013). Sexual Dimorphism in Antennae of Mexican Species of *Phyllophaga* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae). *SEXUAL DIMORPHISM*, 17.
- Romero-López, A., Morón, M., & Valdez, J. (2010). Sexual dimorphism in antennal receptors of *Phyllophaga ravid* Blanchard (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae). *Neotropical Entomology*, 39(6), 957-966.
- Roth, V. L., & Mercer, J. M. (2000). Morphometrics in development and evolution. *American Zoologist*, 40(5), 801-810.
- Rowe, L., & Arnqvist, G. (2012). Sexual selection and the evolution of genital shape and complexity in water striders. *Evolution*, 66(1), 40-54.
- Saylor, L. (1940). Revision of the scarabaeid beetles of the phyllophagan subgenus *Listrochelus* of the United States, with discussion of related subgenera. *Proceedings of the United States National Museum*; v. 89, no. 3095. 59-130.
- Shapiro, A. M., & Porter, A. H. (1989). The lock-and-key hypothesis: evolutionary and biosystematic interpretation of insect genitalia. *Annual review of entomology*, 34(1), 231-245.
- Sheets, H. D. (2006). IMP software series. New York. [Electronic resource].
- Simmons, L. W. (2003). Genital morphology and fertilization success in the dung beetle *Onthophagus taurus*: an example of sexually selected male genitalia. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1514),

447-455.

Slice, D. E. (2007). Geometric morphometrics. *Annual Review of Anthropology*, 36, 261-281.

Smith, J. B. (1889). Notes on the species of *Lachnosterna* of temperate North America with descriptions of new species. *Proceedings of United States National Museum*, 11, 481-525.

Song, H., & Bucheli, S. R. (2010). Comparison of phylogenetic signal between male genitalia and non-genital characters in insect systematics. *Cladistics*, 26(1), 23-35.

Song, H., & Wenzel, J. W. (2008). Mosaic pattern of genital divergence in three populations of *Schistocerca lineata* Scudder, 1899 (Orthoptera: Acrididae: Cyrtacanthacridinae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 94(2), 289-301.

Steiger, S. (2013). Bigger mothers are better mothers: disentangling size-related prenatal and postnatal maternal effects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280 (1766). DOI: 10.1098/rspb.2013.1225

Tatsuta, H., Mizota, K., & Akimoto, S. I. (2001). Allometric patterns of heads and genitalia in the stag beetle *Lucanus maculifemoratus* (Coleoptera: Lucanidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 94(3), 462-466.

Toro Ibacache, M. V., Manriquez Soto, G., y Suazo Galdames, I. (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.

Vaz de Mello, F. Z., C. López-Andrade, & A. A. Zacaro. (2002). Ultramorphology of the male external genitalia of *Trichillum* and *Pedaridium* (Insecta: Coleoptera: Scarabaeidae). *Proceedings of the Fifteenth International Congress On Electron Microscopy*, Durban, South Africa.

Villardón, J. (2002). Análisis de componentes principales. Cataluña: UOC, Departamento de Estadística, 32 pp.

Virginio, F., Vidal, P. O., & Suesdek, L. (2015). Wing sexual dimorphism of pathogen-vector culicids. *Parasites & vectors*, 8(1), 1-9.

Voje, K. L. (2016). Scaling of morphological characters across trait type, sex, and environment: a meta-analysis of static allometries. *The American Naturalist*, 187(1), 89-98.

Webster, M. A. R. K., & Sheets, H. D. (2010). A practical introduction to landmark-based geometric morphometrics. *Quantitative methods in paleobiology*, 16, 163-188.

Werner, M., & Simmons, L. W. (2008). The evolution of male genitalia: functional

integration of genital sclerites in the dung beetle *Onthophagus taurus*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 93(2), 257-266.

Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., Sheets, H. D., & Fink, W. L. (2004). *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. New York and London: Elsevier Academic Press Google Scholar. 437 pp.

Zunino, M. (2012). Cuarenta años de anatomía de las piezas genitales en la taxonomía de los escarabajos (Coleoptera: Scarabaeoidea): el estado del arte. *Dugesiana*, 18(2), 197-206.