



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Relación entre adultos de *Macroductylus nigripes*
(Coleoptera: Melolonthidae) y potenciales plantas
hospederas: estandarización de bioensayos y de la
técnica de extracción de volátiles

Tesis presentada como requisito para
obtener el título de: Licenciatura en
Biología

PRESENTA:

Ericka Nieves Silva

DIRECTOR DE TESIS:

Angel Alonso Romero López



Noviembre, 2016

Agradezco

- Al CONACyt , proyecto PDCPN-21466-2013, por apoyar con en el análisis de compuestos volátiles.
- Al profe Angel Romero, por haberme “convencido” que la ecología química es bastante interesante y por ayudarme a finalizar mi tesis.
- A Rossy, por ayudarme a utilizar por primera vez algunos de los instrumentos requeridos en mi tesis y también por sus consejos.
- A la Dra. Esmeralda García, por mostrarme esta parte de la química con la que yo no estaba tan familiarizada y siempre de la mejor manera explicarme y resolver mis dudas al respecto.
- Al laboratorio de ecología química (Dafne, Sarai, Paco, Raquel, Kareem y Abraham), por aportar en cierto momento con sus dudas con respecto a esta tesis y además porque en los contados momentos en que nos reuníamos me la pasaba muy bien.
- A mis AMIGOS que son parte importante en mi vida y saben que los amo “un montón”...
- A mi amiga Erendira, por siempre estar conmigo, apoyándome en todo momento y sé que seguiremos juntas recorriendo esta vida con nuestros respectivos logros.
- A las personas que estuvieron en esta carrera conmigo, “mis novias” Julia y Maritoña, mucho tiempo juntas, pasando los mejores momentos de la carrera con ustedes, no lo cambiaría por nada. “Luzer”, “Cuanalo”, Mago, Fatima, Sarai y Danaee, todos ustedes aportando total felicidad a mi vida.
- Finalmente a mi familia por apoyarme para terminar esta carrera y motivarme para seguir por más...

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Ecología química y su importancia en el estudio de insectos	3
2.2. Volátiles de plantas y su interacción con insectos	3
2.3. Generalidades del sistema olfativo de insectos	5
2.4. Coleópteros Melolonthidae	6
2.4.1. Comunicación química de los melolóntidos	7
2.4.2. Antecedentes sobre la interacción melolóntido-volátiles de plantas	7
2.5. Generalidades de <i>Macrodactylus nigripes</i>	9
2.6. Comunicación química y plantas hospederas de <i>M. nigripes</i>	11
2.7. Uso de olfatómetros para estudios de comunicación química en melolóntidos	12
2.8. Métodos para la extracción de VP	13
2.8.1. Aireación dinámica	13
2.8.2. Métodos de muestreo de compuestos volátiles de manera estática	14
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVOS	17
5.1. Objetivo general	17
5.2. Objetivos particulares	17
6. MATERIALES Y MÉTODOS	17
6.1. Obtención de modelo biológico y de estímulos	17
6.2. Fabricación y estandarización del olfatómetro con bioensayos activos y pasivos	18
6.3. Extracción de volátiles de estímulos probados en el olfatómetro	21
7. RESULTADOS	23
7.1. Bioensayos activos	23
7.2. Bioensayos pasivos con estímulos “físicos” y con extractos	23
7.3. Extracción de volátiles y análisis cromatográfico	25
7.3.1 Volátiles de hojas de azumiate	25
7.3.2. Volátiles de fragmentos de piña	26

8. DISCUSIÓN	33
8.1. Bioensayos activos con olfatómetro	33
8.2. Bioensayos pasivos con estímulos “físicos” y con extractos.....	33
8.3. Elección del tipo de olfatómetro y de estímulos para bioensayos	35
8.4. Respuesta diferencial de hembras y machos de <i>M. nigripes</i> hacia los estímulos probados en los bioensayos.....	36
8.5. Análisis cromatográfico	37
8.5.1. Volátiles de hojas de azumiate	37
8.5.2. Volátiles de fragmentos de piña.....	38
9. CONCLUSIONES	39
10. LITERATURA CITADA.....	40

RESUMEN

Se llevaron a cabo bioensayos activos y pasivos, para evaluar la preferencia de hembras y machos de *Macrodactylus nigripes* (Bates) hacia diferentes estímulos. Se emplearon maíz (*Zea mays* L.), "azumiate" (*Baccharis salicifolia* Ruiz y Pavón), piña (*Ananas comosus* L.) y octil-butirato, esto con la ayuda de un olfatómetro, portátil, construido con base en el diseño de Ranjith (2007). Aunque se observaron respuestas positivas por parte de los adultos de ambos sexos en las pruebas activas y pasivas, sólo se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en los bioensayos pasivos, principalmente hacia las hojas y extractos de maíz y azumiate con respecto al control. A partir de estos resultados, se puede sugerir que ambas especies vegetales liberan volátiles que atraen a hembras y machos de *M. nigripes*. El análisis químico de los volátiles, se llevó a cabo por la técnica de microextracción en fase sólida. Con base en ello, se obtuvo un listado de los compuestos liberados por hojas de azumiate y de fragmentos de piña, por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Este trabajo, aportó información acerca de la respuesta olfativa de *M. nigripes* a potenciales plantas hospederas y de la metodología llevada a cabo para tal fin (bioensayos), ya que se trata del primer reporte de este tipo para coleópteros Melolonthidae en México, específicamente para *M. nigripes*.

1. INTRODUCCIÓN

La familia Melolonthidae se encuentra distribuida ampliamente en el territorio mexicano con la presencia de 110 géneros y 1,040 especies, desde el nivel del mar hasta los 3,800 m de altitud, abarcando la mayor parte de los diferentes tipos de vegetación natural y modificada (Morón *et al.*, 1997; Morón *et al.*, 2014). Dentro de esta familia se encuentra el género *Macrodactylus*, del cual se distribuyen 27 especies en México (Caselín-Castro *et al.*, 2003). Las larvas de los integrantes de este género pueden causar daños en las raíces de diversos cultivos, pastos forrajeros y de ornato. Mientras tanto los adultos se alimentan del follaje tierno, flores, frutos, polen y secreciones de savia dulce y árboles silvestres y cultivados. Pueden causar daños de importancia económica, ya que inciden negativamente en el rendimiento de diversos cultivos agrícolas y son considerados en su mayoría plaga, observándose cientos de ellos en una sola planta (Morón *et al.*, 1997; Arce-Pérez y Morón, 2000). Actualmente se utilizan diversos métodos para la protección de cultivos y bosques, como el control directo con plaguicidas; sin embargo, no se ha obtenido una solución definitiva a este problema y se ha recurrido al monitoreo y a la modificación del comportamiento (atracción o repulsión) de la especie plaga para dirigirla hacia un punto conveniente para su manejo. Esto, se logra a través del uso de sustancias químicas involucradas en diversas interacciones ecológicas (Contreras, 2011; Romero-López, 2012). Para ello, es necesario tener suficientes datos acerca de todos los aspectos que intervienen en la comunicación química de estos insectos; uno de ellos es la interacción con plantas hospederas.

El presente trabajo pretende proveer información acerca de la respuesta de *Macrodactylus nigripes* (Bates) hacia diferentes estímulos (potenciales plantas hospederas), poniendo a prueba un prototipo de olfatómetro adaptado para bioensayos requeridos en estudios de comunicación química. Asimismo, se espera brindar información sobre los compuestos volátiles (CV) liberados por algunas de estas plantas, estandarizando de microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés).

2. ANTECEDENTES

2.1. Ecología química y su importancia en el estudio de insectos

La ecología química es un área de estudio que surge durante mediados del siglo XX y es por definición, un área integrativa que como punto de partida, reconoce que todos los organismos utilizan estímulos químicos para interactuar entre sí y que hay compuestos químicos que intervienen en las relaciones entre organismos (Byers, 1989; Rojas y Malo, 2012).

Estos compuestos o sustancias químicas, dependiendo del contexto en el que se les encuentren, se les pueden llamar infoquímicos, los cuales transmiten información de un individuo a otro y generan en el receptor una respuesta conductual o fisiológica. Se dividen principalmente en feromonas y aleloquímicos. Esto depende de si la interacción es intraespecífica y/o interespecífica (Dicke y Sabelis, 1988).

En la actualidad se conocen aproximadamente un millón de especies de insectos; se calcula que esta cantidad representa aproximadamente un 20% de la biodiversidad total de insectos, aunque es probable que haya entre cinco y diez millones de especies (Cardé y Millar, 2004). Debido a esta gran diversidad, la ecología química busca caracterizar el tipo de compuestos que intervienen en las múltiples relaciones que los insectos establecen entre sí y con otros organismos, particularmente con las plantas. La comunicación química juega un papel importante en casi todos los aspectos de la vida de los insectos (Rojas y Malo, 2012).

2.2. Volátiles de plantas y su interacción con insectos

Uno de los fenómenos más interesantes que ocurren en las plantas es la liberación de compuestos orgánicos volátiles, también llamados metabolitos secundarios, infoquímicos o simplemente volátiles de plantas (VP). La emisión es un proceso que sucede en todas las plantas, ocupa entre el 10 y 36% del carbono asimilado, dependiendo de la especie vegetal (Bautista-Lozada *et al.*, 2012). Los VP emitidos son mezclas complejas de muchos compuestos orgánicos que

representan pequeñas cantidades con respecto al peso total de la planta. Conocidos también como aceites esenciales, aceites volátiles o esencias, generalmente son sustancias altamente lipofílicas de bajo peso molecular, cuya volatilidad se debe a que se evaporan al ser expuestos al aire o a temperatura ambiente y que tienen altas presiones de vapor (Marín-Loaiza y Céspedes, 2007). Estos compuestos son producidos por hojas, frutos, flores y raíces, pero principalmente se liberan a través de la superficie y sitios de almacenamiento de las hojas (Paré y Tumlinson, 1999).

En la actualidad se han descrito más de 1700 compuestos volátiles a partir de especies que pertenecen a más de 90 familias de plantas, que constituyen aproximadamente el 1% de todos los metabolitos secundarios de plantas conocidas en la actualidad. Estos compuestos pueden clasificarse en tres grandes grupos: 1) terpenos, 2) fenilpropanoides/benzenoides, y 3) derivados de ácidos grasos, los cuales se producen naturalmente, por daño o estímulo mecánico (por ejemplo: heridas, alimentación, oviposición, etc.). Funcionando como defensa directa repeliendo a insectos o indirectamente atrayendo a enemigos naturales del atacante. Además, se ha propuesto que esta emisión de volátiles se debe a estrés abiótico, como cambio climático (por ejemplo: temperatura, humedad, precipitaciones, etc.) (Holopainen, 2004; Maffei *et al.*, 2011, Bautista-Lozada *et al.*, 2012). El cambio climático resulta en alteraciones significativas de la estructura y función de los organismos, comunidades y ecosistemas, (Pañuelas y Staudt, 2010). Los VP generan redes interactivas muy complejas, con implicaciones ecológicas (Dicke, 2000; Acamovic y Brooker, 2005).

Los insectos se han adaptado para alimentarse de los órganos de las plantas en el suelo en su fase larvaria y del follaje foliar como adultos (Blossey y Hunt-Joshi, 2003). En general, usan los VP para encontrar su alimento, pareja, evitar depredadores, encontrar una planta hospedera como lugar de apareamiento, ovipositar o como refugio. Los insectos que viven en ambientes sobre el suelo, utilizan una amplia gama de sistemas sensoriales como estímulos olfativos, visuales, acústicos y térmicos que les sirven para localizar su alimento antes de

llegar a contactarlo (Holopainen, 2004; Méndez-Aguilar *et al.*, 2008; Grajales-Conesa *et al.*, 2011). Las estructuras sensoriales suministran al sistema nervioso del animal la información para generar una representación interna simplificada del exterior, que a su vez permite que el animal tenga una respuesta comportamental adecuada a la situación. En este sentido, los insectos han demostrado ser un modelo exitoso para el estudio del sentido de la olfacción (Hansson y Stensmyr, 2011).

2.3. Generalidades del sistema olfativo de insectos

El olfato es de importancia fundamental para la mayoría de los insectos. La detección de estímulos olfativos del ambiente puede darse a partir de las estructuras antenales que se encuentran en muchos insectos o gustación a partir de palpos bucales y maxilares, dependiendo de si el estímulo se percibe en el aire o a través de contacto físico (Guidobaldi y Guerenstein, 2012).

El segmento distal de las antenas está cubierto en diferentes grados con sensilas olfativas, que muestran una amplia variedad de formas y estructuras. Independientemente de la forma, las sensilas olfativas comparten la misma función, es decir, encapsular y proteger las neuronas receptoras olfativas (NROs), las cuales son responsables de la detección de olores específicos con un grado variado de especificidad y sensibilidad, y proyectan sus axones hacia el centro olfativo primario del cerebro: el lóbulo antenal. Estos axones de NROs expresan un receptor específico de un glomérulo, donde se lleva a cabo la sinapsis con interneuronas de proyección que transfieren información al protocerebro, el cual es un centro de integración donde finalmente se forma una “imagen olfativa”, la cual conlleva una respuesta comportamental y fisiológica (Hansson y Stensmyr, 2011; Guidobaldi y Guerenstein, 2012; Wicher, 2015).

Diferentes mecanismos de respuestas de comportamiento ayudan a un insecto en la búsqueda de una fuente de olor y la orientación puede ser dirigida (taxis) y no dirigida (cinesis) (Shorey, 1973; Visser, 1988). La quimiotaxis se presenta cuando el insecto alinea su cuerpo en dirección a la fuente de olor, como resultado de

haber detectado moléculas de olor (estímulos químicos). La cinesis, en donde el insecto no detecta la dirección de olor sino que es estimulada para moverse a diferentes velocidades (ortocinesis) o para girar a diferentes frecuencias (clinocinesis) por cambios en las concentraciones de sustancias químicas. En la anemotaxis el desplazamiento se da en función del viento y se considera que es uno de los principales medios por el cual los insectos se dirigen hacia la fuente de olor (Finch, 1986; Hiltbold *et al.*, 2013).

2.4. Coleópteros Melolonthidae

Los coleópteros de la familia Melolonthidae (Cherman y Morón, 2014) (“melolóntidos”) en estado adulto muestran un labro y mandíbulas que pueden estar parcialmente expuestas u ocultas bajo el cípeo, con mandíbulas esclerosadas, antenas formadas por ocho o diez artejos, de los cuales, de tres a siete corresponden a la maza antenal, en cuyas lamelas plegadizas predominan las sensilas de tipo placoideo. En el caso de las larvas, éstas son de tipo escarabeiforme con antenas formadas por cuatro artejos alargados. Epifaringe asimétrica con tormae ampliamente separadas. El tamaño de estos insectos es muy variable, ya que los adultos tienen una longitud total de 3-130 mm, la anchura máxima de los élitros es de 1.8-51 mm y la expansión alar 8-230 mm. En el máximo desarrollo de larvas, la longitud dorsal es de 12-255 mm y la anchura del abdomen de 2-40 mm (Morón *et al.*, 2014)

Estos coleópteros se encuentran presentes en todos los hábitats continentales, insulares y algunos lénticos, excepto en ambientes con hielos perennes. Se encuentran desde el edafón hasta el dosel y presentan hábitos diurnos, crepusculares o nocturnos. Son un grupo fitófago por excelencia, ya que los adultos se alimentan con hojas, flores, tallos, frutos, polen, néctar, savia, corteza y detritus vegetal y rara vez depredan adultos o inmaduros de coleópteros, homópteros o formícidos. Las larvas consumen raíces, humus o xilema. Varias especies se asocian con nidos de termitas y hormigas, y con madrigueras de roedores. Resultan ser importantes como degradadores, polinizadores inespecíficos y como bioindicadores zoogeográficos y ecológicos. Son

holometábolos con huevo, tres estadios larvales, pupa y adulto (Amat-García *et al.*, 2005; Morón *et al.*, 2014).

2.4.1. Comunicación química de los melolóntidos

El estudio de la comunicación química de un insecto permite conocer la etapa de su comportamiento en la cual puede encontrarse el intercambio de información química. Cuando el contexto de ello es la comunicación química sexual (CQS), está involucrado un emisor (generalmente, las hembras), con la producción y liberación del mensaje químico (atrayentes o feromonas sexuales), además de la localización de éste por parte del receptor (generalmente, los machos). El interés por la comunicación química y el comportamiento sexual de los insectos fitófagos, que se integran en la CQS (Romero-López y Arzuffi, 2010), se ha incrementado de manera importante en años recientes, principalmente por los beneficios que se obtienen en el área agrícola con el monitoreo, manejo y control de plagas. En general, el estudio de la CQS de un insecto permite conocer la etapa de su comportamiento en que puede observarse algún tipo de comunicación basada en el uso de sustancias químicas conocidas como infoquímicos (Dicke y Sabelis, 1988). Dicha etapa se considera como comportamiento precopulatorio y es lo que ocurre entre el momento en que aparece el elemento emisor (generalmente la hembra) del mensaje químico y es localizado por el receptor (generalmente el macho) hasta el momento en que se presenta el contacto sexual (Eberhard, 1992; Facundo *et al.* 1999). Bajo este esquema, es posible abordar la CQS de cualquier modelo biológico o grupo, como es el caso de los melolóntidos.

2.4.2. Antecedentes sobre la interacción melolóntido-volátiles de plantas

Las interacciones entre larvas o adultos de Melolonthidae con partes aéreas o raíces de sus plantas hospederas, con fines de alimentación, en las cuales están involucrados VP, existen varios trabajos que enlistan las especies vegetales que fungen como alimento, refugio y sitios de oviposición de estos insectos (Morón *et al.* 1997, Aragón *et al.* 2010). Está suficientemente estudiado el comportamiento de los adultos en función de los compuestos químicos que liberan las plantas y

que provocan la atracción de éstos. Entre los reportes destacados en este sentido están los correspondientes a *Popillia japonica* (Newman) (Loughrin *et al.*, 1995; Heath *et al.*, 2001) *Maladera matrida* (Argaman) (Harari *et al.*, 1994), *Hoplia communis* (Waterhouse) (Imai *et al.*, 1998), *Macroductylus subspinosus* (F.) (Heath *et al.*, 2001), *Melolontha hippocastani* (F.) (Ruther *et al.*, 2000) y *Melolontha melolontha* (L.) (Reinecke *et al.*, 2002). Para larvas, destacan las interacciones entre *Costelytra zealandica* (White) (Osborne y Boyd, 1974) y *Me. hippocastani* (Weissteiner y Schütz, 2006, 2012).

Para melolóntidos distribuidos en México, en contraste, son escasos los reportes específicos en cuestiones de interacciones insecto-volátiles de plantas. Se cuenta con evidencias de la relación entre adultos de *Phyllophaga obsoleta* (Blanchard) y *Phyllophaga ravidata* (Blanchard) con árboles de “encino” (*Quercus* sp., Fagaceae), encontrándose que existen infoquímicos involucrados en el acercamiento de éstos a las hojas de estos árboles, para morderlas y aparentemente, alimentarse de ellas (Romero-López *et al.*, 2016). Camino-Lavín *et al.* (1996) pusieron a prueba la preferencia de diferentes grupos de Melolonthidae hacia pulpa de piña en maduración contra trampas cebadas con compuestos químicos extraídos del fruto de la piña (lactano de etilo, isovalerato de etilo, acetato de etilo, metil valerato, butirato de etilo, acetato de metilo, butirato de metilo y 4 -alil-1,2 -dimetoxibenceno). Estos autores observaron que la piña en maduración provocó la atracción de un mayor número de melolóntidos adultos como *Cotinis mutabilis* (Gory y Percheron), *Cotinis* spp., *Cyclocephala guttata* (Bates) y *Phyllophaga* spp. Por otro lado, Caselín *et al.* (2003) encontraron que los adultos de *Macroductylus nigripes* (Bates) muestran preferencia al maíz con espiga y elote, sin espiga y con espiga, sin una diferencia estadística significativa entre los tres tratamientos.

En el caso de registros para larvas, se cuenta con aquellos en los que se describen las respuestas olfativas de individuos de *P. ravidata* y *Phyllophaga tumulosa* (Bates) hacia volátiles liberados por las raíces de diferentes plantas como maíz (*Zea mays*, Poaceae) y frijol (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) (Méndez-Aguilar *et al.* 2008).

2.5. Generalidades de *Macrodactylus nigripes*

Los integrantes del género *Macrodactylus* forman parte de la subfamilia Melolonthinae e integran al grupo más representativo de la tribu Macroductylini en Norte y Centroamérica. Este grupo está filogenéticamente cercano a los géneros *Isonichus* y *Ceraspis*; sin embargo, los adultos de *Macrodactylus* se diferencian de estos últimos por su cuerpo alargado y esbelto, de 7.0 a 13 mm de largo por 2 a 4.5 mm de anchura humeral, largos y delgados tarsos (patas) que dan nombre al género. Los adultos (“frailecillos”, “taches”) son de tamaño pequeño (8 a 13 mm), de colores variados y cubiertos de pelos dispuestos uniformemente o formando líneas regulares sobre los élitros (Arce-Pérez y Morón, 2000).

Los frailecillos de *M. nigripes* se encuentran distribuidos en diferentes entidades de México como Chiapas, Coahuila, Estado de México, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala y Veracruz, , donde causa daños a diferentes cultivos agrícolas por su actividad rizofágica (Arce-Pérez y Morón, 2000; Guzmán-Mendoza *et al.*, 2013).

Los integrantes de esta especie son holometábolos con huevo, tres estadios larvales, pupa y adulto. El ciclo de vida es usualmente anual o bianual, pocos bivoltinos o trianales; tal ciclo inicia cuando los adultos vuelan y muestran actividad reproductiva durante la época de lluvias (junio-agosto). En ambientes templados a fríos, húmedos sub-húmedos, situados entre los 1000 y 2500 m de altitud (Arce-Pérez y Mórón, 2000). De acuerdo a Serapio-Jerónimo *et al.* (2014), las hembras ovipositan dando inicio a la incubación que dura entre 11 y 25 días. De septiembre a octubre, se observan larvas de primer estadio que se desarrollan de 25 a 49 días. Se caracterizan por ser de color blanco, dobladas a la mitad con la cabeza sobre el último segmento; son delgadas con una longitud de 4 a 6 mm.

De octubre a diciembre, comienza el segundo estadio que dura entre 42 y 63 días; las larvas de este periodo tienen una longitud de 7 a 11 mm y se diferencian de las del primer estadio por el aumento de tamaño reflejado en la cabeza y el tórax.

El tercer estadio inicia en diciembre llegando a abril, con una duración de 130 y 152 días. Las larvas miden de 17-23 mm al inicio son de color gris, por la materia

orgánica ingerida y antes de llegar a pupa cambian a un color blanquecino-amarillento.

A finales de abril inicia el periodo de pupa con una duración de 28 o 36 días. La pupa es exarata de cuerpo alargado de 13 mm de longitud, con un color ámbar amarillento. En los primeros días mantiene la exuvia del tercer estadio, adherida a los urogomphi.

Durante la formación del imago, es notorio el cambio de coloración en las pupas; las podotecas, los pterotecas, protórax y la cabeza son las primeras partes que se pigmentan adquiriendo un color ocre que se acentúa en todo el cuerpo. Las partes que se forman primero son las patas, los élitros, la cabeza, el tórax y finalmente el abdomen. Al término del desarrollo se encuentran envueltas por una muda delgada, que se desprenden antes de que emerjan del suelo.

Los imagos permanecen bajo el suelo de 7 a 14 días, dando lugar a los adultos que emergen durante las primeras semanas de junio, durando así el ciclo de *M. nigripes* aproximadamente 288.93 días (Serapio-Jerónimo *et al.*, 2014) (Figura 1).

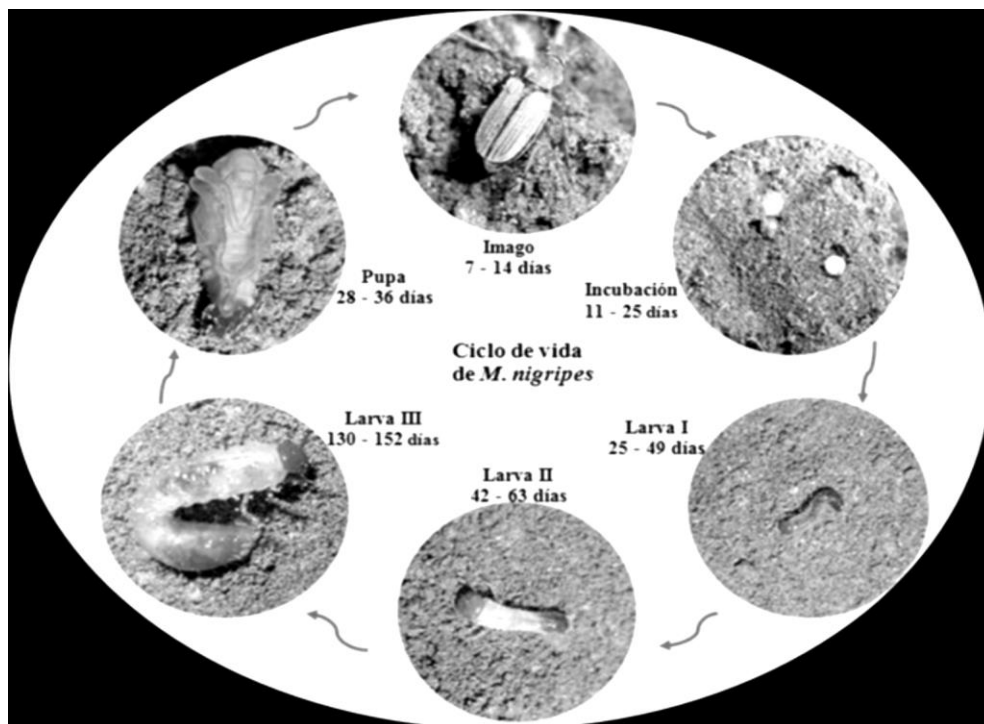


Figura 1. Ciclo de vida completo de *Macroductylus nigripes* (tomado de Serapio-Jerónimo *et al.*, 2014).

2.6. Comunicación química y plantas hospederas de *M. nigripes*

Estudios acerca de la comunicación química en *Macroductylus* sugieren que sigue el mismo patrón de comportamiento observado en otras especies del grupo Melolonthidae (emisor, mensaje, receptor y respuesta), pero a diferencia de lo que sucede en el comportamiento precopulatorio de adultos de *Phyllophaga*, las hembras del género *Macroductylus* no exponen la cámara genital (Benítez-Herrera *et al.*, 2015). Esto probablemente se debe a que son especies diurnas y la emisión de los atrayentes sexuales significa permanecer estático, por lo que sería un riesgo permanecer visible y sin movimiento ante los demás organismos de un determinado ambiente.

A la fecha, ya hay algunos datos preliminares para integrantes de *Macroductylus*, en particular de *M. nigripes*, en aspectos de los posibles sitios de producción de atrayentes (Romero-López, 2016), la composición química de éstos, la morfología de las sensilas antenales y probable respuesta electrofisiológica hacia estímulos químicos (Martínez-Bonilla *et al.*, 2015), además de la estructura del sistema olfativo (Martínez-Bonilla *et al.*, 2014).

Los adultos de Melolonthidae se alimentan de tejidos vegetales vivos, ya sea de hojas, tallos, flores y frutos, incluyendo algunas especies que pueden consumir los tejidos fibroso presentes en los tallos de palmeras y gramíneas (Morón, 2004). En este caso, ya se tienen registradas las preferencias alimentarias de algunos integrantes de esta familia. Particularmente, en el caso de *M. nigripes* se han reportado como plantas hospederas a *Baccharis conferta* (Sigismund) (Asteraceae), *Senecio salignus* (*Barkleyanthus salicifolius* (Kunth) H. E. Rob y Brettell) (Asteraceae), *Brassica napus* (L.), *Brassica oleraceae* (L.) (Brassicaceae), *Zea mays* (L.) (Poaceae), *Hordeum vulgare* (L.) (Poaceae), *Phaseolus vulgaris* (L.) (Fabaceae), *Phaseolus coccineus* (L.) (Fabaceae), *Vicia fava* (L.) (Fabaceae), *Medicago sativa* (L.) (Fabaceae), *Lupinus* sp. (Fabaceae), *Buddleia* sp. (Scrophulariaceae), *Fraxinus* sp. (Oleaceae), *Malus pumila* (Miller) (Rosaceae), *Pyrus comunis* (L.) (Rosaceae), *Prunus persica* (L.) (Rosaceae), *Rubus ideanus* (L.) (Rosaceae), *Rubus adenotrichus* (Schltdl.) (Rosaceae) y una integrante de la familia Urticaceae no identificada (Arce-Pérez y Morón, 2000).

2.7. Uso de olfatómetros para estudios de comunicación química en melolóntidos

El estudio de los mecanismos implicados en la localización de los diferentes recursos por parte de insectos fitófagos con algún grado de especialización, es de gran importancia para entender la ecología y evolución de las interacciones entre plantas e insectos (Ehrllich y Raven, 1964; Murlis *et al.*, 1992). Estos procesos pueden ser estudiados mediante bioensayos con la ayuda de olfatómetros, que son equipos de laboratorio para medir la capacidad de los animales para percibir diferentes aromas y sustancias dispersas en el aire (López-Ávila y Rincón, 2006).

La elección de un olfatómetro es de crucial importancia para la determinación de la actividad biológica y la decisión deberá ser tomada considerando varios factores, entre los que destaca el comportamiento del insecto que se desea evaluar, el tamaño del insecto, si vuela o no, si es de hábitos nocturnos o diurnos, etc. (López-Ávila y Rincón, 2006; Malo y Rojas, 2012). Estos aparatos han sido clasificados en dos grupos; los que no usan viento (pasivos) y los que lo utilizan (activos) (Baker y Linn, 1984; Baker y Cardé, 1984). Existen una gran variedad de diseños, pero generalmente en los olfatómetros para bioensayos pasivos, los insectos encuentran la fuente de olor a una corta distancia o al contacto, debido a que los compuestos volátiles son dispersados por simple difusión, al contrario, de los olfatómetros diseñados para bioensayos activos en el que el flujo de viento es el medio de transporte de las moléculas odoríferas. (Malo y Rojas, 2012).

Se han realizado bioensayos con la ayuda de estos aparatos para diversos estudios de insectos, principalmente en lepidópteros. En el caso de melolóntidos, solo existen antecedentes para integrantes del género *Phyllophaga*. Se han efectuado bioensayos con adultos para evaluar las respuestas de *P. obsoleta* hacia diferentes componentes del atrayente sexual de esta especie (Romero-López y Arzuffi, 2010), así como bioensayos con larvas de *P. ravida* y *P. tumulosa* (Bates) para probar volátiles de raíces de diversos cultivos agrícolas (Méndez-Aguilar *et al.*, 2008), Weissteiner y Schütz (2006) realizaron un trabajo para demostrar la preferencia de larvas de *Me. hippocastani*, en el cual se utilizaron como estímulos raíces de zanahorias y de árboles de roble. Posteriormente, otros

autores llevaron a cabo un estudio de preferencia de volátiles de raíces de árboles de roble (*Quercus petraea* (Mattuschka) y *Quercus robur* (L.)), obteniendo un perfil químico de volátiles más representativos (Weissteiner *et al.*, 2012).

2.8. Métodos para la extracción de VP

Existen diversos métodos de extracción de volátiles, los cuales serán descritos a continuación. En todos ellos se usa la cromatografía de gases (CG) como técnica analítica. La CG es un método de separación en el que los componentes de una muestra se reparten o distribuyen entre dos fases: la estacionaria y la otra es un gas el cual se percola a través de la fase estacionaria. La muestra es vaporizada y arrastrada por una fase gaseosa móvil a través de la columna muy delgada. La repartición de las sustancias entre las fases estacionaria y móvil, se presenta de acuerdo con su coeficiente de partición a determinada temperatura. Los componentes de la muestra, llamados analitos, se separan de los otros basados en su punto de ebullición y por la afinidad por la fase estacionaria. Este tipo de proceso cromatográfico se llama elución. Luego, los analitos pasan a la detección por CG acoplado a espectrometría de masas (EM). La EM se basa en la generación de iones en fase gaseosa a partir de las moléculas de analito y su detección. El espectro de masas resultante es un gráfico de la abundancia relativa de los iones producidos en función de su relación *masa/carga* (m/z) Esta técnica comprende cinco pasos: (1) Introducción de la muestra; (2) separación de los analitos en la columna cromatográfica; (3) ionización de los analitos en fase gaseosa; (4) detección de la masa de los iones y (5) procesamiento y análisis de los datos. La EM es una técnica de detección de iones, cuyo análisis permite establecer la estructura molecular de una sustancia a partir del valor de su masa (Marín-Loaiza y Céspedes, 2007; Ruiz, 2008).

2.8.1. Aireación dinámica

Este método consiste en pasar un flujo de aire continuo dentro de una cámara para arrastrar los compuestos volátiles emitidos por el objeto de estudio para su

captura en filtros con adsorbentes. Los recipientes usados para contener el material a muestrear pueden ser de vidrio o de plástico (Malo y Rojas, 2012).

Los sistemas de colecta que muestrean los volátiles por aeración dinámica pueden ser cerrados, en el que el aire junto con los volátiles emitidos por la planta, se hacen circular mediante una bomba y capturados en el absorbente dentro de una cámara cerrada. Por lo tanto, los contaminantes son minimizados debido a que el aire circula dentro de un ambiente cerrado y finalmente los volátiles pueden ser recuperados con disolventes o termodesorbidos (Tholl *et al.*, 2006).

En la colecta por aeración dinámica abierta se puede extraer o empujar-extraer el aire del exterior dentro de la cámara de colecta. Se usa una bomba conectada a un flujómetro que a su vez se conecta al tubo con el adsorbente que atrapa los volátiles jalados por la bomba. El material a muestrear se coloca en un recipiente abierto o cerrado, el aire del ambiente entra al recipiente a través de un filtro de carbón activado y es retirado al extraerlo o empujarlo a través del tubo con el adsorbente (Tholl *et al.*, 2006; Malo y Rojas, 2012).

Otro método de aeración dinámica es el llamado análisis por desadsorción térmica y purga-trampa. La técnica consiste en colocar el material a muestrear en un recipiente y los compuestos son arrastrados por aireación y capturados en un adsorbente, este adsorbente es purgado con un gas inerte (para remover agua, principalmente) y desadsorbido por calentamiento directamente a un CG (Malo y Rojas, 2012).

2.8.2. Métodos de muestreo de compuestos volátiles de manera estática

Esta técnica consiste poner la muestra dentro de una cámara, en donde el aire que rodea tal muestra es estático y los volátiles emitidos son atrapados en un adsorbente específico para su posterior inyección directamente al CG para el análisis (Malo y Rojas, 2012).

En la actualidad, existe un equipo que puede ser llevado a condiciones naturales y permite repetir los análisis en intervalos cortos, además recoge y separa los

volátiles, que es conocido como “zNose”; éste ha sido utilizado para análisis en alimentos, aceites vegetales y compuestos volátiles resultando bastante eficiente (Lammertyn *et al.*, 2004; Watkins y Wijesundera 2006).

Otra técnica que ha sido empleada consistentemente en años recientes es la microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés), la cual fue propuesta por primera vez en 1990 por Arthur y Pawliszyn y fue desarrollada en la Universidad de Waterloo en Ontario, Canadá (Arthur *et al.*, 1992). Desde entonces, esta técnica ha experimentado un rápido desarrollo debido a sus características sobresalientes en comparación con otros métodos. La SPME es una técnica rápida y sensible, ya que integra el muestreo y aislamiento en un solo paso, por lo que simplifica la preparación de muestras, por tanto, existe una reducción de pérdida de analitos (Xu *et al.*, 2013). Consiste de una jeringa de gases modificada, la cual contiene una fibra de sílica fundida de 1 cm, cubierta con un determinado polímero, el cual a su vez está adherido a una pequeña barra de acero inoxidable e instalado en el émbolo de una jeringa de gases; la jeringa de la fibra es previamente acondicionada a 150°C, haciéndole pasar un flujo de nitrógeno. Posteriormente, la fibra es introducida a través de un septo en el recipiente que contiene la muestra para capturar los volátiles durante un periodo de tiempo que puede variar dependiendo de varios factores tales como el tipo de fibra, la concentración de volátiles y la temperatura de muestreo, entre otros. Después del muestreo, la fibra es colocada directamente en el inyector del cromatógrafo, en donde los compuestos son desadsorbidos térmicamente (Malo y Rojas, 2012). Esta técnica ha sido utilizada con resultados alentadores para la identificación de feromonas de agregación de los melolóntidos *Scapanes australis* (Boisduval) y *Strategus aloeus* (L.) (Rochat *et al.*, 2000), para la identificación de componentes del atrayente sexual de *P. obsoleta* (Romero-López y Arzuffi, 2010) y para la identificación de volátiles de plantas (García y Vargas, 2010; Zhang *et al.*, 2012; Pino, 2013; Wei *et al.*, 2014).

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, es común el uso de plaguicidas y fertilizantes para el control de plagas; sin embargo, estas sustancias pueden aparecer en los productos alimentarios inclusive después de la ingesta y permanecer en la biota circundante al cultivo, en las personas y en el ambiente físico (Contreras, 2011). Una opción a este problema es el uso de infoquímicos, por lo que este trabajo pretende proveer información acerca de las relaciones planta-insecto, encaminado concretamente a la comunicación química de *M. nigripes*. Se propone el estandarizar los bioensayos en olfatómetro que permitan determinar la preferencia de hembras y machos adultos de *M. nigripes* hacia especies vegetales que son consideradas como hospederas de estos insectos. Asimismo, se plantea la estandarización de la técnica de extracción de volátiles de fruto y hojas de algunas de las plantas empleadas en los bioensayos, por SPME, complementándolo con el análisis de dichos volátiles por CG-EM.

Los resultados obtenidos en el presente estudio son los primeros en su tipo y brindarán elementos clave para el estudio de la comunicación química, del grupo Melolonthidae, sentando las bases para la generación de ideas encaminadas al establecimiento de estrategias de manejo de ésta y otras especies a través del uso de VP y otros atrayentes químicos (sexuales o de agregación) sintetizados. De esta forma, podrán aprovecharse estos recursos naturales que son inocuos para el ambiente, la biota y para la salud humana.

4. HIPÓTESIS

Los adultos de *M. nigripes* presentan respuestas positivas hacia las potenciales plantas hospederas (maíz, azumiate y piña), siendo tales respuestas similares en hembras y machos.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Complementar la información sobre la comunicación química de los melolóntidos, con la estandarización de un olfatómetro para la realización de bioensayos con adultos de *M. nigripes* y plantas, así como de la técnica de SPME para la obtención de volátiles de estas especies vegetales.

5.2. Objetivos particulares

1. Construir un olfatómetro que permita llevar a cabo bioensayos activos y pasivos con hembras y machos adultos de *M. nigripes*, empleando hojas de azumiate y maíz, además del fruto de piña.
2. Analizar mediante CG-EM los volátiles de las hojas de azumiate y del fruto de piña extraídos por SPME.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Obtención de modelo biológico y de estímulos

Insectos. Entre mayo y julio del 2015 se llevaron a cabo colectas manuales directas de hembras y machos de *M. nigripes*, en cultivos de maíz ubicados en la localidad de San Pablo del Monte, Tlaxcala (19° 07' 00" N y 98° 10' 00" O). Las colectas se efectuaron en los días de emergencia de los imagos, con base en registros previos sobre el ciclo de vida y comportamiento de esta especie en la zona de estudio. Los especímenes capturados se trasladaron al laboratorio, donde se llevó a cabo el sexado e identificación taxonómica con base en la propuesta de Arce-Pérez y Morón (2000).

Plantas y fruto. Para la obtención de las plantas de maíz (*Zea mays*, Poaceae) se sembraron semillas bajo condiciones de laboratorio durante 15 días; después de obtener las plántulas, se utilizaron las hojas con 5 días de aparición para los bioensayos. En el caso del "azumiate" (*Baccharis salicifolia*, Asteraceae), se

colectaron tallos con hojas de arbustos de la localidad (en donde se observaron previamente adultos de *M. nigripes* mordeíndolas o utilizándolas como área de sostén para efectuar la cópula) y se trasladaron al laboratorio. Asimismo, se consiguió una piña criolla comercial, la cual se mantuvo en el laboratorio durante 8 días. Se utilizaron trozos de pulpa, la cual resulta un atrayente natural para melolóntidos de acuerdo a lo citado por Camino-Lavín *et al.* (1996).

Octil butirato. Se empleó octil butirato (SIGMA-ALDRICH®) como control, con base en reportes previos donde se probó, se le considera como parte de una mezcla atrayente para especies de *Macrodactylus* (Williams y Miller, 1982; Williams *et al.*, 1990; Cibrián *et al.*, 1990; Arredondo-Bernal *et al.*, 1995).

6.2. Fabricación y estandarización del olfatómetro con bioensayos activos y pasivos

Con base en la propuesta de Ranjith (2007), se construyó un olfatómetro de acrílico, conformado por una cámara principal central en forma rectangular (20 x 20 cm de base y 30 cm de altura) con tapa en la parte superior. Cada una de las caras está unida a un brazo rectangular del mismo material (5 x 5 cm de ancho y 50 cm de largo) colocado a una altura de 1 cm sobre la superficie. Cada brazo consta de un compartimento en su extremo terminal para colocar los estímulos y un ventilador para simular un flujo de viento constante (Figura 2).



Figura 2. Olfatómetro de cuatro vías de Ranjith (2007), con el cual se inició su estandarización con bioensayos activos preliminares.

Los bioensayos se llevaron a cabo en condiciones controladas de temperatura (24 ± 2 °C), humedad ($65 \% \pm 5$ °C) e iluminación (60 W), entre las 11:00 y las 14:00 h, con la finalidad de simular las condiciones y horario en que los adultos llevan a cabo sus actividades alimentarias y sexuales en condiciones naturales. En cada bioensayo, los estímulos fueron colocados aleatoriamente en cada uno de los extremos del olfactómetro y un insecto en la parte central de la cámara, dejando pasar 5 min hasta que éste mostrara una respuesta positiva hacia cualquiera de los estímulos (desplazamiento hacia alguna de las fuentes, que concluyera con el contacto de algunos de sus tarsos con la planta o el papel filtro correspondientes). Después de cada experimento, se retiraron los estímulos e insectos dando una pausa de 5 min en los que se limpiaba el olfactómetro. Se consideraron bioensayos activos a los que involucraron el uso de los cuatros brazos del olfactómetro complementado con los ventiladores que producen un flujo de aproximadamente 0.05 ml/min (Figura 2). En el caso de los bioensayos pasivos, se prescindió de los brazos y de los ventiladores, empleándose exclusivamente la cámara central del olfactómetro (pruebas de tres vías). Los estímulos se colocaron en un punto medio

de cada una de los lados de la cámara central del olfatómetro y los insectos se ubicaron en el centro de la misma (Figura 3).

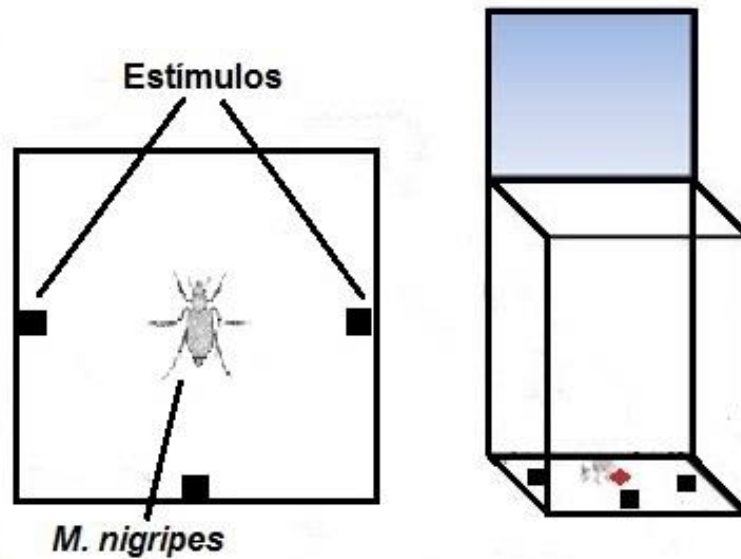


Figura 3. Olfatómetro modificado de Ranjith (2007), adaptado para los bioensayos pasivos.

Los estímulos fueron probados “físicamente” y como extractos. Los estímulos “físicos” consistieron en fragmentos de 1 cm² de cada fuente: hoja de maíz, hoja de azumiate, fragmento de pulpa de piña y papel filtro impregnado con 0.1 ml de octil butirato). Los fragmentos de las hojas y de la piña fueron colocados sobre un papel filtro de las dimensiones mencionadas. En el caso de los extractos, éstos se obtuvieron machacando las hojas y la pulpa de piña sobre un fragmento de papel filtro de 1 cm². Se hicieron experimentos con las combinaciones que se muestran en el Cuadro 1. En todos los experimentos se hicieron 47 repeticiones para cada sexo. Cada repetición se hizo con un nuevo individuo.

	Experimento	Combinaciones de los estímulos
Bioensayos pasivos	1	hoja de azumiate - trozo de piña - octil butirato
	2	hoja de maíz - trozo de piña - octil butirato
	3	extracto de maíz - extracto de piña - octil butirato
	4	extracto de azumiate - extracto de maíz - octil butirato

Cuadro 1. Combinaciones puestas a prueba en cada experimento con *M. nigripes*.

Análisis estadístico. Con los datos obtenidos de bioensayos se generó una base de datos en Excel y posteriormente fueron analizados mediante Chi Cuadrada con base en la hipótesis nula de que las respuestas de *M. nigripes* serían proporcionales para cada estímulo (Sigma-Plot 12.0). El análisis de datos de los volátiles extraídos por SPME, se llevó a cabo con el programa OriginPro 8.

6.3. Extracción de volátiles de estímulos probados en el olfatómetro

Para la captura de volátiles de algunos de los estímulos utilizados en los bioensayos, se empleó la técnica de SPME, la cual consistió de un holder de tipo manual y una fibra de polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB, 65 μm). Dicha fibra, se colocó en una cámara de vidrio de 1 lt de capacidad, diseñada y construida exclusivamente para la SPME (Figura 4).

Dentro de cada cámara de microextracción, se colocó un fragmento de 1 cm^2 de cada uno de los estímulos (pulpa de piña y hoja de azumiate) sobre papel filtro. Enseguida se introdujo el holder dentro del frasco (Figura 4) y se expuso la fibra PDMS/DVB durante 60 min, con base en la propuesta de Romero-López y Arzuffi (2010). Para el análisis cromatográfico se utilizó un CG modelo 7890B acoplado a un EM de alta resolución modelo Agilent 7200-tiempo de vuelo (Q-TOF) (Figura 5), una columna HP-5MS 5% fenil-metil siloxano, 30m x 250 μm x 0.25 μm para las separación de los compuestos, modo de inyección splitless, helio como gas acarreador de 1.2 ml/min y temperatura del inyector de 250°C. El programa de calentamiento del horno de la columna fue de 50°C durante 5 min, seguido de un calentamiento hasta 300°C a una velocidad de 10°C/min. En el detector de masas se utilizó la ionización química con metano para la producción de iones de los analitos. La inyección se hizo colocando la fibra en el puerto de inyección y exponiéndola para la desorción térmica de los volátiles.

Posteriormente, se asignaron las masas a los picos cromatográficos para hacer la identificación de los compuestos. Con base en estructuras químicas propuestas obtenidas de diversas fuentes bibliográficas (pherobase y artículos especializados relacionados con el tema), se calculó la masa exacta de los compuestos

detectados y la diferencia de masa/carga con la siguiente ecuación: $\Delta m/z = (masa\ experimental - masa\ calculada) \cdot 10^6 / masa\ calculada$. Se tomó como criterio que las estructuras propuestas tuvieran menos de 6 ppm de diferencia de masa/carga con la masa experimental. Finalmente, se efectuó una búsqueda bibliográfica de los compuestos finales para determinar si ya habían sido reportados previamente como productos naturales, ya sea como feromonas o como VP.

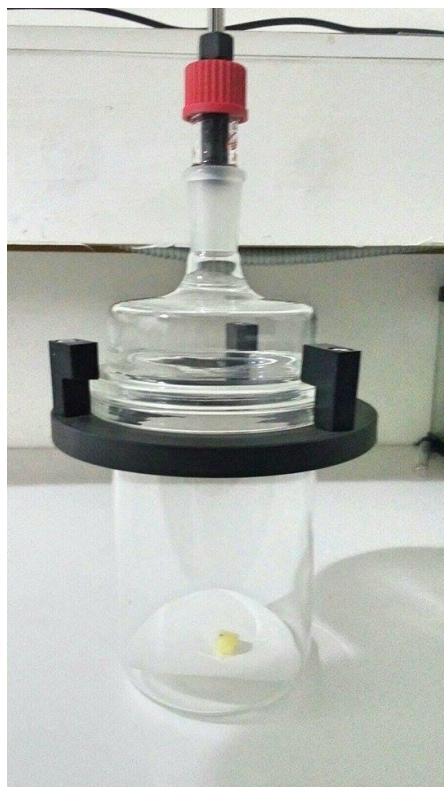


Figura 4. Dispositivo de SPME mostrando la exposición de la fibra de PDMS/DVB para la captura de los volátiles.



Figura 5. Cromatógrafo modelo 7890B acoplado a un espectrómetro de masas 7200-tiempo de vuelo (Q-TOF), utilizado en el presente estudio para la identificación de volátiles extraídos de azumiate y piña. Cortesía: Laboratorio de Adsorción y Cromatografía, ICUAP.

7. RESULTADOS

7.1. Bioensayos activos

Se observaron tendencias de respuestas positivas en el 50% de los bioensayos de este tipo, tanto con hembras como con machos de *M. nigripes*. Por contar con un porcentaje de respuestas positivas menor al establecido como valor de representatividad para el estudio (70%), se consideró que los datos obtenidos no cumplieron con el mínimo requerido y por ello no se incluyeron en el análisis final (n=47).

7.2. Bioensayos pasivos con estímulos “físicos” y con extractos

Como se refleja en la Figura 6, hembras y machos de *M. nigripes* muestran respuestas positivas estadísticamente significativas ($p < 0.05$) a las hojas de azumiate y de maíz, así como a la pulpa de piña, con respecto al control. Se observa una mayor tendencia a las hojas de maíz sobre el azumiate e incluso sobre la pulpa de piña.

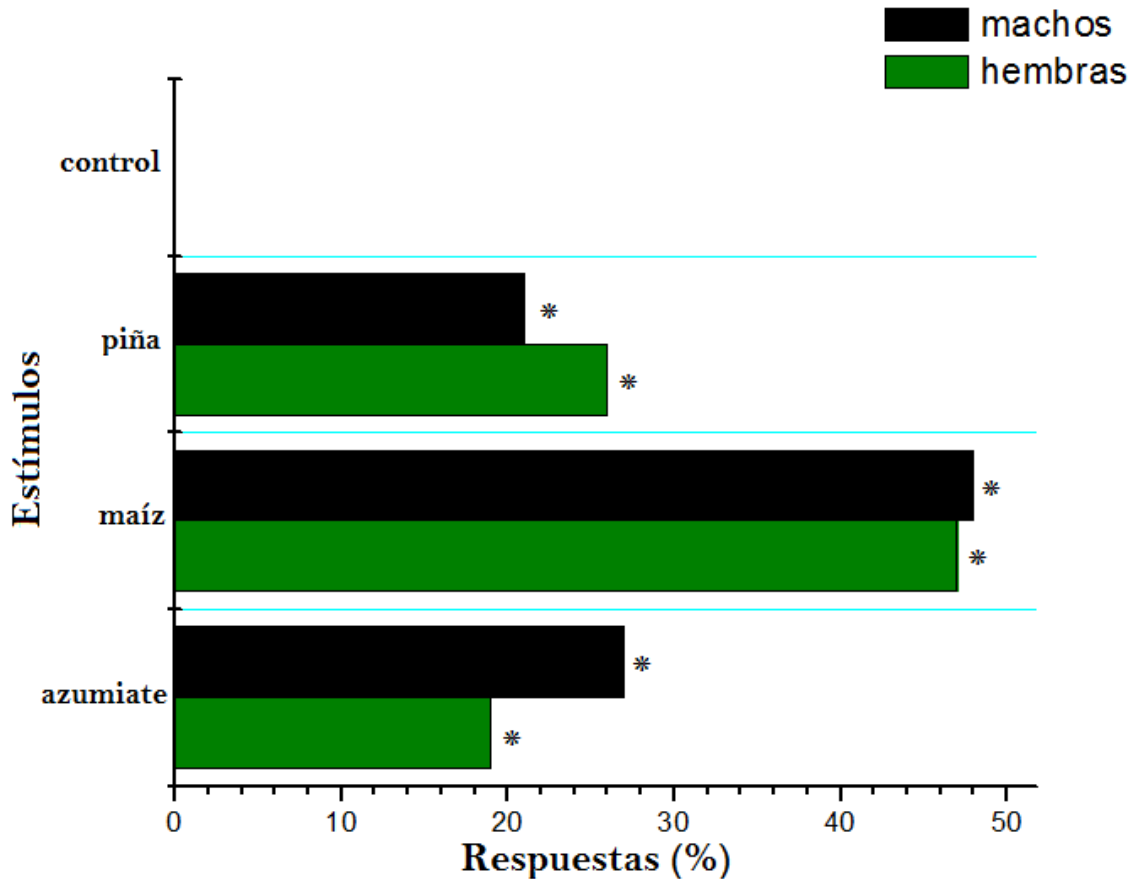


Figura 6. Porcentaje de respuestas de hembras y machos de *M. nigripes* a los estímulos “físicos”. El asterisco (*) indica respuesta significativa ($p < 0.05$) con respecto al control. El porcentaje total (100 %) se complementa con respuestas diversas por parte de los adultos. Chi-cuadrada; $n = 47$ por cada sexo.

En la Figura 7 se muestra que sólo los machos de *M. nigripes* presentaron respuestas positivas estadísticamente significativas ($p < 0.05$) hacia las hojas de azumiate, maíz y trozos de piña, con relación al control. En general, no se detectaron diferencias en las respuestas entre estímulos ni entre sexos, excepto al momento de comparar las respuestas de hembras y machos para el caso de azumiate en donde se vio una diferencia significativa entre ambos sexos.

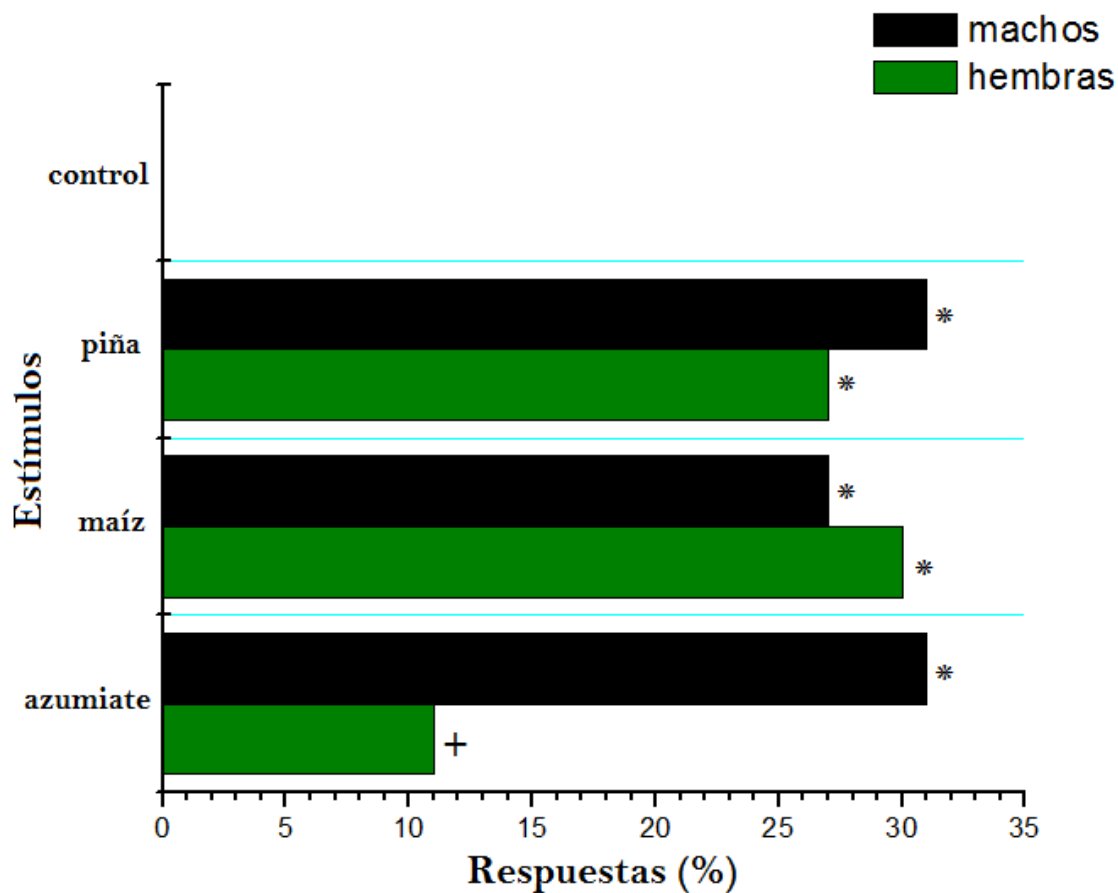


Figura 7. Porcentaje de respuestas de hembras y machos de *M. nigripes* a los estímulos como extractos. El asterisco (*) indica respuesta significativa ($p < 0.05$) con respecto al control. El signo de mas (+) indica diferencia significativa en la respuesta entre sexos. El porcentaje total (100 %) se complementa con respuestas diversas por parte de los adultos. Chi-cuadrada; $n = 47$ por cada sexo.

7.3. Extracción de volátiles y análisis cromatográfico

7.3.1 Volátiles de hojas de azumiate

Se extrajeron por SPME y se detectaron por CG-EM quince picos cromatográficos representativos, de los cuales, diez pudieron relacionarse con estructuras de compuestos (Figura 8). Esto fue el resultado de diez repeticiones ($n=10$). Puede observarse que los picos 1, 9 y 10 resultaron ser los más abundantes, seguido de los picos 5, 6 y 11 y finalmente los picos minoritarios 2, 3, 4, 7 y 8. Los picos marcados como b1, b2, b3 y b4 se encontraron en el blanco, por lo tanto no se identificaron.

En el Cuadro 2 se enlistan los compuestos extraídos de las hojas de azumiate, con los nombres de acuerdo a la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).

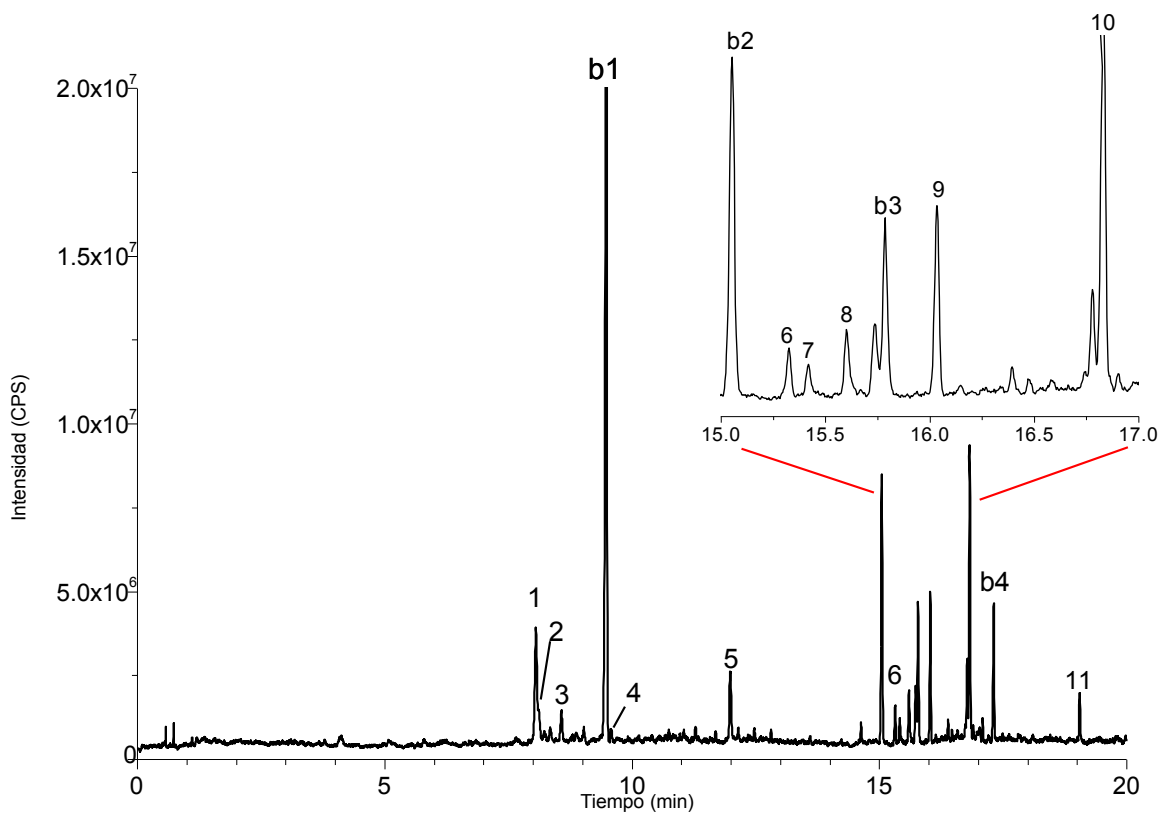


Figura 8. Cromatograma representativo de los picos detectados por SPME para volátiles de azumiate. Picos etiquetados como b1, b2, b3 y b4, se presentan en el cromatograma del blanco (n=10).

7.3.2. Volátiles de fragmentos de piña

Se detectaron veinte picos cromatográficos representativos como resultado de diez repeticiones (n=10) (Figura 9), de los cuales quince pudieron relacionarse con estructuras de compuestos. De todos éstos, destacan los picos 6, 9 y 12 como los más abundantes, seguido de los picos 14 y 16 y finalmente los picos minoritarios fueron 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 18 y 19.

En el Cuadro 3 se enlistan los compuestos extraídos de la pulpa de la piña, con los nombres de acuerdo a la IUPAC.

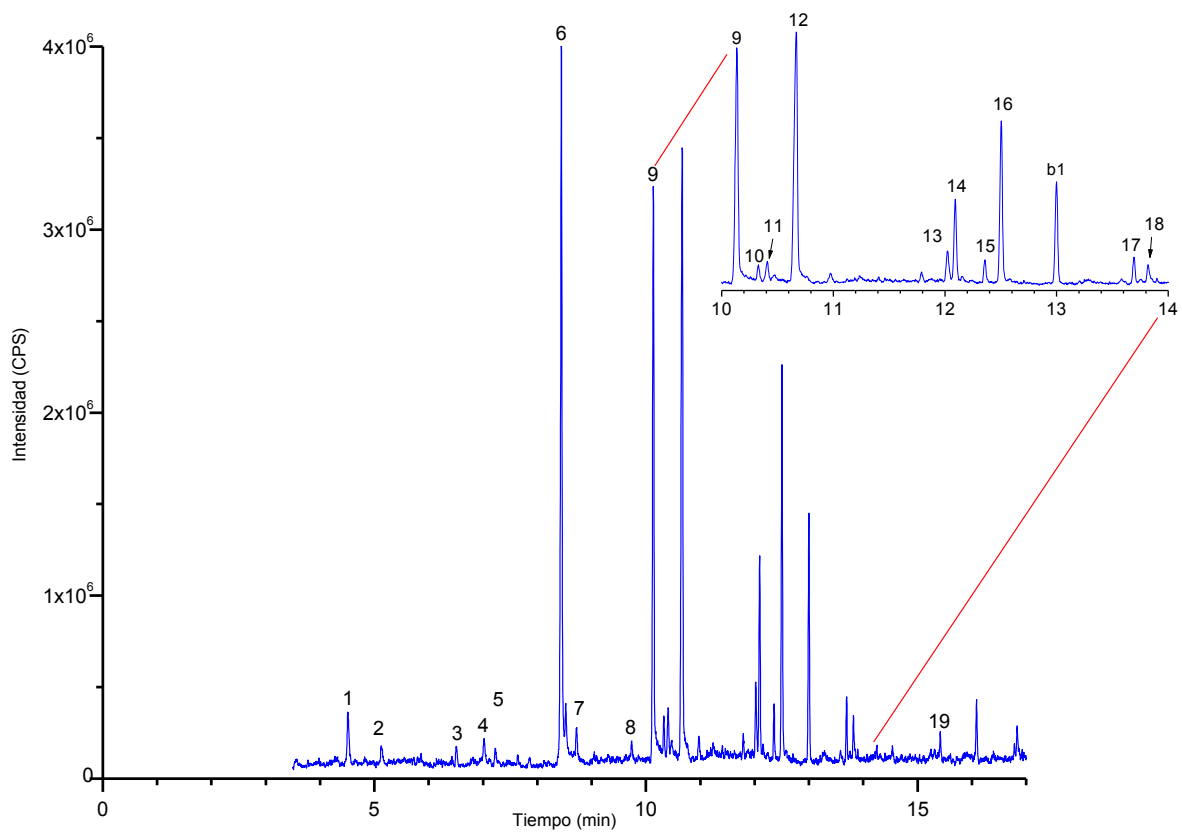
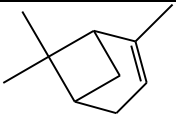
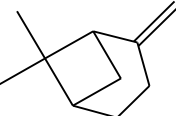
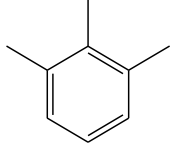
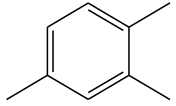
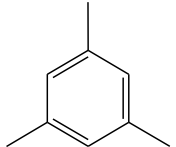
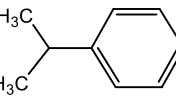
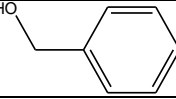
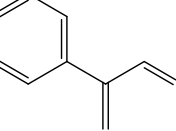
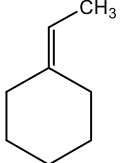
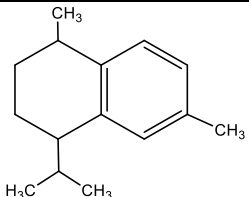
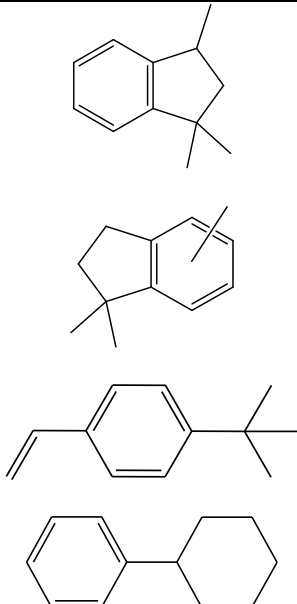
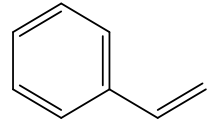


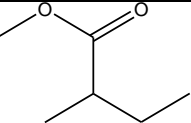
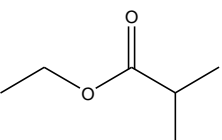
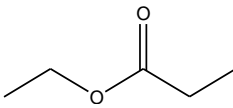
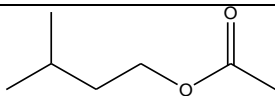
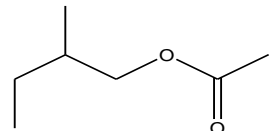
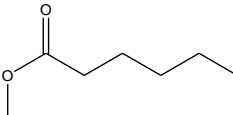
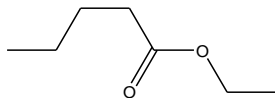
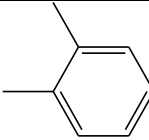
Figura 9. Cromatograma representativo de los picos detectados por SPME en fragmentos de piña. Pico etiquetado como b1 se presenta en el cromatograma del blanco.

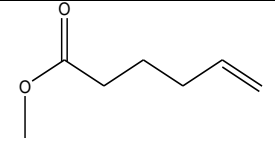
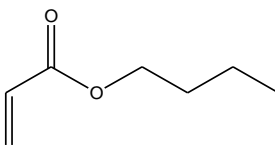
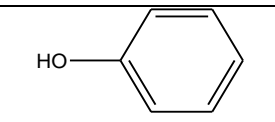
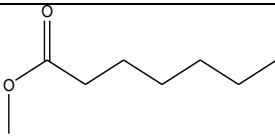
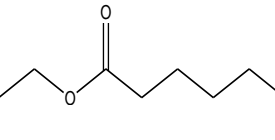
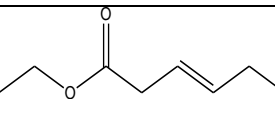
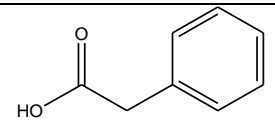
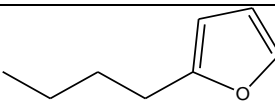
Cuadro 2. Listado de compuestos extraídos de hojas de azumiate por SPME e identificados por CG-EM.

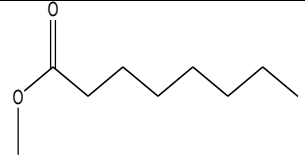
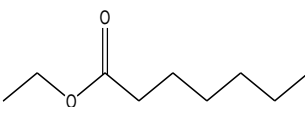
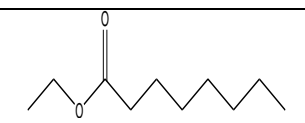
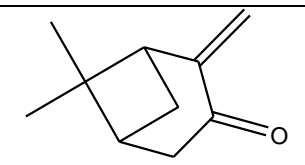
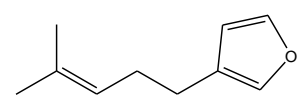
NP	TR [min]	Estructuras propuestas	Nomenclatura IUPAC	Fórmula condensada	No. CAS	Referencias	Especie vegetal
1	8.06		4,6,6-trimetilbiciclo[3.1.1]hept-3-eno	C ₁₀ H ₁₆	80-56-8	Identificado por estándar	<i>B. salicifolia</i>
2	8.12		6,6-dimetil-4-metilidenobiciclo[3.1.1]heptano	C ₁₀ H ₁₆	127-91-3	Identificado por estándar	<i>B. salicifolia</i>
3	8.58	   	<p>1,2,3-trimetilbenceno</p> <p>1,2,4-trimetilbenceno</p> <p>1,3,5-trimetilbenceno</p> <p>cumeno</p>	C ₉ H ₁₂	<p>526-73-8</p> <p>95-63-6</p> <p>108-67-8</p> <p>98-82-8</p>	<p>Özek <i>et al.</i>, 2014</p> <p>Gören <i>et al.</i>, 2001</p> <p>Vernin <i>et al.</i>, 1995</p> <p>Xavier <i>et al.</i>, 2011</p>	<p><i>Artemisia feddei</i></p> <p><i>Tanacetum spp.</i></p> <p><i>A. herba alba</i></p> <p><i>B. dentata</i></p>
4	9.59		fenilmetanol	C ₇ H ₈ O	100-51-6	Identificado por estándar	
5	11.99		2-fenil-propenal	C ₉ H ₈ O	4432-63-7	Saucier <i>et al.</i> , 2014	<i>Cyanara scolymus</i>

6	15.32		etilidenociclohexano	C ₈ H ₁₄			
7	15.42		(1S,4R)-1,6-dimetil-4-propan-2-il-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno	C ₁₅ H ₂₂		Malizia <i>et al.</i> , 2005 Loayza <i>et al.</i> , 1995 Muselli <i>et al.</i> , 2009 Özel <i>et al.</i> , 2015 Baser <i>et al.</i> , 2014	<i>B. salicifolia</i> <i>B. salicifolia</i> <i>Achillea ligústica</i> <i>Sideritis congesta</i> <i>Iris spp.</i>
8	15.60						
9	16.03	Masa= 95.0856	compuesto no identificado				
10	16.82		trimetilindan 1,1,4-trimetilindan 1,1,5-trimetilindan 1,1,6-trimetilindan 1-(2-metil-2-propil)-4-vinilbenceno ciclohexilbenceno	C ₁₂ H ₁₆		Ahmadi <i>et al.</i> , 2010. Taran <i>et al.</i> , 2013 Peng <i>et al.</i> , 2015	<i>Hymenocrater longiflorus</i> <i>Hymenocrater longiflorus</i> <i>Illicium verum</i>
11	19.04		estireno	C ₈ H ₈	100-42-5	Oomah <i>et al.</i> , 2013 Yener <i>et al.</i> , 2016	<i>Vicia faba</i> <i>Camellia sinensis</i>

Cuadro 3. Listado de compuestos extraídos de fragmentos de piña por SPME e identificados por CG-EM.

NP	TR [min]	Estructuras propuestas	Nomenclatura IUPAC	Fórmula condensada	No. CAS	Referencias	Especie vegetal
1	4.51		2-metilbutanoato de metilo	$C_6H_{12}O_2$	868-57-5	Wei <i>et al.</i> , 2014	<i>Ananas comosus</i>
2	5.12		2-metilpropanoato de etilo		97-62-1	Pino, 2013	
			butanoato de etilo		105-54-4	Pino, 2013	
3	6.51		acetato de 3-metilbutilo	$C_7H_{14}O_2$	123-92-2	Pino, 2013	
6	8.43		acetato de 2-metilbutilo		624-41-9	Pino, 2013	
			hexanoato de metilo		106-70-7	García y Vargas, 2010	
			pentanoato de etilo		539-82-2	Zhang <i>et al.</i> , 2012	
4	7.02		1,2-dimetilbenceno	C_8H_{10}	95-47-6	Borg-Karlson <i>et al.</i> , 1987	
5	7.22	Masa= 71.0851	compuesto no identificado				

7	8.72		hex-5-enoato de metilo	$C_7H_{12}O_2$	2396-80-7	Montero-Calderón <i>et al.</i> , 2010	<i>A. comosus</i>
18	13.81		butil prop-2-enoato		141-32-2	Zhu <i>et al.</i> , 1983	<i>Hedychium coronarium</i>
8	9.73		fenol	C_6H_6O	108-95-2	Skubatz <i>et al.</i> , 1996	<i>Sauromatum guttatum</i>
9	10.13	 	heptanoato de metilo hexanoato de etilo	$C_8H_{16}O_2$	106-73-0 123-66-0	Zhang <i>et al.</i> , 2012 Montero-Calderón <i>et al.</i> , 2010	<i>A. comosus</i>
10	10.32		(E)-hex-3-enoato de etilo	$C_8H_{14}O_2$	2396-83-0	Zhang <i>et al.</i> , 2012	<i>A. comosus</i>
11	10.40	Masa= 146.9759	compuesto no identificado				
12 14	10.66 12.09	Masa= 103.0208	compuestos no identificados				
13	12.01		ácido 2-fenilacético	$C_8H_8O_2$	103-82-2	Erhardt Andreas, 1993	<i>Leontopodium alpinum</i>
15	12.35		2-butilfurano	$C_8H_{12}O$	4466-24-4	Hadacek y Weber, 2002	<i>Sauromatum guttatum</i>

16	12.50		octanoato de metilo	$C_9H_{18}O_2$	111-11-5	García y Vargas, 2010	<i>A. comosus</i>
			heptanoato de etilo		106-30-9	Zhang <i>et al.</i> , 2012	
17	13.69		octanoato de etilo	$C_{10}H_{20}O_2$	106-32-1	Pino, 2013	<i>A. comosus</i>
19	15.41		6,6-dimetil-4-metilideno biciclo[3.1.1]heptan-3-ona	$C_{10}H_{14}O$	30460-92-5	Shawl <i>et al.</i> , 2002	<i>Achillea millefolium</i>
			3-(4-metilpent-3-enil)furano		539-52-6	Grison-Pigé <i>et al.</i> , 2001	<i>Ficus carica</i>

NP= Número de Pico; **TR**= Tiempo de Retención; **No. CAS**=Número de registro CAS (Chemical Abstracts Service).

8. DISCUSIÓN

8.1. Bioensayos activos con olfatómetro

Aunque existen algunos antecedentes sobre las interacciones planta-melolóntido que destacan el interés de probar en campo los volátiles florales ante adultos de las subfamilias Rutelinae y Cetoniinae (Donaldson *et al.*, 1990) y volátiles de plantas hospederas ante adultos de Melolonthinae (Ruther *et al.*, 2002), la información es prácticamente nula en cuanto a bioensayos en laboratorio, restringiéndose a estudios con “cetoninos” y olfatómetros en forma de “Y” equipados con ventiladores generadores del flujo de viento (Peter y Johnson, 2013). El uso de olfatómetros activos para estudios de ecología química de insectos ha sido cuestionado, principalmente porque la mayor parte de los volátiles para los cuales se presenta una respuesta positiva son de corta distancia, lo que no correlaciona con lo que sucede cotidianamente en la naturaleza (Ballhorn y Kautz, 2013). Asimismo, influye la biología y comportamiento propio de los modelos de estudio (principalmente “voladores” o “caminadores”); según Opp y Prokopy (1963), el tratar de estimular a los insectos para volar contra el viento puede ser inapropiado. Además de lo ya mencionado, es posible que en los bioensayos activos realizados la longitud de los brazos del olfatómetro o la intensidad del flujo de viento resultó contraproducente para la actividad de *M. nigripes*, pues predominó la inmovilidad o desplazamiento azaroso a lo largo de los experimentos.

8.2. Bioensayos pasivos con estímulos “físicos” y con extractos

En el caso del azumiate y maíz, es el primer trabajo en el cual se prueba su atracción sobre algún integrante de Melolonthidae. Aunque se han llevado a cabo observaciones en campo que evidencian que ambas plantas son elegidas por adultos de esta especie y de *Macrodactylus mexicanus* (Burmeister), a la fecha no se habían llevado a cabo bioensayos de preferencia y/o elección. Tanto hembras como machos mostraron respuestas positivas significativas a los estímulos puestos a prueba. En la naturaleza, hembras y machos de *M. nigripes* y *M. mexicanus* se dirigen con la misma frecuencia hacia las hojas de

maíz y azumiate, para llevar a cabo la mayor parte de sus actividades biológicas básicas.

Tanto hembras como machos de *M. nigripes* presentaron, respuestas muy parecidas en estímulos “físicos” y con extractos. Lo anterior es probablemente una fortaleza del diseño experimental, ya que aunque los resultados obtenidos en los bioensayos con las hojas (“físicos”) podrían atribuirse a una atracción de tipo visual, como han sugerido previamente Ladd y Klein (1986), con los extractos de azumiate, maíz y piña, se han obtenido evidencias de que los estímulos químicos participan en cierta medida en los eventos de atracción de *Macrodactylus*.

Mención aparte para el octil butirato, compuesto considerado como un control en ambos tipos de bioensayos, que se eligió por ser un componente de una mezcla de compuestos que resultan atractivos para adultos de *Macrodactylus* (Arredondo-Bernal *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 2000). Para fines del diseño experimental, se concibió que el octil butirato se considerara como un control negativo, incluso sobre el hexano, disolvente utilizado cotidianamente como control en bioensayos de este tipo (Romero-López y Arzuffi, 2010). Esto porque se pretendía contrastar si el octil butirato provocaba atracción utilizándose de forma individual. La nula respuesta de los adultos de *M. nigripes* hacia este compuesto puede explicarse por el hecho de que hay otras sustancias que conforman a una planta que sin tener efecto atrayente en forma individual, están implicadas en potenciar la acción de los demás componentes (Jermy, 1966; Meisner y Ascher, 1972; Rodríguez, 2004). Por ello, se necesita una mezcla de varios compuestos para atraer a los insectos como ya se había reportado anteriormente en otros trabajos en coleópteros, en los que se ha utilizado los compuestos como tal o las partes de las plantas puestas a prueba (Leal *et al.*, 1994; Marín y Céspedes, 2007; Hitchner *et al.*, 2008; Gruber *et al.*, 2009). No obstante, es pertinente reconocer que a pesar de que en estudios previos con melolóntidos de *P. obsoleta* y en bioensayos preliminares se habían empleado 0.01 ml para impregnar al papel filtro, tal vez en adultos de *M. nigripes* pudo haberse provocado una saturación en el ambiente y por ende, también los quimiorreceptores que están involucrados en la captación de infoquímicos en estos insectos (Martínez-Bonilla *et al.*, 2015).

Lo observado en los bioensayos con *M. nigripes* en donde los componentes de la piña son atractivos para hembras y machos de esta especie concuerda con lo reportado por Camino-Lavín et al., (1996), así entonces *M. nigripes* se agrega a esta lista de melolóntidos atraídos por la piña y estos datos podrían utilizarse en conjunto con otros compuestos para atraer otras especies de la familia Melolonthidae.

Estrictamente hablando, habrá que afinar el diseño de futuros experimentos que pretendan dar continuidad a esta línea de investigación, en el sentido de disminuir los posibles efectos de atracción visual y priorizar en que las respuestas sean atribuibles exclusivamente a la acción de los volátiles de plantas. Además, sería conveniente utilizar nuevamente el octil butirato en diferentes concentraciones y combinándolo con otros atrayentes ya reportados. En cuanto a la pertinencia de realizar bioensayos de tipo pasivo, se sugiere darle continuidad en próximos bioensayos, ya que existen reportes que señalan que podrían ser los más adecuados para melolóntidos, tomando en cuenta las estrategias que desarrollan estos insectos para sus actividades sexuales y de alimentación (Romero-López y Arzuffi, 2010; Lefort et al., 2015).

8.3. Elección del tipo de olfatómetro y de estímulos para bioensayos

La elección de una planta hospedera por parte de los insectos es un fenómeno complejo que normalmente se rige por varios factores físicos tales como el tipo de hoja y espesor de la planta (Ahmad, 1983, Bernays y Chapman 1994). Sin embargo, hay VP presentes en las hojas, conocidos como señales informativas que son explotadas por los insectos para reconocer sus plantas huésped (Visser, 1986). Por lo que, los bioensayos son el método básico para evaluar la actividad biológica de los estímulos químicos y visuales durante el hallazgo de una planta hospedera (Finch, 1978) y uno de ellos es por medio de olfatómetros. Se recomienda que antes de la construcción de un olfatómetro se efectúe una revisión previa de trabajos anteriores o visitar laboratorios en los que se haga este tipo de investigaciones (Finch, 1986). Para el presente trabajo no se contó con información directa sobre algún representante de *Macrodactylus*, así que se tomaron como referencia los trabajos previos sobre olfatómetros diseñados para especies de otros géneros de melolóntidos, tanto

para adultos como para larvas. Shorey (1970), menciona que el diseño de bioensayos es complicado debido a que se debe tomar en cuenta la normalización de condiciones físicas (temperatura, humedad, luz, etc.) así como la biología del insecto puesto a prueba. Por las características físicas (tamaño, forma) y comportamentales (hábitos, forma de desplazamiento) de los adultos de *M. nigripes*, además de las ventajas de portabilidad, mantenimiento, transporte y versatilidad, se consideró la fabricación de un olfatómetro basado en el modelo propuesto por Ranjith (2007) el cual fue efectivo para la realización de bioensayos activos y pasivos con *M. nigripes*.

Además, que tales bioensayos se hicieran individualmente porque en las pruebas “piloto” con *M. nigripes* en “grupo”, se observó que al parecer la elección de un individuo influenciaba a que los demás se dirigieran al mismo estímulo, esto aunado a que la acumulación de pruebas de laboratorio indican que la experiencia previa puede afectar la elección por insectos y los mecanismos que se encuentran dentro de esta experiencia son: la habituación, inducción, sensibilización, aprendizaje (Bernays, 1993; Turlings *et al.*, 1993; Bernays, 1995; Heard, 2000).

8.4. Respuesta diferencial de hembras y machos de *M. nigripes* hacia los estímulos probados en los bioensayos

Reinecke *et al.* (2002) demostraron que los compuestos liberados por hojas dañadas de *Fagus sylvatica* (L.) fueron significativamente más atractivos para los machos de *Me. melolontha* con respecto a las hembras, concluyendo que en esta especie puede presentarse un tipo de dimorfismo sexual en la respuesta hacia VP, en determinadas condiciones. Lo anterior contrasta con lo observado con *M. nigripes*, en donde tanto hembras como machos fueron atraídos de manera similar hacia los diferentes estímulos, sin detectarse diferencias estadísticamente significativas entre sexos. Es probable que el comportamiento de esta especie sea el que se observa en la mayoría de los insectos, ya que la alimentación es una función vital para los adultos, cualquiera que sea su sexo. Está adecuadamente documentado que hembras y machos necesitan ingerir nutrientes que requieren como fuente de energía para su actividad diaria (Rodríguez, 2000; Rojas y Malo, 2012). Además, la morfología de los quimiorreceptores antenales de *M. nigripes* permite sugerir

que los dos sexos son capaces de para captar los volátiles de estas plantas (Martínez-Bonilla *et al.*, 2015).

8.5. Análisis cromatográfico

8.5.1. Volátiles de hojas de azumiate

B. salicifolia fue el arbusto que se utilizó en este estudio y ésta pertenece a la misma familia y género que *B. conferta*, reportada como planta hospedera de *M. nigripes* (Arce-Pérez y Morón 2000). Se sabe que plantas de la misma familia y género comparten de un 45% a 50% de sus compuestos (Bottia *et al.*, 2007; Vazquez *et al.*, 2007). Por ello la respuesta positiva de *M. nigripes* por azumiate.

En efecto, se encontró coincidencia con el calameneno, α -pineno y β -pineno como compuestos encontrados previamente por Loayza *et al.* (1995) y Malizia *et al.* (2005) en *B. salicifolia*. Estos dos últimos compuestos son los terpenos más importantes y ampliamente distribuidos en la naturaleza, ya que además de formar parte del sistema de comunicación química de varios insectos, son comúnmente encontrados en el perfil químico de muchas plantas, teniendo como principal función la de repeler a insectos fitófagos, hongos y patógenos (Rivas *et al.*, 2012; Sarwar, 2012). Además, otro compuesto reportado para este género es el cumeno el cual fue detectado en *Baccharis dentata* (Vell.) (Xavier *et al.*, 2011).

Un compuesto extraído en el azumiate en este trabajo fue el fenilmetanol, el cual está documentado en pherobase como atrayente de diversos melolóntidos (*Holotrichia oblita* (Faldermann) *H. parallela*, *Maladera orientalis* (Motschulsky), *Anomala corpulenta* (Motschulsky), *A. octiescostata* y *Popillia quadriguttata* (F.)) (El-Sayed, 2016), sugiriéndonos esto, que podría ser un compuesto importante para los eventos de atracción de *M. nigripes*.

En cuanto a los compuestos más abundantes encontrados para el análisis del azumiate, éstos fueron α -pineno y β -pineno, además de trimetilindan el cual se encuentra registrado en plantas de *Hymenocrater longiflorus* (Benth.,

Lamiaceae) (Ahmadi *et al.*, 2010; Taran *et al.*, 2013) y el ciclohexilbenceno en *Illicium verum* (Hook, Illiciaceae) (Peng *et al.*, 2015).

8.5.2. Volátiles de fragmentos de piña

La mayoría de los compuestos identificados en piña fueron ésteres, los cuales forman uno de los grupos más grandes e importantes que constituyen los aromas en la naturaleza. En general, se consideran agradables al olfato y esto coincide con otros trabajos en los que los ésteres representan un porcentaje alto del total de compuestos extraídos de la piña (García y Vargas, 2010; Pino, 2013; Wei *et al.*, 2014) reportándose incluso hasta un 90% del total de compuestos extraídos (Montero-Calderón *et al.*, 2010).

Los compuestos más abundantes fueron acetato de 3-metilbutilo, acetato de 2-metilbutilo, pentanoato de etilo, heptanoato de metilo, hexanoato de etilo y hexanoato de metilo, coincidiendo este último compuesto con lo encontrado en los estudios de Montero-Calderón *et al.* (2010) y Wei *et al.* (2014).

El acetato de 2-metilbutilo fue identificado en el perfil de los fragmentos de piña obtenido con SPME, en nuestro estudio; éste fue reportado por Cha *et al.*, (2011) como uno de los componentes dentro de una mezcla de dieciséis ésteres que atrae a *Stelidota germinata* (Say).

Los compuestos de mayor relevancia reportados para melolóntidos y extraídos en el presente estudio son acetato de 3-metilbutilo, el cual ya había sido descrito dentro de los atrayentes para adultos de *Pachnoda marginata* (Drury) (Stensmyr *et al.*, 2001). De la misma forma, el fenol y el 2-metilbutanoato de metilo están reportados en pherobase como atrayentes de *Cyclocephala insulicola* (Arrow) y *Cyclocephala literata* (Burmeister) respectivamente (El-Sayed, 2016).

Los compuestos de bajo peso molecular tales como los alcoholes, aldehídos y ésteres parecen tener propiedades atractivas para fitófagos, lo cual se ha documentado para los principales productos químicos de varias frutas y flores considerados o percibidos con olor dulce (Johnson *et al.*, 2013). Tal vez esto podría ser la principal razón de atracción de melolóntidos hacia la pulpa de piña.

Ya hay bastantes trabajos documentados acerca de cómo es que intervienen los infoquímicos en diversas interacciones, siendo estos “modificadores del comportamiento” (Romero-Frías, 2015) y por tanto, a partir de los compuestos propuestos en este trabajo, queda abierta la posibilidad de probarlos individualmente, concretar resultados y a partir de ellos formular una propuesta que contribuya al manejo de *M. nigripes*.

9. CONCLUSIONES

1. Las hojas de azumiate y de maíz, así como la pulpa de piña, en ambas modalidades (“físicos” y extractos), resultaron atractivas para hembras y machos de *M. nigripes*.
2. El olfatómetro empleado en el presente estudio resultó adecuado para pruebas de comunicación química de integrantes de *M. nigripes*. En próximos estudios, se recomienda complementar el diseño del equipo con aditamentos que permitan descartar la influencia de estímulos visuales.
3. Los bioensayos del tipo pasivo permiten recabar información acerca de la respuesta olfativa de *M. nigripes*. Se sugiere la realización de bioensayos en los cuales se consideren variables como el estado de madurez de los estímulos, así como diferentes concentraciones de cada uno, incluyendo el control.
4. En la pulpa de piña, la lista de compuestos extraídos se conformó en su mayoría por ésteres, destacándose como más abundantes el acetato de 3-metilbutilo, acetato de 2-metilbutilo, hexanoato de metilo y heptanoato de metilo.
5. Algunos de los compuestos más abundantes extraídos en las hojas de azumiate como α -pineno, trimetilindan y ciclohexilbenzeno, podrían estar implicados en la atracción de *M. nigripes*.
6. Se recomienda la extracción por SPME y el análisis cromatográfico de los volátiles de hojas de maíz, así como la realización de bioensayos con los compuestos más abundantes identificados en éstas y así complementarse con los datos obtenidos de azumiate y piña.

10. LITERATURA CITADA

- Acamovic, T. and J. D. Brooker. 2005. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64(3): 403-412.
- Ahmad, S. 1983. *Herbivorous insects. Host-seeking behaviour mechanism*. Academic, New York. 257 p.
- Ahmadi, F., S. Sadeghi, M. Modarresi, R. Abiri and A. Mikaeli. 2010. Chemical composition, in vitro anti-microbial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanolic extract of *Hymenocrater longiflorus* Benth, of Iran. *Food and Chemical Toxicology*, 48(5): 1137-1344.
- Amat-García, G., H. J. Gasca y G. E. Gasca 2005. Guía para la cría de escarabajos. Fundación Natura- Universidad de Colombia, Bogotá, Colombia. pp. 20-21.
- Aragón, A., G. Lugo-García, A. R. Olivas, P. C. Álvarez, J. R. V. Cota y M. A. Morón. 2010. Huéspedes vegetales Scarabaeoidea en el valle del Carrizo, Sinaloa, México. *Southwestern Entomologist*, 35(1): 99-108.
- Arce-Pérez, R. y M. A. Morón. 2000. Taxonomía y distribución de las especies de *Macrodactylus Latreille* (Coleoptera: Melolonthidae) en México y Estados Unidos de América. *Acta Zoológica Mexicana*, 79: 123-239.
- Arredondo-Bernal, H. C., J. Cibrián-Tovar and R. N. Williams. 1995. Responses of *Macrodactylus* spp. (Coleoptera: Scarabaeidae) and other insect to food attractant in Tlaxcala and Jalisco, Mexico. *Florida Entomologist*, 78 (1): 56-61.
- Arthur, C. L. and J. Pawliszyn. 1990. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62(19): 2145-2148.
- Arthur, C. L., D. W. Potter, S. Bucholz, S. Motlagh and J. Pawliszyn. 1992. Solid phase microextraction for the direct analysis of water: theory and practice. *LC/CG*, 10: 656-661.
- Baker, T. C. and C.E. Linn Jr. 1984. Wind tunnel in pheromone research. In: Hummel, H. E. and T.A. Miller (Eds.). *Techniques in pheromone research*. Springer-Verlag, New York. pp. 75-110.
- Baker, T. C. and R. T. Cardé. 1984. Techniques for Behavioural bioassays. In: Hummel H. E. and T.A. Miller (Eds.). *Techniques in Pheromone Research*. Springer-Verlag, New York. pp. 45-73.

- Ballhorn, D. J., and S. Kautz. 2013. How useful are olfactometer experiments in chemical ecology research? *Communicative and Integrative Biology*, 6(4): 1-3.
- Bautista-Lozada, A., A. E. Bravo-Monzón, y F.J. Espinosa-García. 2012. Importancia ecológica de la emisión de compuestos volátiles vegetales. *Temas Selectos en Ecología Química de Insectos*. 269 p.
- Baser, K. H. C., B. Demirci, I. E. Orhan, M. Kartal, N. Sekeroglu and B. Sener. 2014. Composition of volátiles from three Iris species of Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 23(4): 66-71.
- Benítez-Herrera, L., I. Martínez-M. y A. A. Romero-López. 2015. Anatomía del aparato reproductor de *Macrodactylus mexicanus* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae) y su posible participación en su comunicación química sexual. *Southwestern Entomologist*, 40(1): 189-198.
- Bernays, E. A. 1993. Aversive learning and feeding. In: *Insect Learning: Ecology and Evolutionary Perspectives*. D. R. Papaj y A. C. Lewis (Eds.). Chapman and Hall, New York. pp 1-17.
- Bernays, E. A. 1995. Effects of experience on feeding. In: *Regulatory Mechanism in Insect Feeding*. Chapman, R. F. y G. de Boer (Eds.). Chapman and Hall, New York.
- Bernays, E. A. y R. F. Chapman. 1994. Host-plant selection by phytophagous insects. Chapman and Hall, New York. pp 270-306.
- Blossey, B. and T. R. Hunt-Joshi. 2003. Belowground herbivory by insects: Influence on plants and aboveground herbivores. *Annual Review of Entomology*, 48: 521-547.
- Borg-Karlson, A. K., G. Bergström and B. Kullenberg. 1987. Chemical basis for the relationship between *Ophrys* orchids and their pollinators. II Volatile compounds of *O. insectifera* and *O. speculum* as insect mimetic attractants/excitants. *Chemica scripta*, 27: 303-311.
- Bottia, E. J., O. L. Díaz, D. L. Mendivelso, J. R. Martínez y E. E. Stashenko. 2007. Comparación de la composición química de los metabolitos secundarios volátiles de cuatro plantas de la familia Piperaceae obtenidos por destilación-extracción simultánea. *Scientia et Technica*, 8(33): 193-195.
- Byers, J.A. 1989. Chemical ecology of bark beetles. *Experientia*, 45: 271-283.
- Camino-Lavín, M., A. Jiménez-Pérez, V. Castrejón-Gómez, F. Castrejón-Ayala y R. Figueroa-Brito. 1996. Comportamiento de una nueva trampa para escarabajos

- melolóntidos destructores de raíces. *Southwestern Entomologist*, 21(3): 325-330.
- Cardé, R. T. and J. G. Millar. 2004. *Advances in Insect Chemical Ecology*. Cambridge University Press, New York. 341 p.
- Caselín-Castro, S., J. L. Carrillo Sánchez, C. Llanderal Cázares y H. Bravo Mojica. 2003. Incidencia de *Macrodactylus nigripes* bates (Coleoptera: Melolonthidae) en maíz y haba en Tlaxcala, México. *Agrociencia*, 37(3): 291-297.
- Cha, D. H., G. M. Loeb, C. E. Linn Jr. and W. L. Roelofs. 2011. Electrophysiological and behavioral identification of a volatile blend involved in host location of female strawberry sap beetle, *Stelidota geminata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 140(2): 153-162.
- Cherman, M. A. y M.A. Morón. 2014. Validación de la familia Melolonthidae Leach, 1819 (Coleoptera: Scarabaeoidea). *Acta Zoológica Mexicana*, 30 (1): 201-220.
- Cibrián-Tovar., J., H. Arredondo-Bernal y R. N. Williams. 1990. Evaluación de un atrayente alimenticio para la captura de *Macrodactylus* spp. In: C. B. Landeral, R. Domínguez y J. Sánchez E. [Eds.]. *Avances de la Investigación 1990*. CENA. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. pp. 27-28.
- Contreras, I. A. 2011. *Búsqueda de Redes de Ecología para el desarrollo de semioquímicos aplicables al Manejo Integrado de Plagas en México*. Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional, México, D. F. 234 p.
- Croteau, R., T. M. Kutchan and N. G. Lewis. 2000. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B., W. Gruissem and R. Jones (Eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. pp. 1250-1318.
- Dicke, M. 2000. Chemical ecology of host-plant selection by herbivorous arthropods: a multitrophic perspective. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(7): 601-617.
- Dicke, M. and M. W. Sabelis. 1988. Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? *Functional Ecology*, 2(2): 131-139.
- Donaldson, J. M. I., McGover, T. P. and T. L. Ladd Jr. 1990. Floral attractants for Cetoniinae and Rutelinae (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Economic Entomology*, 83(4): 1298-1305.
- Eberhard, W. G. 1992. Species isolation, genital mechanics, and the evolution of species-specific genitalis in three species of *Macrodactylus* beetles (Coleoptera, Scarabaeidae, Melolonthinae). *Evolution*, 46: 1774-1783.

- Ährlich, P. and P. Raven. 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* 18: 586-608.
- El-Sayed, A. M. 2016. The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. <http://www.pherobase.com>.
- Erhardt, A. 1993. Pollination of the edelweiss, *Leontopodium alpinum*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 111(2): 229-240.
- Facundo, H. T., C. E. Linn Jr., M. G. Villani and W. L. Roelofs. 1999. Emergence, mating and postmating behaviors of the oriental beetle (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Insect Behavior*, 12(2): 175-192.
- Finch, S. 1978. Volatile plant chemicals and their effects on host plant finding by the cabbage root fly. *Proceedings of the 4th Insect/Host Plant Symposium. Entomologia Experimentalis et Applicata*, 24: 350-359.
- Finch, S. 1986. Chapter two - Assessing Host-Plant Finding by Insects, 23-63. In: *Insect-Plant Interactions. Springer Series in Experimental Entomology*, New York. 342 p.
- García, J. P. y D. A. Vargas. 2010. Estudios preliminares sobre la feromona sexual de la mosca de la piña *Melanoloma viatrix* y los posibles semioquímicos involucrados en la relación planta insecto. Tesis para obtener el título de Químico, Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Bucaramanga. 92 p.
- Gören, N., B. Demirci and H. C. Baser. 2001. Composition of the essential oils of *Tanacetum* spp. from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 16(3): 191-194.
- Grajales-Conesa, J., V. Meléndez-Ramírez y L. Cruz-López. 2011. Aromas florales y su interacción con los insectos polinizadores. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82(4): 1356-1367.
- Grison-Pigé, L., J. M. Bessière, T. C. J. Turlings, F. Kjellberg, J. Roy and M. Hossaert-McKey. 2001. Limited intersex mimicry of floral odour in *Ficus carica*. *Functional Ecology*, 15(4): 551-558.
- Gruber, M. Y., N. XU. L. Grenkow, X. LI. Onyilagha, J. J. Soroka, N. D. Westcott y D. D. Hegedus. 2009. Responses of the crucifer flea beetle to *Brassica* volatiles in an olfactometer. *Environmental Entomology*, 38(5): 1467-1479.
- Guidobaldi F. y Guerenstein, 2012. El Sistema olfativo de los insectos. 46-71. En: *Temas selectos en Ecología Química de Insectos. El colegio de la Frontera Sur, México*. 446 p.

- Guzmán-Mendoza, R., Z. Ibarra-Miranda y C. Rodríguez-Hernández. 2013. Fertilización y plantas asociadas al maíz para el manejo de frailecillo *Macrodactylus nigripes* (Coleóptera: Melolonthidae). En: Métodos biorracionales para el manejo de plagas. Agricultura sostenible 8. Colegio de Postgraduados y Sociedad Mexicana de Agricultura sostenible. Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. 105 p.
- Hadacek, F. and M. Weber. 2002. Club-shaped organs as additional osmophores within the *Sauromatum* inflorescence: odour analysis, ultrastructural changes and pollination aspects. *Plant Biology*, 4(3): 367-383.
- Hansson, B. S. y M. C. Stensmyr. 2011. Evolution of insect olfaction. *Neuron*, 72(5): 698-711.
- Harari, A. R., D. Ben-Yakir and D. Rosen. 1994. Mechanism of aggregation behavior in *Maladera matrida* Argaman (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Chemical Ecology*, 20(2): 361-371.
- Heard, T. A. 2000. Concepts in insect host-plant selection behavior and their application to host specificity testing. In: Proceedings of session: Host specificity testing of exotic arthropod biological control agents – The biological basis for improvement in safety. Driesche R. V., T. Heard, A. McClay y R. Reardon (Eds.). Forest Health Technology Enterprise Team. Morgantown, West Virginia, USA. 95 p.
- Heath, J. J., R. N. Williams and P. L. Phelan. 2001. High light intensity: a critical factor in the wind-tunnel flight of two scarabs, the rose chafer and Japanese beetle. *Journal of Chemical Ecology*, 27(3): 419-429.
- Hiltpold, I., E. Bernklau, L. B. Bjostad, N. Alvarez, N. E. Miller-Struttman, J.G. Lundgren and B. E. Hibbard. 2013. Nature, Evolution and Characterisation of Rhizospheric Chemical Exudates Affecting Root Herbivores. In: Chapter three - Advances in Insect Physiology. Johnson, S. N., I. Hiltpold and J. Turlings (Eds.). 45:1-264.
- Hitchner, E. M., T. P. Kuhar, J. C. Dickens, R. R. Youngman, P. B. Schultz y D. G. Pfeiffer. 2008. Host plant choice experiment of Colorado potato beetle (Coleoptera: Crysomelidae) in Virginia. *Journal of Economic Entomology*, 101(3): 859-865.
- Holopainen, J. K. 2004. Multiple functions of inducible plant volatiles. *Trends in Plant Science*, 9(11): 529-533.

- Imai, T., M. Maekawa, S. Tsuchiya and T. Fujimori. 1998. Field attraction of *Hoplia communis* to 2-phenylethanol, a major volatile component from host flowers, *Rosa* spp. *Journal of Chemical Ecology*, 24(7): 1491-1499.
- Jerry, T. 1966. Feeding inhibitors and food preference in chewing phytophagous insects. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 9: 1-12.
- Johnson, S. N., I. Hiltbold and T. C. J. Turlings. 2013. *Advances in Insect Physiology*. 264 p.
- Ladd Jr, T. L. and M. G. Klein. 1986. Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) response to color traps baited with with phenethyl propionate+ eugenol+ geraniol (3: 7: 3) and Japonilure. *Journal of Economic Entomology*, 79(1): 84-86.
- Lammertyn, J., E. A. Veraverbeke and J. Irudayaraj. 2004. zNose™ technology for the classification of honey based on rapid aroma profiling. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 98(1): 54-62.
- Leal, W. S., M. Ono, M. Hasegawa y M. Sawada. 1994. Kairomone from dandelion, *Taraxacum officinale*, attractant for scarab beetle *Anomala octiescostata*. *Journal of Chemical Ecology*, 20(7): 1697-1703.
- Lefort, M. C., S. Boyer, J. Vereijssen, R. Sprague, T. R. Glare, and S. P. Womer. 2015. Preference of a native beetle for “exoticism,” characteristics that contribute to invasive success of *Costelytra zealandica* (Scarabaeidae: Melolonthinae). *PeerJ*, 3: 1–12.
- Loayza, I., D. Abujder, R. Aranda, J. Jakupovic, G. Collin, H. Deslauriers and F. Jean. 1995. Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. *Phytochemistry*, 38(2): 381-389.
- Loughrin, J. H., D. A. Potter and T. R. Hamilton-Kemp. 1995. Volatile compounds induced by herbivory act as aggregation kairomones for the Japanese beetle (*Popillia japonica* Newman). *Journal of Chemical Ecology*, 21(10): 1457-1467.
- López-Ávila, A. y D.F. Rincón. 2006. Diseño de un olfatómetro de flujo de aire para medir respuestas olfativas de insectos de tamaño mediano y pequeño. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 7(1): 61-65.
- Maffei, M. E., J. Gertsch and G. Appendino. 2011. Plant volatiles: Production, function and pharmacology. *Natural Product Reports*, 28(8) 1359-1380.
- Malizia, R. A., A. Cardell, J. S. Molli. S. González, P. E. Guerra and R. J. Grau. 2005. Volatile constituents of leaf oils from the genus *Baccharis*. Part II: *Baccharis*

- obovata* Hokker et Arnott and *B. salicifolia* (Ruiz et Pav.) pers. Species from Argentina. *Journal of Essential Oil Research*, 17(2): 194-197.
- Malo, E. A. y J. C. Rojas. 2012. Métodos de Investigación en Semioquímicos, 17-45. En: *Temas Selectos en Ecología Química de Insectos*. Rojas, J. C. y E. A. Malo (Eds.). El Colegio de la Frontera Sur. México. 446 p.
- Marín-Loaiza, J. C. y C. L. Céspedes. 2007. Compuestos volátiles de plantas. Origen, emisión, efectos, análisis y aplicación al agro. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30, (4), 328-351.
- Martínez-Bonilla, O. K., A. A. Romero-López y S. Galicia-Isasmendi. 2014. "Cuerpos de seta" en el sistema olfativo de *Macrodactylus nigripes* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae). *Entomología mexicana*, 13(1): 536-540.
- Martínez-Bonilla, O. K., A. A. Romero-López y L. N. Benítez-Herrera. 2015. Morfometría corporal y antenal *Macrodactylus mexicanus* y *Macrodactylus nigripes* (Coleoptera: Scarabaeoidea: Melolonthidae) y descripción de sus sensilas lamelares. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Entomología* (n. s.), Número especial 1: 81-87.
- Meisner, J. and K. R. S. Ascher. 1972. Feeding stimulants for the larva of the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* Boisd. *Journal of Applied Entomology*, 71(1-4): 337-349.
- Méndez-Aguilar, M. J., A. E. Castro-Ramírez, J. C. Rojas y E. Huerta-Lwanga. 2008. Respuesta olfativa de larvas *Phyllophaga ravidata* y *P. tumulosa* (Melolonthidae) a volátiles de raíces de cuatro plantas hospederas. *Acta Zoológica Mexicana*, 24(1): 115-118.
- Montero-Calderón, M., M. A. Rojas-Graü and O. Martín-Belloso. 2010. Aroma profile and volatiles odor activity along gold cultivar pineapple flesh. *Journal of Food Science*, 75(9): S506-S512.
- Morón, M.A. 2004. Revision of the cavata group of *Phyllophaga* (*Listrochelus*) Blanchard (Coleoptera: Melolonthidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 97: 77-96.
- Morón, M.A., B. C. Ratcliffe y C. Deloya. 1997. Atlas de los escarabajos de México. Coleoptera: Lamellicornia. Vol. I Familia Melolonthidae. CONABIO y Sociedad Mexicana de Entomología, A.C. México. 280 p.

- Morón, M.A., G. Nogueira, C.V. Rojas-Gómez y R. Arce-Pérez. 2014. Biodiversidad de Melolonthidae (Coleoptera) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 298-302.
- Murlis, J., J. Elkinton and R. Cardé. 1992. Odor plumes and how insects use them. *Annual Review of Entomology*, 37: 505-532.
- Muselli, A., M. Pau, J-M. Desjobert, M. Foddai, M. Usai and J. Costa. 2009. Volatile Constituents of *Achillea ligustica* All. by HS-SPME/GC/GC-MS. Comparison with Essential Oils Obtained by Hydrodistillation from Corsica and Sardinia. *Chromatographia*, 69(5): 575-585.
- Oomah, B. D., M. Razafindrainibe and J. C. G. Drover. 2013. Headspace volatile components of Canadian grown low-tannin faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(3): 473-481.
- Opp, S. B. and R. J. Prokopy. 1963. Approaches and Methods for Direct Behavioral Observation and Analysis of Plant-Insect Interactions, 1-22. In: Miller J.R. y T.A. Miller (Eds). *Insect-Plant Interactions*. Springer Series in Experimental Entomology, New York. 342 p.
- Osborne, G. O. and J. F. Boyd. 1974. Chemical attractants for larvae of *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae). *New Zealand Journal of Zoology*, 1(3): 371-374.
- Özek, G., Y. Suleimen, N. Tabanca, R. Doudkin, P. G. Gorovoy, F. Göger, D. E. Wedge, A. Ali, I. A. Khan and K. H. C. Baser. 2014. Chemical diversity and biological activity of the volatiles of five *Artemisia* species from Far East Russia. *Records of Natural Products*, 8(3): 242-261.
- Özel, M. Z., A. C. Lewis and F. Gögüs. 2015. Chemical composition of volatile oils from leaves and flowers of *Sideritis congesta* using direct thermal desorption–two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 11(1): 22-29.
- Pañuelas, J. and M. Staudt. 2010. BVOCs and global change. *Trends in Plant Science*, 15(3): 133-144.
- Paré, P.W. and J.H. Tumlinson. 1999. Plant Volatiles as a Defense against Insect Herbivores. *Plant Physiology*, 121(2): 325- 332.
- Peng, W., Z. Lin, L. Wang, J. Chang, F. Gu and X. Zhu. 2015. Molecular characteristics of *Illicium verum* extractives to activate acquired immune response. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(3): 348-352.

- Peter, C. I. and S. D. Johnson. 2013. A pollinator shift explains floral divergence in an orchid species complex in South Africa. *Annals of Botany*, 1-12.
- Pino, J. A. 2013. Odour-active compounds in pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merril cv. Red Spanish). *International Journal of Food Science & Technology*, 48(3): 564-570.
- Ranjith, A.M. 2007. An inexpensive olfactometer and wind tunnel for *Trichogramma chilonis* Ishii (Trichogrammatide: Hymenoptera). *Journal of Tropical Agriculture*, 45(1-2): 63-65.
- Reinecke, A., J. Ruther, T. Tolasch, W. Francke and M. Hilker. 2002. Alcoholism in cockchafers: orientation of male *Melolontha melolontha* towards green leaf alcohols. *The Science of Nature*, 89(6): 265-269.
- Rivas, A. C., P. Monteiro, M. Barros, D. Machado, C. Sales and D. Sales. 2012. Biological Activities of α -Pinene and β -Pinene Enantiomers. *Molecules*, 17(6): 6305-6316.
- Rochat, D., P. Ramirez-Lucas, C. Malosse, R. Aldana, T. Kakul and J. P. Morin. 2000. Role of solid-phase microextraction in the identification of highly volatile pheromones of two Rhinoceros beetles *Scapanes australis* and *Strategus aloeus* (Coleoptera, Scarabaeidae, Dynastinae). *Journal of Chromatography A*, 885(1): 433-444.
- Rodríguez, H. C. 2000. Inhibición de la alimentación en insectos plaga. En: *Métodos de investigación en las ciencias ambientales*. López-Olguín, J. F., Aragón G. y M. A. Valera P. (Eds). Publicación especial. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, México. p. 75-97.
- Rodríguez, H. C. 2004. Plantas atrayentes de insectos plaga. En: *Ciencias Ambientales y Agricultura*. Tornero C. M., J. F. López-Olguín y A. Aragón G. (Eds). 2004. Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México. pp. 203-234.
- Rojas, J.C. y E. A. Malo (Eds.). 2012. *Temas selectos en Ecología química de insectos*. El Colegio de la Frontera Sur, México, 446 p.
- Romero-Frías, A. 2015. Estudio de los semioquímicos responsables de la interacción entre la guayaba (*Psidium guajava* L.) y el picudo de la guayaba *Conotrachelus psidii* Marshall. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 147 p.

- Romero-López, A.A. 2016. Comunicación química en coleópteros Melolonthidae: a una década de distancia. *Dugesiana*, 23(1): 59-73.
- Romero-López, A. A. 2012. Uso de feromonas sexuales para el conocimiento y manejo de los “ensambles gallina ciega” en México. *Interciencia*, 37: 559-564.
- Romero-López, A .A., R. Arzuffi y M. A. Morón 2010. Comunicación química sexual. En: Rodríguez del Bosque, L. A. y M. A. Morón (Eds.). *Plagas del suelo*. Editorial Mundi-Prensa, México. 83-96 p.
- Romero-López, A. A. y R. Arzuffi. 2010. Evidencias sobre la producción y liberación de compuestos bioactivos de la feromona sexual de un melolóntido mexicano. In: Rodríguez del Bosque, L.A. y M.A. Morón (Eds.). *Ecología y control de plagas edafícolas*. Publicación especial del INECOL. pp. 204-222.
- Ruiz, C. A. 2008. Estudio de los metabolitos secundarios volátiles de *Lippia origanoides* H. B. K., en tres estados fenológicos. Tesis para obtener el título de Químico. Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias. 140 p.
- Ruther, J., A. Reinecke, K. Thiemann, T. Tolasch, W. Francke and M. Hilker. 2000. Mate finding in the forest cockchafer *Melolontha hippocastani*, mediated by volatiles from plants and females. *Physiological Entomology*, 25(2): 172-179.
- Ruther, J., A. Reinecke, and M. Hilker. 2002. Plant volatiles in the sexual communication of *Melolontha hippocastani*: response towards time dependent bouquets and novel function of (Z)-3-hexen-1-ol as a sexual kairomone. *Ecological Entomology*, 27(1): 76-83.
- Sarwar, A. 2012. Plant design for the separation of various components from turpentine oil. Master of Science Thesis. Forest Products and Chemical Engineering Department of Chemical and Biological Engineering Chalmers University of Technology, Göteborg, Sweden. 46 p.
- Saucier, C., A. dos S. Polidoro, A. L. dos Santos, J. K. Schneider, E. B. Caramao and R. A. Jacques. Comprehensive two-dimensional gas chromatography with mass spectrometry applied to the analysis of volatiles in artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaves. *Industrial Crops and Products*, 62: 507-514.
- Serapio-Jerónimo, M. A., R. Guzmán-Mendoza, C. Herrera-Fuentes y J. Orendain Mendez. 2014. Ciclo de vida y comportamiento de *Macroductylus nigripes* Bates, 1887 (Coleoptera: Melolonthidae) en Ixtlahuaca, México. *Entomología Mexicana*, 1: 710-714.

- Shawl, A. S., S. K. Srivastava, K. V. Syamasundar, S. Tripathi and V. K. Raina. 2002. Essential oil composition of *Achillea millefolium* L. growing wild in Kashmir, India. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(3): 165-168.
- Shorey, H. H. 1970. Sex pheromones of Lepidoptera. In: Control of insect behaviour by natural products. Wood D. L., Silverstein R. M. Nakajima M. (Eds.). Academic Press, New York and London. pp 249-284.
- Shorey, H. H. 1973. Behavioural responses to insect pheromones. *Annual Review of Entomology*, 18: 349-380.
- Skubatz, H., D. D. Kunkel, W. N. Howald, R. Trenkle and B. Mookherjee. 1996. The *Sauromatum guttatum* appendix as an osmophere: excretory pathways, composition of volátiles and attractiveness to insect. *New Phytologist Trust*, 134(4): 631-640.
- Stensmyr, M. C., M. C. Larsson, S. Bice and B. S. Hansson. 2001. Detection of fruit and flower emitted volatiles by olfactory receptor neurons in the polyphagous fruit chafer *Pachnoda marginata* (Coleoptera: Cetoniinae). *Journal of Comparative Physiology*, 187(2): 155-169.
- Taran, M., N. Karimi, J. Abdi, Z. Sohailikhah and N. Asadi. 2013. Larvicidal Effects of Essential Oil and Methanolic Extract of *Hymenocrater longiflorus* (Lamiaceae) Against *Echinococcus granulosus*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16(1): 85-91.
- Tholl, D., W. Boland, A. Hansel, F. Loreto, U. S. R. Rose and J. P. Schnitzler. 2006. Practical approaches to plant volatile analysis. *The Plant Journal*, 45(4): 540-560.
- Turlings, T. C. J., F. L. Wäckers, L. E. M. Vet, W. J. Lewis y J. H. Tumlinson. 1993. Learning of host finding cues by hymenopterous parasitoids. In: *Insect Learning: Ecology and Evolutionary Perspectives*. D. R. Papaj and A. C. Lewis (Eds.). Chapman and Hall, New York, pp 51-78.
- Vazquez, A. M., M. Goleniowski, P. Brunetti, J. J. Cantero, M. G. Demmel, S. Criado, M. C. Ferrari y M. L. Aimar. 2007. Estudio comparativo de la composición química (compuestos orgánicos volátiles) por HS-SPME/GC-MS de *Hedeoma multiflora* Benth. (Lamiaceae), micropropagadas y de poblaciones silvestres. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6(5): 284-285.

- Vernin, G., O. Merad, G. M. F. Vernin, R. M. Zamkotsian and C. Párkányi. 1995. CG-MS Analysis of *Artemisia herba alba* Asso essential oils from Algeria. Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence, Proceedings of the 8th International Flavor Conference, 37: 147-205.
- Visser, J. H. 1986. Host odor perception in phytophagous insects. Annual Review Entomology 31: 121-144.
- Visser, J. H. 1988. Host-Plant Finding by Insects: Orientation, Sensory Input and Search Patterns. Journal of Insect Physiology, 34(3): 259-268.
- Watkins, P. and C. Wijesundera. 2006. Application of zNose™ for the analysis of selected grape aroma compounds. Talanta, 70(3): 595-601.
- Wei, C. B., X. D. Ding, Y. G. Liu, W. F. Zhao and G.M. Sun. 2014. Advanced Materials Research 988: 397-406.
- Weissteiner, S. and S. Schütz. 2006. Are different volatile pattern influencing host plant choice of belowground living insects? Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie, 15: 51-55.
- Weissteiner, S., W. Huetteroth, M. Kollmann, B. Weibecker, R. Romani, J. Schachtner and S. Schütz. 2012. Cockchafer larvae smell host root scents in soil. PLOS ONE, 7(10): 1-12.
- Wicher, D. 2015. Chapter two – Olfactory Signaling in Insects. In: Progress in Molecular Biology and Translational Science, 130: 1-131.
- Williams, R. N. y K. V. Miller. 1982. Field assay to determinate attractiveness of various aromatic compounds to rose chafer adults. Journal of Economic Entomology, 75: 196-198.
- Williams, R. N., T. P. McGovern, M. G. Klein y D. S. Fickle. 1990. Rose chafer (Coleoptera: Scarabaeidae): improved attractants for adults. Journal of Economic Entomology, 83: 111-116.
- Williams, R. N., D. S. Flicke, T. P. McGovern and M. G. Klein. 2000. Development of an attractant for the scarab pest *Macrodactylus subspinosus* (Coleoptera: Scarabaeidae). Journal Economy Entomology, 93(5): 1480-1484.
- Xavier, V. B., R. M. F. Vargas, E. Cassel, A. M. Lucas, M. A. Santos, C. A. Mondin, E. R. Santarem, L. V. Astarita and T. Sartor. 2011. Mathematical modeling for extraction of essential oil from *Baccharis* spp. by steam distillation. Industrial Crops and Products, 33(3): 599-604.

- Xu, J., J. Zheng, J. Tian, F. Zhu, F. Zeng, C. Su and G. Ouyang. 2013. New material in solid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*, 47: 68-83.
- Yener, S., J. A. Sánchez-López, P. M. Granitto, L. Capellin, T. D. Märk, R. Zimmerman, G. Bonn, C. Yeretzian and F. Biasioli. 2016. Rapid and direct volatile compound profiling of black and green teas (*camellia sinensis*) from different countries with Ptr-ToF-ms. *Talanta*, 152: 45-53.
- Zhang, X., Y. Shen, W. Prinyawiwatkul and Z. Xu. 2012. Volatile compounds in fresh-cut pineapple heated at different temperatures. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36(6): 567-573.
- Zhu, L. F., B. Y. Lu, C. S. Tang, K. Jiang and Z. Q. Kang. 1983. Application of XAD-4 hydrophobic resin and GC/MS/DS to study the head space of *Hedychium coronarium* Koen. In: 9th International Congress of Essential Oils. Essential Oil Technical Paper Book, 127-129.