

## OLFATÓMETRO PORTÁTIL PARA EL ESTUDIO DE INTERACCIONES ENTRE “FRAILECILLOS” (COLEOPTERA: MELOLONTHIDAE) Y PLANTAS

Ericka Nieves-Silva✉ y Ángel Alonso Romero-López

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

✉ Autor de correspondencia: roceta\_091@hotmail.com

**RESUMEN.** Se construyó un olfatómetro portátil de cuatro y tres vías, tomando como base la propuesta de Ranjith (2007). Se llevaron a cabo bioensayos activos y pasivos, con la finalidad de evaluar la preferencia de hembras y machos de *Macrodactylus nigripes* Bates, 1887 (Coleoptera: Melolonthidae) hacia diferentes estímulos. Para tal efecto, se emplearon maíz, “azumiate” (ambas plantas consideradas como potenciales hospederos de estos escarabajos), piña (como un atrayente alimentario natural para otras especies de Melolonthidae) y octil-butirato (compuesto considerado como control en estos experimentos, al tratarse de un compuesto químico ya probado previamente como atrayente de *Macrodactylus*). 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 con respecto al control. Se concluye que este tipo de olfatómetro resulta adecuado para pruebas de comunicación química de adultos de *M. nigripes*, aunque habrá que reconsiderar su diseño para asegurar que la atracción es provocada por los volátiles de las plantas hospederas o por los atrayentes alimentarios y no por aspectos visuales.

**Palabras clave:** *Macrodactylus nigripes*, volátiles de plantas, bioensayos, comunicación química.

### Portable olfactometer for the study of interactions between "rose chafers" (Coleoptera: Melolonthidae) and plants

**ABSTRACT.** A portable four- and three way olfactometer was developed based on the proposal by Ranjith (2007). Active and passive bioassays were performed in order to assess the preference of females and males of *Macrodactylus nigripes* Bates, 1887 (Coleoptera: Melolonthidae) to different stimuli. Corn, "azumiate" (both plants considered as potential hosts of these beetles), pineapple (as a natural food attractant for other species of Melolonthidae) and octyl-butyrate (compound considered control in these experiments; it is a chemical compound already tried previously as attractant for *Macrodactylus*), were used for this purpose. Although positive responses by adults of both sexes in the active and passive test were observed, only statistically significant differences were found ( $p < 0.05$ ) in the passive bioassays, mainly towards the leaves and extracts of azumiate from the control. It is concluded that this type of olfactometer is appropriate for chemical communication test with adults of *M. nigripes*, although we will have to reconsider your design to ensure that the responses of beetles are caused by the host plant volatiles emissions or food attractants and not by visual stimuli.

**Keywords:** *Macrodactylus nigripes*, plant volatiles, bioassays, chemical communication.

## INTRODUCCIÓN

Uno de los fenómenos más interesantes que ocurren en las plantas es la liberación del carbono asimilado en la fotosíntesis en forma de los conocidos como compuestos volátiles orgánicos, metabolitos secundarios, infoquímicos o simplemente, volátiles de plantas (VP) (Bautista-Lozada *et al.*, 2012). En general, estos VP son utilizados por los insectos para encontrar su alimento, pareja, evitar depredadores, encontrar una planta hospedera como lugar de apareamiento, oviposición o refugio. Los coleópteros Melolonthidae se encuentran distribuidos ampliamente en el territorio mexicano con la presencia de 110 géneros y 1,040 especies, abarcando la mayor parte de los diferentes tipos de vegetación natural y modificados (Morón *et al.*, 1997); dentro de esta familia se

encuentra *Macrodactylus nigripes* Bates, 1887, el cual causa daño por alimentación a diversos cultivos, generando pérdidas económicas importantes (Guzmán-Mendoza *et al.*, 2013). A pesar de la importancia agrícola que se le atribuye a esta especie, hay pocos trabajos reportados sobre las interacciones entre integrantes de esta familia y sus plantas hospederas; destacan en este sentido los estudios para larvas de especies de *Phyllophaga* y su relación con raíces de plantas de diversos cultivos (Méndez-Aguilar *et al.*, 2008), así como la interacción entre larvas de *Melolontha* con los volátiles de raíces de diferentes plantas (Weissteiner *et al.*, 2012). En ambos casos, el equipo utilizado para evaluar la preferencia de los insectos es el olfatómetro, el cual forma parte de una técnica tradicional para pruebas de ecología química, tanto en su forma “activa” (intermediación de un flujo de viento constante para transportar el estímulo químico) como en su forma “pasiva” (captación del infoquímico por parte del insecto sin la intervención de un flujo de viento) (Finch, 1986). Esta información, además de brindar elementos de interés para la comprensión de la comunicación química de los Melolonthidae, sienta las bases para proponer una estrategia de manejo de especies plaga fundamentada en el uso de atrayentes; en este caso, de los volátiles de las plantas hospederas de este grupo de coleópteros.

Es por eso que el presente estudio se pretende obtener información sobre la interacción entre hembras y machos de *M. nigripes* y diferentes fuentes que potencialmente emiten volátiles atractivos para éstos, utilizando un olfatómetro portátil diseñado para bioensayos activos y pasivos.

## MATERIALES Y MÉTODO

**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). Se intentó que las colectas se efectuaran 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 (Romero-López *et al.*, datos no publicados). 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, para los bioensayos se utilizaron las hojas con cinco días de aparición. 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* mordidiéndolas o utilizándolas como área de sostén para efectuar la cópula) y se trasladaron al laboratorio. Asimismo, se consiguió una piña (*Ananas comosus*, Bromeliaceae) comercial, cortada después de unos 135 días después de la floración, la cual se mantuvo en el laboratorio durante 8 días para la ejecución de los bioensayos.

**Compuesto sintético.** El octil-butirato (W280704 SIGMA-ALDRICH®) fue adquirido en formato comercial.

**Diseño y fabricación del olfatómetro.** Con base a la propuesta de Ranjith (2007), se diseñó y construyó un olfatómetro de acrílico, conformado por una cámara principal central (20 x 20 cm de base y 30 cm de altura), la cual a su vez cuenta con una tapa en la parte superior. Cada una de las caras que dan forma a la cámara central está unida a un brazo del mismo material (5 x 5 cm y 50 cm de largo). Cada brazo consta de un compartimento en su extremo terminal para colocar los estímulos y un ventilador para simular un flujo de viento constante (Fig. 1A).

**Estandarización del olfatómetro con bioensayos “activos” y “pasivos”.** Los bioensayos se llevaron a cabo en condiciones controladas de temperatura ( $24 \pm 2$  °C), humedad ( $65 \% \pm 5$  °C) e iluminación (60 watts), entre las 11:00 y las 13:00 h, con la finalidad de simular las condiciones y horario en que se los adultos llevan a cabo sus actividades alimentarias y sexuales en condiciones

naturales (Romero-López *et al.*, datos no publicados). En cada bioensayo, los estímulos fueron colocados aleatoriamente en cada uno de los extremos del olfatómetro 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 de la hembra o macho de *M. nigripes* 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 olfatómetro. Como “activos” se consideraron aquellos bioensayos que involucran el uso de los cuatro brazos del olfatómetro conectados a la cámara central y de los ventiladores que producen un flujo de viento constante de aproximadamente 0.05 ml/min (Fig. 1A). En el caso de los bioensayos “pasivos”, se prescindió de los brazos y de los ventiladores, empleándose exclusivamente la cámara central del olfatómetro (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 (Fig. 1B).

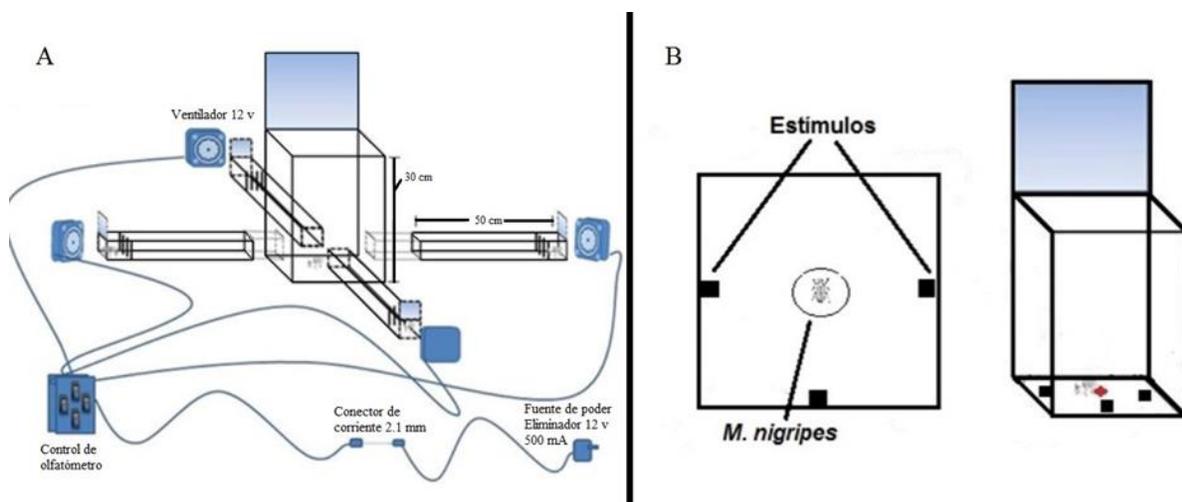


Figura 1. Olfatómetro utilizado para la realización de los bioensayos con hembras y machos de *Macroductylus nigripes* y los estímulos. A) Diseño utilizado para las pruebas activas (cuatro estímulos). B) Diseño utilizado para las pruebas pasivas (tres estímulos).

Los estímulos fueron probados “físicamente” y como extractos. Los estímulos “físicos” consistieron en fragmentos de 1 cm<sup>2</sup> 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 cm<sup>2</sup>. Como control se consideró al octil-butirato, con un 0.1 ml impregnado en el papel filtro. Los bioensayos se fundamentaron en diferentes combinaciones de los tratamientos. En el caso de los “físicos”: a) hoja de azumiate vs fragmento de piña vs octil butirato; b) hoja de maíz vs fragmento de piña vs octil-butirato y c) hoja de azumiate vs hoja de maíz vs octil-butirato. Con respecto a los extractos, se combinaron de la siguiente forma: a) extracto de azumiate vs extracto de piña vs octil-butirato; b) extracto de maíz vs piña vs octil-butirato y c) extracto de azumiate vs extracto de maíz vs octil-butirato. Todas las combinaciones se probaron en cuarenta y siete repeticiones para cada sexo (n= 47).

**Análisis estadístico.** Los datos obtenidos fueron analizados mediante tablas de contingencia con la prueba Chi Cuadrada (Sigma-Plot 12.0).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**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. Aunque existen algunos antecedentes sobre las interacciones “planta-melolóntido” que destacan el interés de probar en campo volátiles florales con adultos de las subfamilias Rutelinae y Cetoniinae (Donaldson *et al.*, 1990) y volátiles de plantas hospederas con 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). Cabe señalar que, en general, 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 (1863), el tratar de estimular a los insectos para volar contra el viento puede ser inapropiado. En el presente trabajo, además de lo ya mencionado, es posible que la longitud de los brazos del olfatómetro o que la intensidad del flujo de viento producido por los ventiladores resultó contraproducente para la actividad de *M. nigripes*, predominando inmovilidad o desplazamientos azarosos a lo largo de los experimentos.

**Bioensayos pasivos - estímulos “físicos”.** Como se refleja en el Cuadro 1, hembras y machos de *M. nigripes* muestran respuestas positivas estadísticamente significativas a las hojas de azumiate y de maíz, así como a la pulpa de piña. Las hembras ( $\chi^2 = 22.93, p < 0.001$ ) y los machos ( $\chi^2 = 29.60, p < 0.001$ ) presentaron respuestas positivas significativas hacia las hojas del maíz con respecto al control. En el caso del azumiate, los adultos de ambos sexos también respondieron positivamente a las hojas de esta planta, con respecto al control (hembras:  $\chi^2 = 12.50, p < 0.05$ ; machos:  $\chi^2 = 14.18, p < 0.05$ ). Hembras y machos respondieron de forma similar a la pulpa de piña con relación al control (hembras:  $\chi^2 = 15.54, p < 0.001$ ; machos:  $\chi^2 = 11.56, p < 0.05$ ). Al comparar en conjunto todos los estímulos con respecto al control y entre estímulos, se detectaron respuestas significativas; para destacar el hecho de que las hojas de maíz fueron las más “preferidas” por los adultos sobre el azumiate e incluso sobre la pulpa de piña, la cual ya había sido reportada por Camino-Lavín *et al.* (1996) como un atrayente alimentario natural de varios grupos de melolóntidos (Cuadro 1). 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 realizado observaciones en campo que evidencian que ambas plantas son elegidas por adultos de esta especie y de *Macrodactylus mexicanus* Burmeister, 1845, además de haber obtenido un perfil químico de los volátiles que podría estar emitiéndose a través de las hojas (Romero-López *et al.*; Nieves-Silva, datos no publicados), a la fecha no se habían llevado a cabo bioensayos de preferencia y/o elección. Para destacar la situación de que tanto hembras como machos mostraron respuestas positivas significativas a todos los estímulos, en particular a sus potenciales plantas hospederas (azumiate y maíz). Esto es consistente con los resultados de la generalidad de los trabajos ya señalados en líneas anteriores, en donde la respuesta de los melolóntidos de ambos sexos hacia volátiles de plantas, es similar. En la naturaleza, hembras y machos de *M. nigripes* y *M. mexicanus* se dirigen con la misma frecuencia hacia las hojas de ambas especies vegetales, para llevar a cabo la mayor parte de sus actividades biológicas básicas Romero-López *et al.* (datos no publicados), además de que se cuenta

con datos sobre sus receptores antenales que permiten sugerir que los dos sexos están diseñados y equipados para captar los volátiles de plantas (Martínez-Bonilla *et al.*, 2015).

**Bioensayos pasivos – estímulos extractos.-** En el Cuadro 2, se muestra que sólo los machos de *M. nigripes* presentaron respuestas positivas estadísticamente significativas hacia hojas de azumiate, con respecto al control ( $\chi^2 = 19.86$ ,  $p < 0.001$ ). Tanto para maíz (hembras:  $\chi^2 = 19.86$ ,  $p < 0.001$ ; machos:  $\chi^2 = 14.18$ ,  $p < 0.001$ ) como para piña (hembras:  $\chi^2 = 14.18$ ,  $p < 0.001$ ; machos:  $\chi^2 = 19.86$ ,  $p < 0.001$ ) se encontraron respuestas positivas significativas con relación al control. En general, no se detectaron diferencias en las respuestas entre los tratamientos ni entre sexos, excepto al momento de comparar las de hembras y machos de azumiate y las de éste último con respecto a las respuestas observadas en maíz y piña (Cuadro 2).

Cuadro 1. Porcentaje total de respuestas por parte de hembras y machos de *Macroductylus nigripes* hacia estímulos “físicos”, hojas de azumiate y maíz, así como fragmento de piña.

Estímulos “físicos” (% de respuesta positiva)				
Adultos <i>M. nigripis</i>	Azumitae	Maíz	Piña	Control
Hembras	19 a	47 c	26 d	0 b
Machos	27 a	48 c	21 d	0 b

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), haciendo énfasis en las comparaciones entre los estímulos y el control. El porcentaje total (100 %) se complementa con respuestas diversas por parte de los adultos (filas por sexo), adicionales a las respuestas positivas hacia cada estímulo. Chi-cuadrada; n= 47 por cada sexo.

Cuadro 2. Porcentaje total de respuestas por parte de hembras y machos de *Macroductylus nigripes* hacia extractos de azumiate, maíz y piña.

Estímulos “físicos” (% de respuesta positiva)				
Adultos <i>M. nigripis</i>	Azumitae	Maíz	Piña	Control
Hembras	11 a*	30 c	27 c	0 b
Machos	31 c	27 c	31 c	0 b

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), haciendo énfasis en las comparaciones entre los estímulos y el control. El porcentaje total (100 %) se complementa con respuestas diversas por parte de los adultos (filas por sexo), adicionales a las respuestas positivas hacia cada estímulo. Chi-cuadrada; \*= Prueba exacta de Fischer; n= 47 por cada sexo.

Es preciso señalar que aunque en el presente estudio con *M. nigripes* no se llevó a cabo un análisis estadístico para comparar los resultados de estímulos “físicos” y los extractos, se observan respuestas muy parecidas por parte de los adultos de ambos sexos hacia ambas modalidades. Lo anterior podría interpretarse como una fortaleza del diseño experimental, ya que aunque los resultados obtenidos en los bioensayos con las hojas (“físicos”) podrían atribuirse también a una atracción de tipo visual, como han sugerido previamente Ladd y Klein (1986), con los extractos de azumiate, maíz y piña (en donde se elimina un posible efecto visual, ya que se emplean los fragmentos de papel filtro), se han obtenido evidencias de que los estímulos químicos participan en mayor o menor medida en los eventos de atracción de *Macroductylus*.

Aunado a ello, mención aparte para el octil-butirato, compuesto considerado como un control en ambos tipos de bioensayos, se eligió trabajar con éste como tal porque en la bibliografía especializada se ha utilizado como un atrayente de adultos de *Macroductylus* (Arredondo-Bernal *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 2000). Bajo la premisa de que el octil-butirato probado a 0.01 ml (concentración utilizada en combinación con otros atrayentes para el género) representaría una mayor exigencia por sus antecedentes de atracción hacia integrantes de este género, el hecho de

que no haya provocado respuestas positivas en alguno de los noventa y cuatro bioensayos permite sugerir que los estímulos seleccionados (principalmente azumiate y maíz, ya que de la piña se sabía sobre su efecto en melolóntidos) cuentan con volátiles aún más atractivos que el octil-butirato para adultos de *M. nigripes*. 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 también.

En cuanto a la pertinencia de realizar bioensayos de tipo pasivo, 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)

Otro aporte adicional que se pretende brindar con este trabajo es el de resaltar el diseño del olfatómetro, el cual, además de que permite que sea utilizado en bioensayos activos y pasivos de laboratorio, permite que sea trasladado al sitio en donde se colectan los adultos de *M. nigripes* para llevar a cabo los bioensayos en su entorno natural. Esto podría confirmarse en próximos estudios con esta especie y con *M. mexicanus*.

## CONCLUSIÓN

El olfatómetro empleado en el presente estudio es propuesto como una herramienta para pruebas de comunicación química de integrantes del género *Macrodactylus*. Este equipo puede ser adaptado a un variado número de estímulos por probar y por ser fácil de trasladar (portátil), puede ser utilizado tanto en laboratorio como en campo.

Las respuestas por parte de los adultos de *M. nigripes* hacia estímulos “físicos” y extractos fue similar incluso al compararlo entre sexos, lo cual permite sugerir que los eventos de atracción entre melolóntidos y plantas podrían estar mediados por infoquímicos.

Se recomienda modificar algunos aspectos del diseño del olfatómetro para que en posteriores bioensayos disminuya la posibilidad de que la atracción de *M. nigripes* sea causada por otros factores diferentes a los químicos (p. ej. estímulos visuales).

## Literatura Citada

- 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* (n. s.), 97: 123–239.
- Arredondo-Bernal, H. C., Cibrián-Tovar, J. 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.
- Ballhorn, D. J. and S. Kautz. 2013. How useful are olfactometer experiments in chemical ecology research? *Communicative and Integrative Biology*, 6: 1–3.
- Bautista-Lozada, A., Bravo-Monzón, A. E. y F. J. Espinosa-García. 2012. Importancia ecológica de la emisión de compuestos volátiles vegetales. Pp. 268–286. In: Rojas J. C. y E. A. Malo (Eds.). *Temas Selectos en Ecología Química de Insectos*. El Colegio de la Frontera Sur, México.
- Camino-Lavín, M., Jiménez-Pérez, A., Castrejón-Gómez, V., Castrejón-Ayala, F. y R. Figueroa-Brito. 1996. Comportamiento de una nueva trampa para escarabajos melolóntidos destructores de raíces. *Southwestern Entomologist*, 21(3): 325–330.
- Donaldson, J. M. I., McGovern, T. P. and T. L. Ladd Jr. 1990. Floral attractants for Cetoniinae and Rutelinae (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Economic Entomology*, 83: 1298–1305.

- Finch, S. 1986. Assessing Host-Plant Finding by Insects. Pp. 23–63. *In*: Miller J. R. y T. A. Miller (Eds.). *Insect-Plant Interactions*. Springer Series in Experimental Entomology, New York.
- Guzmán-Mendoza, R., Ibarra-Miranda, Z. y C. Rodríguez-Hernández. 2013. Fertilización y plantas asociadas al maíz para el manejo de frailecillo *Macrodactylus nigripes* (Coleóptera: Melolonthidae). Pp. 3–12. *In*: Rodríguez-Hernández, C. y R. Guzmán-Mendoza (Eds.). *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.
- Ladd Jr, T. L. and M. G. Klein. 1986. Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) response to color traps baited with phenethyl propionate+ eugenol+ geraniol (3: 7: 3) and Japonilure. *Journal of Economic Entomology*, 79: 84–86.
- Lefort, M. C., Boyer, S., Vereijssen, J., Sprague, R., Glare, T. R. 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.
- Martínez-Bonilla, O. K., Romero-López, A. A. 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.)*, No. Especial 1: 81–87.
- Méndez-Aguilar, M. de Jesús, Castro-Ramírez, A. E., Rojas, J. C. y E. Huerta-Lwanga. 2008. Respuesta olfativa de larvas *Phyllophaga ravidia* y *P. tumulosa* (Melolonthidae) a volátiles de raíces de cuatro plantas hospederas. *Acta Zoológica Mexicana (n. s.)*, 24(1): 115–118.
- Morón, M. A. 1997. White grubs (Coleoptera: Melolonthidae: *Phyllophaga* Harris) in Mexico and Central America. A Brief Review. *Trends in Entomology*, 1: 117–128.
- Opp, S. B. and R. J. Prokopy. 1963. Approaches and Methods for Direct Behavioral Observation and Analysis of Plant-Insect Interactions. Pp. 1–22. *In*: Miller J. R. y T. A. Miller (Eds.). *Insect-Plant Interactions*. Springer Series in Experimental Entomology, New York.
- 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. doi: 10.1093/aob/mct216.
- Ranjith, A. M. 2007. An inexpensive olfactometer and wind tunnel for *Trichogramma chilonis* Ishii (Trichogrammatidae: Hymenoptera). *Journal of Tropical Agriculture*, 45(1-2): 63–65.
- 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. Pp. 204–222. *In*: Rodríguez del Bosque L. A. y M. A. Morón (Eds.). *Ecología y control de plagas edafícolas*. Publicación especial del INECOL.
- Ruther, J., Reinecke, A. 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: 76–83.
- Weissteiner, S., Huetteroth, W., Kollmann, M., Weibecker, B., Romani, R., Schachtner, J. and S. Schütz. 2012. Cockchafer larvae smell host root scents in soil. *PLOS ONE*, 7(10): 1-12. doi.org/10.1371/journal.pone.0045827.
- Williams, R. N., Fickle, D. S., McGovern, T. P. and M. G. Klein. 2000. Development of an attractant for the scarab pest *Macrodactylus subspinosus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal Economy Entomology*, 93(5): 1480–1484.