

VARIACIÓN TEMPORAL DE INSECTOS VISITANTES SOBRE FLORES DE *Acacia cochliacantha* Humb. y Bonpl. ex Willd, 1806 (FABACEAE) E IDENTIFICACIÓN DE SUS VOLÁTILES FLORALES

Humberto Reyes-Prado¹, José Manuel Pino-Moreno², Norma Robledo³, Abraham Sánchez-Cruz⁴ y Fernando Varela Hernández⁴

¹Laboratorio de Ecología Química-Escuela de Estudios Superiores del Jicarero-Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Carretera Galeana-Tequesquitengo s/n, C.P. 62909, Jojutla de Juárez, Morelos, México.

²Laboratorio de Entomología, Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510, CDMX.

³Laboratorio de Ecología Química de Insectos, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-Instituto Politécnico Nacional. Km. 8.5 Carretera Yautepec-Jojutla de Juárez, Yautepec, Morelos C.P. 62731, México.

⁴Laboratorio de Biología Molecular, Escuela de Estudios Superiores del Jicarero-Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Carretera Galeana-Tequesquitengo s/n, C.P. 62909, Jojutla de Juárez, Morelos, México.

✉ Autor de correspondencia: abrahamhuracan@gmail.com

RESUMEN. En este estudio, se reporta la entomofauna visitante floral y su distribución temporal sobre flores de *A. cochliacantha* durante el día, así como la identificación de los compuestos volátiles florales registrado en la mañana que es el momento donde se encontraban mayor cantidad de insectos sobre las flores. Principalmente las familias Apidae y Curculionidae de seis familias de insectos reportadas, son a las que pertenecen los insectos que más visitan las flores de *A. cochliacantha*. El análisis e identificación de los compuestos volátiles florales se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se encontraron cuatro terpenos, un alcohol aromático, un aldehído y dos alcanos. Los estudios de interacciones planta-insecto, como los sistemas planta-polinizador, son de gran importancia económica pero también biológica para la conservación ya que permite entender cómo funciona el equilibrio de los ecosistemas terrestres.

Palabras clave: compuestos aromáticos, ecosistema, sierra montenegro

Temporal variation of visitors insects on flowers of *Acacia cochliacantha* Humb. y Bonpl. ex Willd, 1806 (Fabaceae) and identification of its floral volatiles

ABSTRACT. This study reports the insects that visit *A. cochliacantha* flowers and its temporal distribution on flowers during the day, as well as the floral volatile compounds identification when there were more insects on flowers. A higher number of insects that visit flowers were observed in the morning than in the afternoon. Apidae and Curculionidae families harbor the insects that most visit *A. cochliacantha* flowers. The analysis and identification of floral volatile compounds when there is a higher incidence of visitors insects on flowers was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Four terpenes, an aromatic alcohol, an aldehyde, and two alkanes were found. Plant-insect interactions studies, such as plant-pollinator systems, are economic and biological importance, these studies also tend to be important in conservation systems to understand the balance terrestrial ecosystems.

Key words: aromatic compounds, ecosystem, sierra montenegro

INTRODUCCIÓN

Los insectos que visitan las flores para su alimentación tienen un papel importante en la reproducción de las plantas, proporcionando un servicio ambiental esencial para el mantenimiento de los ecosistemas terrestres (Muhlemann *et al.*, 2014). Se conoce que los insectos además de usar estímulos visuales, también usan estímulos químicos para aterrizar sobre las flores (Schiestl, 2010; Farré-Armengol *et al.*, 2013; Milet-Pinheiro *et al.*, 2014). En este

sentido, el patrón de distribución temporal durante el día cuando los insectos visitan las flores para obtener néctar o polen, puede depender de varios factores abióticos y bióticos, entre éstos, la emisión de atrayentes como los compuestos químicos volátiles que emiten las flores, conocidos como metabolitos secundarios. Así, la atracción de los visitantes florales a los volátiles florales implica una interacción compleja (Báez, Pino y Morales, 2012; Muhlemann *et al.*, 2014; Carta *et al.*, 2015; Van Veen, 2015).

La diversidad química de los compuestos que emiten las flores puede mediar una variedad de funciones, como la atracción de insectos. Es decir, la visita de los insectos sobre las flores depende en gran medida de la emisión de compuestos volátiles florales, ya que el perfil de volátiles cambiará en composición y concentración durante el día, formando un “código de aroma” único que permite el reconocimiento de este aroma por los insectos (Schiestl, 2010; Jürgens y Viljoen, 2010; Vega *et al.*, 2014; Amarasinghe *et al.*, 2015). Por lo anterior, la identificación química de los compuestos volátiles florales y la información sobre su participación en el comportamiento de los insectos, es de gran importancia para la ciencia básica y aplicada, para entender la ecología de las interacciones planta-insecto (Raguso, 2008; Schiestl, 2010; Van der Niet *et al.*, 2015).

Algunas especies de plantas como las acacias, las cuales forman parte de ecosistemas de selva baja caducifolia y que controlan la erosión de los suelos y evitan la desertificación de la tierra proporcionándole funcionalidad y estabilidad (Krisnawati *et al.*, 2011), han sido poco estudiadas en la interacción de los insectos asociados a sus estructuras reproductivas de la planta (Stone *et al.*, 2003). Tal es el caso de *Acacia cochliacantha* Humb. y Bonpl. ex Willd, 1806 (Rico-Arce, 2001), una especie de acacia con gran cobertura vegetal en la Sierra Montenegro en el estado de Morelos. Para esta especie, no existían registros de los insectos que visitan sus flores y que son sus posibles polinizadores, por lo que fue necesario identificar la entomofauna visitante floral de *A. cochliacantha* y su variación durante el día, además, una vez conocido el horario de mayor frecuencia de visitantes florales durante el día, se identificaron los compuestos volátiles emitidos por las inflorescencias a esa hora del día.

MATERIALES Y MÉTODO

Sitio de estudio y colecta de insectos. Para realizar este estudio, se delimitó un área de la reserva estatal Sierra Montenegro localizada en el vértice 173 18° 48' 32.359908" Norte y 99° 7' 12.489272" Oeste, en esta superficie los muestreos de insectos que visitan las inflorescencias se realizaron durante 12 días entre los meses de junio a agosto, que es la época de floración de *A. cochliacantha*. Los visitantes florales insectiles fueron observados cada media hora de las 8:00 a 18:00 horas; en 11 arbustos de menos de 2 m de altura en ramas que tenían de 5-30 inflorescencias en plena floración y madurez. Inmediatamente después de la observación de los insectos visitantes florales, éstos se colectaron con redes entomológicas y se depositaron en frascos de vidrio que contenían alcohol al 70 % o ácido acético; posteriormente los insectos se identificaron mediante las claves taxonómicas correspondientes a cada orden y familia (Triplehorn y Johnson, 2005).

Extracción e identificación de volátiles florales. La colecta de inflorescencias se realizó en la hora del día en que los insectos visitaban las flores con mayor frecuencia, se colectaron las ramas junto con las inflorescencias y se trasladaron al laboratorio de Ecología Química de Insectos del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional.

El sistema de colecta consistió en colocar dentro de una cámara de vidrio (20 cm de largo y 10 cm de diámetro) las inflorescencias de *A. cochliacantha* (aproximadamente 100 g). En la entrada

se adaptó una placa y se colocó una micropipeta de vidrio (13 cm largo × 0.6 cm diámetro externo) conteniendo 250 mg de material adsorbente Super Q (Alltech Assoc, Inc., Deerfield, Illinois), a la cual se le conectó una bomba de vacío (Welch® USA) con un flujo 1 L/min medido por un flujómetro (Cole Palmer, Ev-03217-06, USA) para extraer los volátiles liberados por las flores. El tiempo de extracción fue de 10:00 a 13:00 horas, enseguida, los extractos se disolvieron en 1 mL de hexano (HPLC, JT Baker, EUA), después, cada muestra se reconcentró a 300 µL con corriente de nitrógeno y se almacenó a 4 ° C hasta su utilización para la identificación de los compuestos.

Para el análisis e identificación del perfil químico de extractos de volátiles florales, se inyectó 2 µL del extracto en un cromatógrafo de gases (CG) (HP 6890) acoplado a un espectrómetro de masas (EM) (HP 5975C) (Agilent, EUA). El inyector se trabajó en modo Splitless, su temperatura fue de 220°C, el programa de temperatura del horno fue con una temperatura inicial de 40°C durante 3 min, rate 10°C/min, hasta una temperatura final de 240°C. La temperatura del auxiliar fue de 250°C. El EM se trabajó en modo IE de 35-550 UMA, la identificación de los compuestos se llevó a cabo considerando sus tiempos de retención y comparando los espectros de masas con los de la biblioteca espectral (NIST/EPA/NIH. 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio, los visitantes florales de *A. cochliacantha* son ubicados taxonómicamente en tres Ordenes (Hymenoptera, Coleoptera y Diptera). Estos grupos de insectos incluyen seis familias como Apidae, Vespidae, Formicidae, Chrysomelidae Curculionidae y Syrphidae (Cuadro 1).

Cuadro 1. Entomofauna visitante floral de *A. cochliacantha*.

Orden	Familia	Subfamilia/Género/Especie	Nombre común
Hymenoptera	Apidae	<i>Apis mellifera</i> Linnaeus, 1758	abeja
	Vespidae	<i>Polybia</i> sp.	avispa
	Formicidae	<i>Pseudomyrmex gracilis</i> (Fabricius, 1804)	hormiga
Coleoptera	Chrysomelidae	<i>Dorymyrmex</i> sp.	hormiga
	Curculionidae	<i>Antitypona</i> sp. Baridinae	escarabajo picudo, gorgojo
Diptera	Syrphidae	-	mosca

De los insectos visitantes florales que se reportan en este estudio, algunos de ellos como los coleópteros *Antitypona* sp., la morfoespecie de la subfamilia Baridinae, la abeja *Apis mellifera*, avispas del género *Polybia* spp. y moscas de la familia Syrphidae se ha documentado en literatura que se alimentan del polen y néctar de las flores en otras especies de plantas, entre éstas, las acacias (Fleming *et al.*, 2007; Milléo *et al.*, 2011). Para el caso de insectos de la familia Formicidae existen reportes que mencionan el mutualismo existente entre acacia-hormiga, por lo cual estas especies de formícidos le brindan protección a la planta a cambio de alimento (Willmer *et al.*, 2009; Gómez *et al.*, 2015).

De las seis familias de insectos reportadas, Apidae y Curculionidae incluyen a los insectos que con mayor frecuencia visitan las flores de *A. cochliacantha* (Figura 1).

El patrón de distribución temporal de las diferentes familias de visitantes florales en *A. cochliacantha* presenta una variación durante el día, ya que se observó un mayor número de insectos visitantes florales por la mañana hasta el mediodía y un menor número de insectos por la tarde, como se ha reportado para otras especies de plantas (Muhlemann *et al.*, 2014).

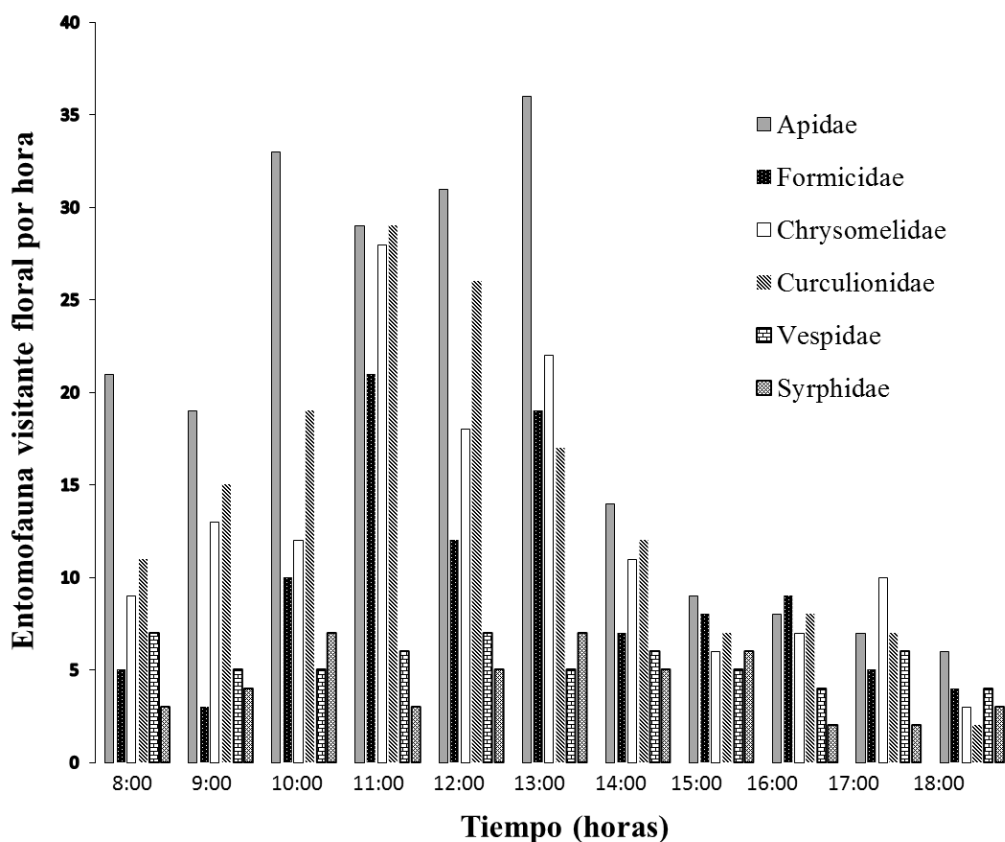


Figura 1. Insectos colectados por hora durante los 12 días de muestreo sobre las inflorescencias de *A. cochliacantha* y su variación durante el día.

En el caso de los compuestos volátiles florales identificados en el lapso del día donde hubo mayor cantidad y diversidad de insectos visitantes florales, se encontraron mezclas de terpenos, derivados de ácidos grasos y compuestos aromáticos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Compuestos químicos volátiles florales de *A. cochliacantha* identificados en CG-EM de muestras tomadas cuando los insectos visitan con mayor frecuencia las flores.

Compuesto químico	Clase	Peso molecular	Tiempo de retención (min)	Número de registro CAS*
Camfeno	Terpeno	136.2340	5.88	79-92-5
D-limoneno	Terpeno	136.2340	7.31	5989-27-5
Cineole	Terpeno	154.2493	7.35	470-82-6
Fenilcarbinol	Alcohol aromático	108.1378	7.44	100-51-6
β -Ocimeno	Terpeno	136.2340	7.68	13877-91-3

Nonanal	Aldehído	142.2386	8.59	124-19-6
Hexadecano	Alcano	226.4412	15.25	544-76-3
Octadecano	Alcano	254.4943	17.44	593-45-3

*Por sus siglas en inglés Chemical Abstracts Service.

De los compuestos volátiles identificados de las flores de *A. cochliacantha*, como el D-limoneno, Nonanal, Fenilcarbinol y β -Ocimeno, se ha reportado que son clave para determinados insectos en el proceso de localización de las flores (Bouchenak-Khelladi *et al.*, 2010; Azuma, 2013). En este sentido, existe una sincronía entre planta-insecto, ya que la emisión de volátiles florales por las plantas coincide cuando los insectos son más activos (Van der Niet *et al.*, 2015), es decir, éstos compuestos tienen un papel importante en la reproducción de la planta (Pichersky y Gershenzon, 2002; Hans-Walter, 2005; Gershenzon y Dudareva, 2007; Pacini *et al.*, 2008).

Entre los órdenes de insectos que visitan las flores, se sabe que los himenópteros son más atraídos por compuestos orgánicos aromáticos (Schiestl, 2010). Sin embargo, sería importante en el futuro profundizar en el estudio de estas asociaciones flor-insecto; por ejemplo, evaluar la actividad biológica de los insectos a los compuestos volátiles florales mediante estudios experimentales a nivel de receptores antenales como es la Electroantenografía, además, realizar estudios de comportamiento en olfatometría (Jürgens y Viljoen, 2010; Torres *et al.*, 2014; Thöming y Knudsen, 2014; Beyaert y Hilker, 2014; Muhlemann *et al.*, 2014). Actualmente, ha surgido una preocupación por la disminución de insectos que participan en la reproducción de las plantas, siendo de gran importancia los registros taxonómicos de los insectos que son posibles polinizadores, además, de los estímulos químicos florales que atraen a dichos insectos, ya que el uso de los aromas florales tiende a ser una opción en sistemas de polinización con importancia económica pero también de conservación. Por lo tanto, el conocimiento de la interacción planta-insecto, es trascendental para entender cómo funciona el mantenimiento e integridad de los ecosistemas terrestres, como es la selva baja caducifolia de la Reserva Sierra Montenegro.

CONCLUSIONES

En este estudio, se reportan seis familias de insectos que visitan las flores de *A. cochliacantha* con mayor frecuencia por la mañana durante el día.

Se reportan ocho compuestos volátiles florales que emite la planta cuando hay mayor cantidad de insectos visitantes florales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los especialistas del Instituto de Biología-UNAM por corroborar la identificación de los ejemplares de insectos, al Dr. Ismael A. Hinojosa Díaz, Dr. Santiago Zaragoza y M. en C. Cristina Mayorga Martínez. Este proyecto fue financiado para su realización por el sistema PRODEP-SEP No. DSA/103.5/1513073.

LITERATURA CITADA

- Amarasinghe, R., Poldy, J., Matsuba, Y., Barrow, R. A., Hemmi, J. M., Pichersky, E., y Peakall, R. 2015. UV-B light contributes directly to the synthesis of chiloglottone floral volátiles. *Annals of Botany*, 115, 693-703. doi: 10.1093/aob/mcu262.
- Azuma, H. 2013. Floral scent chemistry of *Nuphar japonica* (Nymphaeaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 48, 211-214. DOI: 10.1016/j.bse.2012.12.019.

- Báez, D., Pino, J. A., y Morales, D. 2012. Volatiles from *Magnolia grandiflora* flowers: comparative analysis by simultaneous distillation-extraction and solid phase microextraction. *Natural Product Communications*, 7, 237-8.
- Beyaert, I., y Hilker, M. 2014. Plant odour plumes as mediators of plant–insect interactions. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 89, 68-81. doi: 10.1111/brv.12043.
- Bouchenak-Khelladi, Y., Maurin, O., Hurter, J., y van der Bank, M. 2010. The evolutionary history and biogeography of Mimosoideae (Leguminosae): an emphasis on African acacias. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57, 495-508. doi.org/10.1016/j.ympev.2010.07.019.
- Carta, A., Flamini, G., Cioni, P. L., Pistelli, L., y Peruzzi, L. 2015. Flower bouquet variation in four species of *Crocus* ser. Verni. *Journal of Chemical Ecology*, 41, 105-111. doi: 10.1007/s10886-014-0541-y.
- Farré-Armengol, G., Filella, I., Llusia, J., y Peñuelas, J. 2013. Floral volatile organic compounds: Between attraction and deterrence of visitors under global change. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 15, 56-67. doi.org/10.1016/j.ppees.2012.12.002.
- Fleming, P. A., Hormeyr, S. D., y Nicolson, S. W. 2007. Role of insect in the pollination of *Acacia nigrescens* (Fabaceae). *South African Journal of Botany*, 75, 49-55. doi.org/10.1016/j.sajb.2006.06.010.
- Gershenson, J., y Dudareva, N. 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*, 3, 408-414.
- Gómez S., Trujillo-Cervantes O., Castaño G., y Tapia-Pastrana, F. 2015. Mirmecofauna asociada a acacias mirmecófilas en Veracruz y Oaxaca, México. En: Castaño-Meneses, G., Vásquez-Bolaños, M., Navarrete-Heredia J. L., Quiroz-Rocha, G. A., y Alcalá-Martínez I. (Eds.), *Avances de Formicidae de México* (pp. 171-177). Universidad de Guadalajara, México: Editorial CUCBA.
- Hans-Walter, H. 2005. *Plant biochemistry*. 4th edition. Elsevier. New York. 656 p.
- Jürgens, A., y Viljoen, A. 2010. Chemical diversity and biological functions of plant volátiles. *South African Journal of Botany*, 76, 607-611.
- Krisnawati, H., Kallio, M., y Kannien, M. 2011. *Acacia mangium* will ecology silviculture and productivity. Bogor, Indonesia: CIFOR.
- Milet-Pinheiro, P., Ayasse, M., Schindwein, C., Dobson, H., y Dötterl, S. 2014. Host location by visual and olfactory floral cues in an oligolectic bee: innate and learned behavior. *Journal of Chemical Ecology*, 40, 1126-1134. doi: 10.1186/s12898-016-0074-z.
- Milléo, J., Farago, T. L. B., de Souza, J. M. T., Barbola I. de F., y Castro, J. P. 2011. Entomofauna asociada a flores de berenjena y su papel en la producción de los frutos. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 70, 17-25.
- Muhlemann, O., Klempien, A., y Dudareva, N. 2014. Floral volatiles: from biosynthesis to function. *Plant Cell and Environment*, 37, 1936-1949. doi.org/10.1111/pce.12314.
- NIST/EPA/NIH. (2002). Mass spectral library. Mass Spectral Library with Search Program (Data Version: NIST05, Software Version 2.0), USA.
- Pacini, E., Viegi, L., y Franchi, G. 2008. Types, evolution and significance of plant-animal interactions. *Rendiconti Lincei*, 19, 75-101.
- Pichersky, E., y Gershenson, J. 2002. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 237-243.
- Raguso, R. A. 2008. Wake up and smell the roses: The ecology and evolution of floral scent. *Annual Review in Ecology, Evolution and Systematics*, 39, 549-569. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095601.
- Rico-Arce, M. L. 2001. El género acacia (Leguminosae, Mimosoideae) en el Estado de Oaxaca, México (parte A). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 58, 251-275.
- Schiestl, F. P. 2010. The evolution of floral scent and insect chemical communication. *Ecology Letters*, 13, 643-656. doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01451.x.

- Stone, G.N., Raine, N.E., Prescott, M., y Willmer, P. G. (2003). Pollination ecology of acacias (Fabaceae, Mimosoideae). *Australian Systematic Botany*, 16, 103–118. doi: 10.1071/SB02024.
- Triplehorn, C.A. y N.F Johnson. 2005. Borror and DeLong's Introduction to the Study of Insects. Seventh Edition. Thomson Brooks/Cole, USA, 864 pp.,
- Thöming, G., y Knudsen, G. 2014. Attraction of pea moth *Cydia nigricana* to pea flower volátiles. *Phytochemistry*, 100, 66-75. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.01.005.
- Torres, A., Dötterl, S., y Schlindwein, C. 2014. An aromatic volatile attracts oligolectic bee pollinators in an interdependent bee-plant relationship. *Journal of Chemical Ecology*, 40, 1126-34. doi: 10.1007/s10886-014-0510-5.
- Van der Niet, T., Jurgens, A., y Johnson, S. D. 2015. Is the timing of scent emission correlated with insect visitor activity and pollination in long-spurred *Satyrium* species?. *Plant Biology*, 17, 226-237. doi.org/10.1111/plb.12196.
- Van Veen, F. 2015. Plant-modified trophic interactions. *Current Opinion in Insect Science*, 8, 1-5. doi: 10.1016/j.cois.2015.02.009.
- Vega, C., Herrera, C., y Dötterl, S. 2014. Floral volatiles play a key role in specialized ant pollination. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 16, 32-42. doi.org/10.1016/j.ppees.2013.11.002.
- Willmer, P. G., Nuttman, C.V., Raine, N. E., Stone, G. N., Patrick, J. G., Henson, K., Stillman P., McIlroy, L., Potts, S. G., y Knudsen, J. T. 2009. Floral volatiles controlling ant behaviour. *Functional Ecology*, 23, 888–900. doi.org/10.1111/j.1365-2435.2009.01632.x.