

**Visitantes Florales del Orden Hymenoptera y
Su Asociación con la Fragancia Floral de
Passiflora edulis f. *flavicarpa* Degener
(Passifloraceae).**

Luis Alfonso Romero Parra

Trabajo presentado como requisito para optar al título de Biólogo

Directora: **Elena E. Stashenko**

Química, Ph.D.

Codirector: **Daniel R. Miranda E.**

Biólogo

Universidad Industrial de Santander

Facultad De Ciencias

Escuela De Biología

Bucaramanga

2018

Dedicatoria

Dedico este trabajo a la naturaleza que permitió que todo fluyera.

Agradecimientos

Mis grandes y sinceros agradecimientos a toda mi familia por su apoyo, a la Dra. Elena E. Stashenko y Dr. Daniel Miranda, por su confianza y aportes en mi formación como investigador, al químico Fausto Prada, por toda su colaboración y acompañamiento, y, por supuesto, a todos mis amigos que ayudaron.

Tabla de Contenido

	pág.
Introducción	14
1. Marco Teórico	16
1.1. Familia Passifloraceae	17
1.1.1. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Degener	217
1.1.2. <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> y sus visitantes florales (Hymenoptera)	16
1.2. Compuestos orgánicos volátiles de la fragancia de la flores	17
1.2.1. Emisión y regulación de compuestos orgánicos volátiles	18
1.2.2. Técnica de microextracción en fase sólida y análisis cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	24
1.2.3. Emisión de compuestos orgánicos volátiles en flores de <i>Passiflora</i>	24
2. Materiales y Métodos	27
2.1. Establecimiento del cultivo experimental de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	27
2.2. Las fases de la flor de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	29
2.3. Selección de flores para el muestreo de visitantes florales (Hymenoptera)	29
2.4. Identificación y cuantificación de los visitantes en cada fase floral	30
2.5. Selección de las flores para extracción de los componentes de la fragancia	31

2.6. Extracción, identificación y cuantificación de los componentes de la fragancia de flores en diferentes fases	32
2.7. Análisis de los datos.....	36
3. Resultados	39
3.1. Visitantes florales de <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	39
3.2. Visitantes en diferente fase de la flor	41
3.3. Antesis floral y visitantes florales durante el día (12:00-17:00).....	42
3.4. Componentes de la fragancia de flores en diferentes fases	44
3.5. Registros de las variables ambientales	49
3.6. Visitantes florales asociados a los componentes de la fragancia floral de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	49
4. Discusión	51
5. Conclusiones	55
Referencias Bibliográficas	57
Apendices	66

Lista de Tabla

	pág.
Tabla 1. Visitantes florales y polinizadores reportados en <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	19
Tabla 2. Compuestos volátiles florales y polinizadores de plantas superiores.....	20
Tabla 3. Compuestos de la fragancia floral encontrados en más de la mitad de las familias de plantas con semillas.....	21
Tabla 4. Compuestos volátiles de la fragancia floral de <i>Passiflora</i> encontrados por Montero <i>et al.</i> (2016), y que son posibles atrayentes de visitantes florales (Hymenoptera) de diferentes especies de plantas.....	25
Tabla 5. Hora del día en la que iniciaron las extracciones de los COV de las flores en distintas fases florales.	33
Tabla 6. Porcentaje de visitantes en diferentes fases de la flor.....	41
Tabla 7. Índices de retención lineales y composición de COV en la fragancia de cinco flores en diferentes fases de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	45
Tabla 8. Compuestos orgánicos volátiles encontrados <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> y en otras especies de <i>Passiflora</i> , reportadas en los trabajos de Varassin <i>et al.</i> (2000) y Montero <i>et al.</i> (2016).....	55

Lista de Figuras

	pág.
Figura 1. Contribución de diferentes grupos de insectos a las visitas de flores en 37 estudios de cultivos	16
Figura 2. Disposición de las estructuras reproductivas durante el periodo de floración de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	18
Figura 3. Cultivo experimental de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> en el campus de la Universidad Industrial de Santander.....	28
Figura 4. Fases de la flor de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> asignadas para la investigación	29
Figura 5. Captura directa de los visitantes florales (Hymenoptera).....	30
Figura 6. Blancos de la fibra (CAR/PDMS) y del recipiente de acrílico y equipo para el análisis de los COV.....	33
Figura 7. Montaje para de extracción de COV en las diferentes fases de la flor (SPME <i>in vivo</i>)	34
Figura 8. Esquema general del análisis estadístico del estudio	37
Figura 9. Esquema general de tratamiento de datos para el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman.....	38
Figura 10. Visitantes florales (Hymenoptera) de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	41
Figura 11. Número de visitantes florales observados en flores en diferentes fases.....	42
Figura 12. Porcentaje de flores en antesis y porcentaje de abejas visitantes en función de la hora día.....	43

Figura 13. Individuos de la especie <i>Trigona angustula</i> registrados por observación en función de la hora del día.....	43
Figura 14. Perfiles cromatográficos típicos de los COV encontrados en la fragancia de flores en diferentes fases.....	47
Figura 15. Compuestos orgánicos volátiles identificados y cuantificados en la fragancia de las cinco flores en diferente fase (<i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>).....	49
Figura 16. Variables ambientales registradas durante el experimento.....	49
Figura 17. Promedio de la cantidad relativa de componentes de la fragancia floral (COV) y promedio de visitantes de (<i>T. angustula</i>) en las diferentes fases de la flor de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	50

Lista de Apéndices

	pág.
Apéndice A. Tabla para registro de los himenópteros en diferentes fases de la flor de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	69
Apéndice B. Pruebas de Normalidad y Homogeneidad de varianza en los registros de los.	70

Resumen

TITULO: VISITANTES FLORALES DEL ORDEN HYMENOPTERA Y SU ASOCIACIÓN CON LA FRAGANCIA DE LAS FLORES DE *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener (Passifloraceae).

AUTOR: LUIS ALFONSO ROMERO PARRA

PALABRAS CLAVES: Cultivo experimental, fases florales, *Trigona*, *Xylocopa*, microextracción en fase sólida, compuestos orgánicos volátiles.

DESCRIPCIÓN

La fragancia de las flores se ha involucrado en la atracción de los visitantes florales. En la presente investigación, se evaluó la asociación entre los visitantes florales del orden Hymenoptera y los componentes de la fragancia de las flores de *P. edulis* f. *flavicarpa*. Para su desarrollo, se dispuso de un cultivo experimental de maracuyá en el campus de la Universidad Industrial de Santander; allí, se seleccionaron muestras de flores en diferentes fases (botón floral, flor abierta y flor senescente); se identificaron visitantes florales y compuestos orgánicos volátiles (COV) de la fragancia floral. Los COV se aislaron por microextracción en fase sólida (SPME) en modo de espacio de cabeza *in-vivo*, mientras que la identificación de los componentes se basó en la interpretación de sus espectros de masas y comparación de los índices de retención lineales con los reportados en literatura. La asociación entre visitantes florales y cantidad relativa de los componentes de la fragancia mediante un análisis de correlación (Spearman). Se identificaron las especies de *Trigona angustula* y *Xylocopa* sp. como los visitantes frecuentes de las flores de maracuyá; la cantidad de visitantes de la especie *T. angustula* fue mayor en la fase de flor abierta (85%), mientras que el número de visitantes de *Xylocopa* sp. fue bajo (8%), durante esta fase. Se detectaron 39 compuestos en la fragancia de las flores (> 0,1%). Durante la fase de flor abierta (anthesis), se encontró mayor variedad y cantidad de compuestos. Los compuestos 1,4 dimetoxibenceno y alcohol bencílico fueron comunes en la fragancia de las flores abiertas, siendo el primero de estos, el componente mayoritario. Se observó que el número de visitantes de *T. angustula* estaba asociado con la cantidad relativa de compuestos presentes en la fragancia de las flores del maracuyá.

Abstract

TITLE: FLORAL VISITORS OF THE HYMENOPTERA ORDER AND THEIR ASSOCIATION WITH THE *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener (Passifloraceae) FLOWER SCENT.

AUTHOR: LUIS ALFONSO ROMERO PARRA

KEY WORDS: Experimental crop, phases flower, *Trigona*, *Xylocopa*, solid-phase microextraction volatile organic compounds.

DESCRIPTION

Passiflora edulis f. *flavicarpa* Degener (Passion Fruit) is a plant dependent on cross-pollination for the formation of its fruits. Its flower's scent is involved in the attraction of potential pollinators (floral visitors). This research evaluated the association between the floral visitors of the order Hymenoptera and *P. edulis* f. *flavicarpa* flowers scents, was estimated through correlation analysis (Spearman). An experimental crop of passion fruit was used located Universidad Industrial de Santander campus type of. There flower samples at different phases (floral button, open flower and senescent flower), were selected, and for each of them, floral visitors as well as volatile organic compounds (VOC) of floral scent were identified. The VOCs were isolated by solid-phase microextraction (SPME) in *in-vivo* head space mode. The identification of the compounds was based on the mass spectra interpretation and comparison of the linear retention indices with those reported in literature. The association among floral visitors and the relative amount of the floral scent components. The Hymenoptera species *Trigona angustula* (89.56%) and *Xylocopa* sp. (7.74%) were identified as the most frequent visitors of the passion fruit flower. The number of visitors corresponding to the *T. angustula* species was higher during the open flower phase (85%), while the number of *Xylocopa* sp visitors was low (8%), in the same phase. 39 compounds were detected in the passion fruit flower scent. A higher variety and number of compounds were found at the open flower phase. The compounds 1,4-dimethoxybenzene and benzyl alcohol were frequent in the open flowers fragrance, being, the first one, the main compound of the flower scent. It was observed that the number of *T. angustula* visitors is associated to the total relative amount of compounds present in the passion fruit's scent.

Introducción

Las flores de las plantas emiten fragancias que están constituidas por diferentes compuestos orgánicos volátiles (COV) (Knudsen *et al.*, 2006), su principal función es la de actuar como mecanismo de atracción para polinizadores específicos (Dudareva *et al.*, 2004; Dudareva y Pichersky, 2006; Harborne, 2001).

Passiflora edulis f. *flavicarpa* (Passifloraceae) comúnmente conocida como maracuyá es una planta con flores perfectas (hermafroditas) con alto grado de autoincompatibilidad genética, condición que la hace dependiente de la polinización cruzada para la producción de sus frutos (Akamine y Girolami, 1959; Suassuna *et al.*, 2003). Entre las características florales para compensar esta condición y atraer a los insectos polinizadores se encuentran el gran tamaño de la flor, sus colores vistosos, abundante néctar y fuerte fragancia floral (Corbet y Willmer, 1980; Siqueira *et al.*, 2009), siendo este último de gran interés para el presente estudio. La polinización natural del maracuyá es realizada principalmente por grandes abejas del género *Xylocopa* spp. conocidas comúnmente como abejorros (Corbet y Willmer, 1980; Ramírez, 2006; Calle *et al.*, 2010).

Los cultivos del maracuyá son de gran interés económico debido a la comercialización de sus frutos (Agronet, 2012). Los principales productores de esta fruta, a nivel mundial, son Brasil, Ecuador, Colombia y Perú, con aproximadamente 805,000 t/año (Passionfruit, 2011), de las cuales Colombia aporta aproximadamente un 10% de dicha producción (Agronet, 2012). En Colombia, algunos productores de maracuyá aplican la polinización manual, para complementar la polinización natural realizada por las abejas (*Xylocopa* sp.), aunque en algunos departamentos

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

como, por ejemplo, en Huila, la polinización de los cultivos depende exclusivamente de estos insectos (Calle *et al.*, 2010).

Si bien *P. edulis* f. *flavicarpa* ha sido documentada por varios autores, donde han concluido que es una planta de fragancia intensa, con autoincompatibilidad genética y dependiente de la polinización cruzada (*Xylocopa* spp: Hymenoptera: Apoidea-Apidea), no hay estudios de los cambios en la composición de la fragancia floral durante el desarrollo de la flor y su asociación con los visitantes florales.

El objetivo de la presente investigación fue se estimar el grado de asociación entre visitantes florales del orden Hymenoptera y los componentes de la fragancia floral de *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener. Para ello se requirió de identificar y cuantificar los visitantes florales (Hymenoptera) durante diferentes fases de la flor de *P. edulis* f. *flavicarpa* (botón floral, flor abierta y flor senescente), además, identificar y cuantificar los componentes de la fragancia de las flores de *P. edulis* f. *flavicarpa* en las diferentes fases, y finalmente, asociar los visitantes florales del orden Hymenoptera y los componentes de la fragancia de *P. edulis* f. *flavicarpa* mediante análisis de correlación de Spearman (Zar, 1998).

La investigación constituye una base para posteriores estudios, en los cuales se evalúe las respuestas de visitantes florales (Hymenoptera) a componentes específicos de la fragancia de *P. edulis* f. *flavicarpa*, en condiciones controladas. Además, los resultados de este trabajo pueden ser útiles para futuras aplicaciones que sirvan para atraer a potenciales polinizadores de cultivos de maracuyá con interés comercial.

1. Marco Teórico

Se ha estimado que más del 90% de las angiospermas dependen de la polinización por animales (Kearns *et al.*, 1998), siendo aproximadamente un tercio de los alimentos consumidos por el hombre derivados de las plantas con la polinización cruzada, que es efectuada generalmente por visitantes que pertenecen al orden Hymenoptera (Figura 1) (McGregor, 1979; Klein *et al.*, 2007, Rader *et al.*, 2016). Para medir el éxito o el rendimiento de diferentes visitantes flores en lograr la polinización y consiguiente la formación del conjunto de semillas, se debe tener en cuenta la 'frecuencia' y 'efectividad' de las visitas florales, el primero estima la deposición del polen en el estigma y los parámetros subyacentes del comportamiento del polinizador, como la frecuencia, de visitas, mientras que el segundo estima la contribución del polinizador al éxito reproductivo de las plantas, por ejemplo en términos de conjunto de semillas (Ne'eman *et al.*, 2010). En este trabajo solo se evaluó la frecuencia de visitantes, que es el número de visitantes por flor, con el fin de observar si hay relación con la emisión de la fragancia floral en diferentes fases.

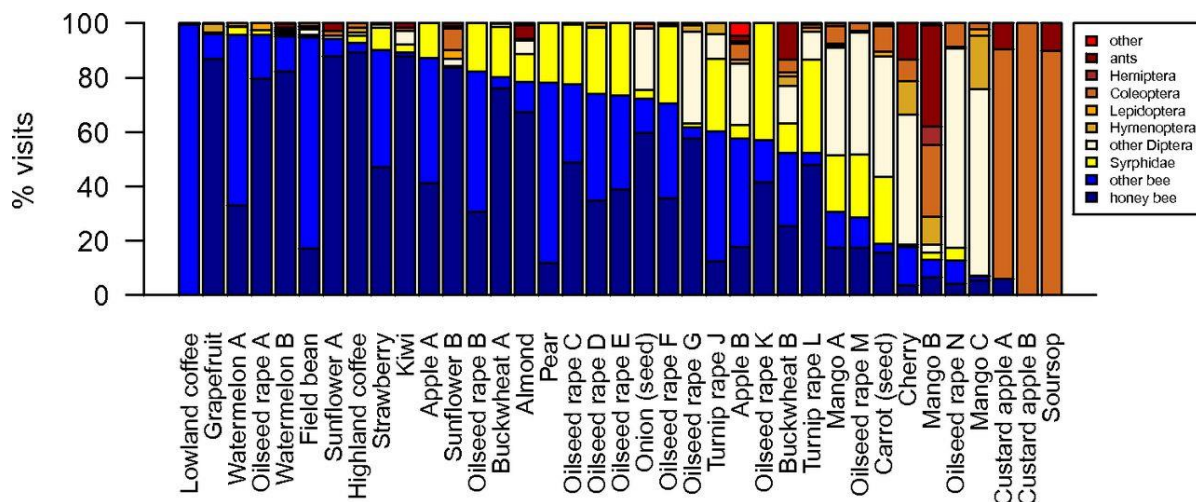


Figura 1. Contribución de diferentes grupos de insectos a las visitas de flores en 37 estudios de cultivos, Tomado de Rader *et al.* (2016).

1.1. Familia Passifloraceae

La familia Passifloraceae se encuentra distribuida en áreas tropicales; hasta el año 2016, se habían hecho 738 registros en la base de datos del GBIF (Infraestructura Mundial de Información en Biodiversidad). Solamente para el Neotrópico se han registrado 650 especies incluidas en cuatro géneros que son *Ancistrithyrus*, *Dilkea*, *Mitostemma* y *Passiflora* (Ulmer y MacDougal, 2004). El género *Passiflora* se representa por 575 especies (Ocampo *et al.*, 2007), de las cuales el 81% se encuentran en la región andina de Colombia, país donde se concentra la mayor diversidad genérica (Ocampo *et al.*, 2010).

1.1.1. *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener. La especie *Passiflora edulis*, consiste de dos variedades que son *P. edulis* f. *edulis* (gulupa) y *P. edulis* f. *flavicarpa* (maracuyá), esta última considerada una mutación o híbrido natural de la variedad gulupa (Akamine y Girolami, 1959). La planta de maracuyá presenta hábito trepador, hojas simples trilobadas, alternas, zarcillos axilares, flores blancas son perfectas, con una franja purpura que mide aproximadamente 5 cm de diámetro, sépalos alargados, pétalos obtusos de color blanco, corona filamentosa, ovario voluminoso (Akamine y Girolami, 1959; Corbet y Willmer, 1980; Deginani, 2001). El néctar se produce en la base del androginóforo, es abundante, su concentración es constante en la mayor parte del día, sus principales componentes son sacarosa, glucosa y fructosa (Corbet y Willmer, 1980). Según Vuillaume (1991), la floración del maracuyá depende de las condiciones ambientales, principalmente de la lluvia; en los llanos orientales de Villavicencio, la floración del maracuyá, ocurre entre los meses de mayo y agosto (Cárdenas, 2005).

Las flores *P. edulis* f. *flavicarpa* presentan alto grado de autoincompatibilidad genética, mecanismo que permite la inactivación de su propio polen (Akamine y Girolami, 1959; Suassuna

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

et al., 2003). Según Suassuna *et al.* (2003), esta condición es controlada por genes esporofíticos que actúan en asociación con genes gametofíticos. La antesis de las flores es rápida y sincronizada (3 min aproximadamente de duración), iniciándose entre las 12:00 y las 15:00 horas, las flores permanecen abiertas hasta ocho horas, si no hay polinización, se marchitan y se caen (Akamine y Girolami, 1959; Corbet y Willmer, 1980; Kishore *et al.*, 2010). Durante la primera hora, los estilos permanecen erectos formando un ángulo de 90^0 respecto al plano de la corona (Figura 2A), en las dos horas siguientes, se van curvando quedando en posición paralela a la corona y al mismo nivel de las anteras (Figura 2B), la sincronía entre estructuras reproductivas permite la polinización cruzada (Corbet y Willmer, 1980; Kishore *et al.*, 2010).



Figura 2. Disposición de las estructuras reproductivas durante el periodo de floración de *P. edulis f. flavicarpa*. A. Estilos erectos y anteras dehiscentes; B. Estilos curvos con estigmas al mismo nivel de las anteras; C. Estilos totalmente curvos con el polinizador de la flor del maracuyá (*Xylocopa* spp.). Lugar: Cultivo experimental de *P. edulis f. flavicarpa* (Fotografía: Luis Romero, 2016).

1.1.2. *Passiflora edulis f. flavicarpa* y sus visitantes florales (Hymenoptera). Varios estudios han reportado que las flores de *P. edulis f. flavicarpa* puede ser visitadas ocasionalmente por abejas como *Eulaema nigrita* Lepeletier, *E. cingulata* Fabricius, *Apis mellifera* Linnaeus, *A. cerana* Fabricius, *Polistes cinctus*, Lepeletier (Tabla 1), pero la polinización es efectuada generalmente por especies del género *Xylocopa* sp. (Figura 2C,), conocidas comúnmente abejas carpinteras (Calle *et al.*, 2010; Corbet y Willmer, 1980; Ramírez, 2006). El gran tamaño de estas abejas permite la

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

adhesión del polen a su dorso durante la primera hora de antesis, siendo este transportado al estigma ya curvo de otras flores (Arias *et al.*, 2014; Corbet y Willmer, 1980; Kishore *et al.*, 2010). Las especies de *Xylocopa* pueden alcanzar hasta 45 mm de largo, presentan un dorso desprovisto de pelos (Figura 2C), y el número de individuos producidos por una hembra puede variar entre dos a ocho (González y González, 2009).

Tabla 1.

Visitantes florales y polinizadores reportados en Passiflora edulis f. flavicarpa.

Visitante floral ocasional	Polinizador	Referencia
Apis mellifera L.	Xylocopa varipunta	Akamine y Girolami., 1959
Polistes cinctus	X. mordax	Corbet y Willmer., 1980
	Xylocopa spp.	Da Silva <i>et al.</i> , 1999
Eulaema nigrita, E. cingulata	X. frontalis, X. ordinaria	Hoffmann., 2000
A. mellifera	X. frontalis	Freitas y Oliveira., 2003
A. mellifera, Trigona spinipes	X. griseipes, X. frontalis	De Siqueira <i>et al.</i> , 2009
A. mellifera, A. cerana	Xylocopa spp.	Kishore <i>et al.</i> , 2010
A. mellifera, Trigona spp.	Xylocopa spp.	Calle <i>et al.</i> , 2010
	Xylocopa spp.	Arias <i>et al.</i> , 2014

Estudios sobre la polinización del maracuyá han mostrado variaciones en la frecuencia de visita de *Xylocopa* spp. en función de la hora del día, siendo el mayor número de visitas entre las 14:00 y las 15:00 horas (Corbet y Willmer, 1980; Da Silva, 1999; Kishore *et al.*, 2010). Se ha observado que las visitas de *Xylocopa* spp. presentan un comportamiento cuadrático entre 13:00 y las 17:00 horas, aumentando su densidad en función del número de flores y reduciéndose con el aumento de la temperatura (superior a 26 °C) y de la humedad relativa del aire de 55 a 80%, mientras que el aumento de la insolación produce el efecto contrario (Da Silva, 1999).

1.2. Compuestos orgánicos volátiles de la fragancia de las flores

Las plantas son organismos sin capacidad locomotora, que producen diferentes compuestos orgánicos volátiles (COV), en sus flores, hojas, frutos y raíz, con el fin de generar redes de interacción con implicaciones ecológicas, fisiológicas y atmosféricas (Dudareva *et al.*, 2006; Holopainen, 2004; Peñuelas y Llusà, 2001). Los COV emitidos de las partes vegetativas, se han vinculados a la defensa contra herbívoros, patógenos, radiación solar, entre otros; mientras que los compuestos emitidos por las flores, pueden actuar como atrayentes para polinizadores específicos (Tabla 2) (Harborne, 2001; Pichersky & Gershenzon, 2002).

Tabla 2.

Compuestos volátiles florales y polinizadores de plantas superiores.

Compuesto volátil floral	Especie de planta	Polinizador
Geraniol, citral, farnesol, etc.	Ophrys spp.	Hymenoptera
Óxido de carvona.	Catsetum maculatum	Hymenoptera
Linalool y sus óxidos.	Daphne mezereum	Hymenoptera
Antranilato de metilo e isoeugenol.	Cimifuga simplex	Lepidóptera
Bezoato de metilo, linalool y geraniol.	Platanthera chlorantha	Lepidóptera
<i>trans</i> -Ocimeno y 1,8-cineol.	Brugmansia candida	Lepidóptera
Indol, 1,2,4-trimetoxibenceno, etc.	Cucurbita spp.	Coleóptera
2-Heptanona, indol, germacrenos.	Arum maculatum	Díptera

Nota: Modificado de Harborne (2001).

Los COV de las flores son sustancias de bajo peso molecular, que se evaporan a temperatura ambiente (Dudareva y Negre, 2005; Pichersky *et al.*, 2006). La composición de la fragancia floral varía ampliamente entre especies, en cantidad, número de componentes, tejidos, tiempo y hora de emisión (Dudareva *et al.*, 2004; Matile y Altenburger, 1988; Tholl *et al.*, 2006). La cantidad relativa de compuestos volátiles emitidos por las flores puede variar entre 1 a 100 compuestos, pero, en la mayoría de las especies de plantas, cambia de 20 a 60 compuestos diferentes; los compuestos volátiles son clasificados como derivados de ácidos grasos, benzenoides e

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

isoprenoides o terpenos, donde los compuestos volátiles como el limoneno y el β -ocimeno y son los que se encuentran en mayor proporción, seguidos del mirceno, linalool, α -pineno, β -pineno, benzaldehído, salicilato de metilo, alcohol bencílico, *trans*- β -cariofileno (Knudsen *et al.*, 1993; Knudsen *et al.*, 2006). Los principales compuestos de las fragancias florales de las plantas con semillas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3.

Compuestos de las fragancias florales encontrados en más de la mitad de las familias de plantas con semillas.

Compuestos volátiles	Emisión, %
Limoneno	71
<i>trans</i> - β -Ocimeno	71
β -Mirceno	70
Linalool	70
α -Pineno	67
Benzaldehído	64
β -Pineno	59
1, 2-Hidroxibenzoato de metilo	57
Alcohol bencílico	56
2-Feniletanol	54
<i>trans</i> - β -Cariofileno	52

1.2.1. Emisión y regulación de compuestos orgánicos volátiles

Los COV son almacenados y emitidos a través de las flores, frutos, hojas, tallo y raíz (Muller *et al.*, 1997; Steeghs *et al.*, 2004). Las fragancias de las flores se sintetizan, principalmente, en la capa epidérmica, predominantemente, en los pétalos, seguido de los estambres, polen y gineceo (Flamini *et al.*, 2003; Schuurink *et al.*, 2006; van Schie *et al.*, 2006). La emisión ocurre principalmente en los primeros estados de desarrollo de la flor, que puede ser máxima y

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

característica durante la antesis (expansión de las flores) y mínima en su marchitamiento (Schade *et al.*, 2001; Schuurink *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 2014).

Los factores que influyen en la biosíntesis de COV pueden ser de tipo genético y bioquímico, estos hacen que la emisión sea altamente específica y regida por el desarrollo de la planta (Dudareva *et al.*, 2004; Dudareva y Negre, 2005; Peñuelas y Llusà, 2001). Los factores externos como la humedad del suelo, la temperatura, disponibilidad de sustrato, luz y tasa de herbivoría pueden inducir cambios significativos en los patrones de emisión de compuestos volátiles (De Moraes *et al.*, 2001; Gouinguene y Turlings, 2007; Peñuelas y Llusà, 2001).

1.2.2. Técnica de microextracción en fase sólida y análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La técnica de microextracción en fase sólida (SPME) fue introducida por Arthur y Pawliszyn en 1990. Se basa en la extracción y concentración de analitos en un solo paso sobre un polímero que recubre la fibra, para su posterior desorción, separación y análisis mediante cromatografía de gases (Arthur y Pawliszyn, 1990). Existen tres formas de extracción en SPME: el modo directo, cuando la fibra se introduce en la muestra; el modo de espacio de cabeza (HS), cuando la fibra no hace contacto directo sobre la muestra; y el modo con membrana protectora, la fibra es separada de la muestra por una membrana selectiva, que permite solo el paso de analitos con bajo peso molecular. Esta técnica se caracteriza por su simplicidad, no implica contacto directo con la muestra, la etapa de extracción es más rápida y no requiere la utilización de solventes (Li *et al.*, 2006; Stashenko y Martínez, 2007).

Los principales parámetros en la extracción de COV por HS-SPME: el tipo de recubrimiento de la fibra, su polaridad y grosor; la cantidad de la muestra, el tiempo de extracción y adsorción,

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

volumen del espacio de cabeza y el tiempo de desorción (Arthur y Pawliszyn, 1990; Stashenko *et al.*, 2004; Tholl *et al.*, 2006).

La técnica de HS-SPME se fundamenta en la extracción y adsorción de los analitos de la muestra por el recubrimiento polimérico de la fibra. El proceso inicia cuando la muestra está dentro del espacio de cabeza (recipiente), hasta que la matriz alcance el equilibrio termodinámico, posteriormente, la fibra se introduce en el recipiente para realizar la adsorción de los analitos a temperatura determinada. Finalmente, la fibra con los analitos adsorbidos se lleva al puerto inyector del cromatógrafo acoplado a un espectrómetro de masas (Li *et al.*, 2006; Ouyang *et al.*, 2005; Shang *et al.*, 2002).

Para su análisis, la extracción de COV de las flores se realiza generalmente de muestras cortadas de las plantas, donde se obtienen grandes concentraciones de compuestos volátiles; una de las limitaciones de esta forma de muestreo es que se pueden generar compuestos nuevos debido a las heridas que sufre la planta, posiblemente, debido a su mecanismo de defensa. Para evitar esta posible emisión de compuestos, las extracciones se realizan de flores intactas (*in vivo*) (Montero *et al.*, 2016; Twidle *et al.*, 2015).

La separación e identificación de compuestos volátiles se realiza mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), la cual se usa comúnmente para el estudio de las fragancias florales y otras matrices gaseosas, ya que presenta una buena separación, sensibilidad, y la capacidad de identificación con base en espectros de masas, el proceso consiste en la desorción de los compuestos de la fibra SPME, la identificación se realiza mediante comparación de los espectros de masas con los de las bases de datos (Adams; NIST y Wiley) y la comparación de los índices de retención lineales (IRL) con los reportados en literatura especializada (Bicchi *et al.*, 2000; Shang *et al.*, 2002; Stashenko *et al.*, 2013).

1.2.3. Emisión de compuestos orgánicos volátiles en flores de *Passiflora*. Los componentes de la fragancia de las flores de *Passiflora* solo se ha estudiado por Varassin *et al.* (2000) y Montero *et al.* (2016), en el primer estudio mediante extracción con disolvente se aislaron compuestos volátiles de varias especies de *Passiflora*, siendo los alcoholes y benzenoides los compuestos más representativos en las plantas que fueron polinizadas por abejas y murciélagos (*P. alata*, *P. galbana*, y *P. mucronata*), respecto a las plantas que fueron polinizadas por colibríes (*P. speciosa*), dejando claro que en las plantas con mayor emisión de compuestos la interacción se da principalmente con animales de sentido olfativo agudo. En el segundo trabajo que fue realizado por Montero *et al.* (2016), se estudiaron la composición química de la fragancia floral de cinco especies de *Passiflora*, incluyendo a *P. edulis* Sim, (cinco muestras de flores por cada especie), utilizando la técnica de extracción en espacio de cabeza dinámico (*in vivo*) y análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (D-HS/GC-MS), reportaron mayoritariamente linalool, para *P. alata*; geraniol, para *P. quadrangularis*; benzaldehído, para *P. cincinnata*; 2-metil-3-pentanona, para *P. coccinea*; para *P. edulis* se identificaron 24 compuestos de la fragancia de las flores, destacándose del grupo de los benzenoides, el compuesto 1,4-dimetoxibenceno fue el compuesto mayoritario (44,7%) (Montero *et al.*, 2016).

En la Tabla 4, se muestra la información recopilada sobre los compuestos volátiles encontrados en la fragancia de algunas especies de *Passiflora*, y que han sido reportados como atractivos para himenópteros polinizadores en diferentes plantas, también se incluyen investigaciones de cambio de comportamiento por la aplicación de estímulos por compuestos flores en cebos o directamente sobre las antenas cortadas y registradas por electroantenografía (GC-EAD).

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

Tabla 4.

Compuestos volátiles de la fragancia floral de Passiflora encontrados por Montero et al. (2016), y que son posibles atrayentes de visitantes florales (Hymenoptera) de diferentes especies de plantas, y aquellos compuestos que generan respuesta en sus antenas.

Fuente de búsqueda: Elsevier Scopus, no se especificó fecha límite de búsqueda. Ecuación de búsqueda: Title:-ABS (Compuesto x) AND FLOWER) AND HYMENOPTERA.

Fuente de emisión de la fragancia de floral	Compuestos	Hymenoptera	Referencias
<i>Anacamptis coriophora</i> R.	1,4-Dimetoxibenceno ^b	<i>Apis mellifera</i> , <i>Bombus terrestris</i> <i>Formica lemni</i>	Salzmann <i>et al.</i> , 2007
<i>Chamorchis alpina</i> R.	Linalool ^a β -Cariofileno ^a		Schiestl <i>et al.</i> , 2012
<i>Cypripedium calceolus</i> L.	Linalool ^{a,b} Alcohol bencílico ^{a,b}	<i>Lasioglossum</i> spp. <i>Andrena</i> spp.	Braunschmid <i>et al.</i> , 2017
<i>Cyphomandra endopogon</i> B. (var. <i>Endopogon</i>)	Ocimeno ^a	<i>Eufriesea convexa</i> ♂ <i>E. elegans</i> ♂	Gracie, 1993
<i>Catasetum cernuum</i> L. <i>Gongora bufonia</i> L.	β -Ocimeno ^a	<i>Eufriesea violácea</i> ♂	Nunes <i>et al.</i> , 2016
<i>Gongora</i> spp. (23 especies)	<i>cis</i> -Cinnamato de metilo ^a Alcohol bencílico ^a <i>trans</i> -Isoeugenol ^a Dimetoxibenceno ^a Benzaldehído ^a Linalool β -Ocimeno	Euglossine ♂	Hetherington y Ramirez, 2016
<i>Echium vulgare</i> L.	<i>trans</i> -Cariofileno Alcohol bencílico	<i>Hoplitis adunca</i> ♀	Filella <i>et al.</i> , 2011
<i>Fragaria x ananassa</i> D.	Benzaldehído ^{a,b} Ocimeno Alcohol bencílico	<i>Osmia bicornis</i> L. ♀	Klatt <i>et al.</i> , 2013
<i>Medicago sativa</i> L.	<i>trans</i> - β -Ocimeno ^a <i>cis</i> - β -Ocimeno ^a	<i>Apis mellifera</i>	Pecetti <i>et al.</i> , 2002
<i>Mimulus lewisii</i> P.	β -Ocimeno ^a	<i>Bombus impatiens</i>	Byers <i>et al.</i> , 2014
<i>Monotropastrum humile</i> D.	Linalool ^b	<i>Bombus diversus</i>	Kubo <i>et al.</i> , 2014
<i>Salix</i> spp.	1,4-Dimetoxibenceno ^b	<i>Andrena vaga</i> ♀	Burger <i>et al.</i> , 2013
<i>Salix caprea</i> L.	1,4-Dimetoxibenceno ^{a,b}	<i>Apis mellifera</i>	Jürgens <i>et al.</i> , 2014
<i>Salix fragilis</i> L.	1,4-Dimetoxibenceno ^b	<i>Pontania próxima</i> ♀	Kehl <i>et al.</i> , 2010
<i>S. x rubens</i> S.	β -Cariofileno ^b		
<i>Salix caprea</i> L.	1,4-Dimetoxibenceno ^b	<i>Andrena vaga</i> ♀	Dötterl <i>et al.</i> , 2005
<i>S. atrocinnerea</i> B.			
<i>Stanhopea insignis</i>	Alcohol bencílico ^{a,b}	<i>Eufriesea purpurata</i> ♂	Pansarin <i>et al.</i> , 2009
Fragancia floral típica de plantas oleaginosas	Linalool ^b Alcohol bencílico ^b	<i>Apis mellifera</i>	Wadhams <i>et al.</i> , 1994

a: Compuestos atrayentes de himenópteros.

b: Compuestos que produce respuesta en antenas de himenópteros (GC-EAD).

♀ o ♂: Himenóptero hembra o macho que responde al compuesto.

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

El estudio de la composición de la fragancia de las flores de *P. edulis* f. *flavicarpa* (maracuyá), puede ser útil en la creación de estrategias que permitan aumentar la frecuencia de visitas de sus potenciales polinizadores y, por lo tanto, aumentar la producción de los frutos. En este trabajo se identificaron y cuantificaron los visitantes florales (Hymenoptera) y los compuestos orgánicos volátiles de la fragancia de las flores de *P. edulis* f. *flavicarpa*, en tres fases de la flor, por último, se asoció el número de visitantes florales con los componentes de la fragancia del maracuyá.

2. Materiales Y Métodos

La investigación se efectuó el campus de la Universidad Industrial de Santander (UIS), durante los años 2015 y 2017. Los muestreos de los visitantes florales y de los componentes de la fragancia floral de *P. edulis* f. *flavicarpa* se realizaron en un cultivo experimental de maracuyá (7°08'30.18N"-73°07'03.91" O, 988 m.s.n.m.), durante el primer periodo de floración (julio-octubre, 2016); la identificación de los visitantes se realizó en el Laboratorio de Entomología adscrito a la Escuela de Biología, y la identificación de los componentes de la fragancia floral en Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas CROM-MASS, CENIVAM, UIS.

2.1. Establecimiento del cultivo experimental de *P. edulis* f. *flavicarpa*

Para el desarrollo de la investigación, se instaló un cultivo experimental de maracuyá dentro del campus de la universidad. El diseño del cultivo fue tipo espaldera sencilla (Jaramillo *et al.*, 2008), donde se dispuso de 39 plantas numeradas y distribuidas en siete filas (Figura 3A y 3B). Las 39 plantas se obtuvieron a partir de semillas germinadas en recipientes plásticos, estos contenían una mezcla de abono y arena en la misma proporción, posteriormente las plántulas se trasplantaron al cultivo experimental, allí, el riego para cada plántula fue de uno o dos días por semana (6:00 a 8:00 o 17:00 a 18:00). El muestreo de visitantes florales o fragancia floral se suspendía durante las lluvias. En el cultivo no se aplicaron plaguicidas, evitando afectar la interacción entre los Hymenoptera con las plantas.

A.



B.

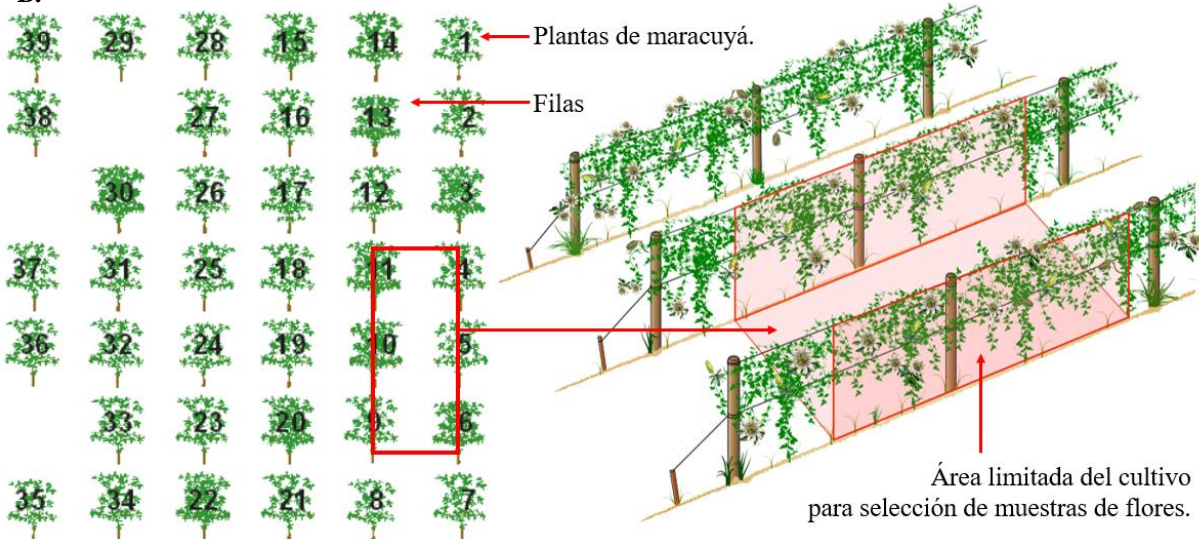


Figura 3. Cultivo experimental de *P. edulis* f. *flavicarpa* en el campus de la Universidad Industrial de Santander. A. Diseño del cultivo tipo espaldera sencilla (Fotografía: Luis Romero, 2016); B. Área limitada para realizar muestreos. Bucaramanga (Santander-Colombia).

2.2. Las fases de la flor de *P. edulis* f. *flavicarpa*

Para la investigación, se usaron tres fases florales de *P. edulis* f. *flavicarpa* con base en los cambios morfológicos evidenciados y establecidos previamente por Angel *et al.* (2011), las fases de la flor fueron “botón floral”, “flor abierta” y “flor senescente”.

Durante la fase del botón las estructuras reproductivas están totalmente cubiertas por el cáliz, los sépalos convergen hacia el eje de la flor tocándose solo por sus márgenes y con un leve desprendimiento, para el registro en esta fase solo se usaron flores que abrieron uno o dos días después, (Figura 4A); la fase de la flor abierta inicia con la apertura de la flor (antesis, 12:00 a 13:00), las estructuras reproductivas están expuestas al medio, la flor abierta puede durar hasta 8 horas (Figura. 4B); durante la fase de la flor senescente, los pétalos y sépalos están cerrados y presentan síntomas de marchitamiento, para la investigación solo se tuvo en cuenta las flores de un día después de la antesis (Figura 4C).



Figura 4. Fases de la flor de *P. edulis* f. *flavicarpa* asignadas para la investigación: A. Botón floral; B. Flor abierta; C. Flor senescente. Cultivo experimental de *P. edulis* f. *flavicarpa*. Fotografía: Luis Romero, 2016. Bucaramanga (Santander-Colombia).

2.3. Selección de flores para el muestreo de visitantes florales (Hymenoptera)

La selección de las muestras florales se realizó de forma aleatoria dentro de un área limitada del cultivo experimental. Dentro del área, se numeraron mínimo cinco y máximo nueve muestras de

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

flores en diferentes fases por día de muestreo (17 días de muestreos en total). Para la selección de las muestras, se tuvo en cuenta el hecho de que debían visualizarse sin necesidad de realizar largos desplazamientos, evitando el menor grado de interferencia con los visitantes florales. Se tomaron 79 muestras en fase de botón floral; 57 muestras, de flor abierta y 35 muestras, en flor senescente.

2.4. Identificación y cuantificación de los visitantes en cada fase floral

La identificación taxonómica de los visitantes florales se efectuó con individuos capturados en las muestras de flores seleccionadas. La captura se efectuó de forma directa, y utilizando recipientes plásticos, en horario de 12:00 a 17:00 (Figura 5); una vez capturados los individuos, se procedió a colocar en alcohol diluido al 70%, para su conservación. La identificación y conservación de los individuos capturados se llevó a cabo en el Laboratorio de Entomología; allí, se utilizó un estereoscopio y claves taxonómicas para la identificación de los himenópteros (González y González, 2009; Nates, 1990; Nates y Fernández, 1992), posteriormente se etiquetaron con el nombre de la especie, la fecha, lugar de la captura y nombre del investigador.

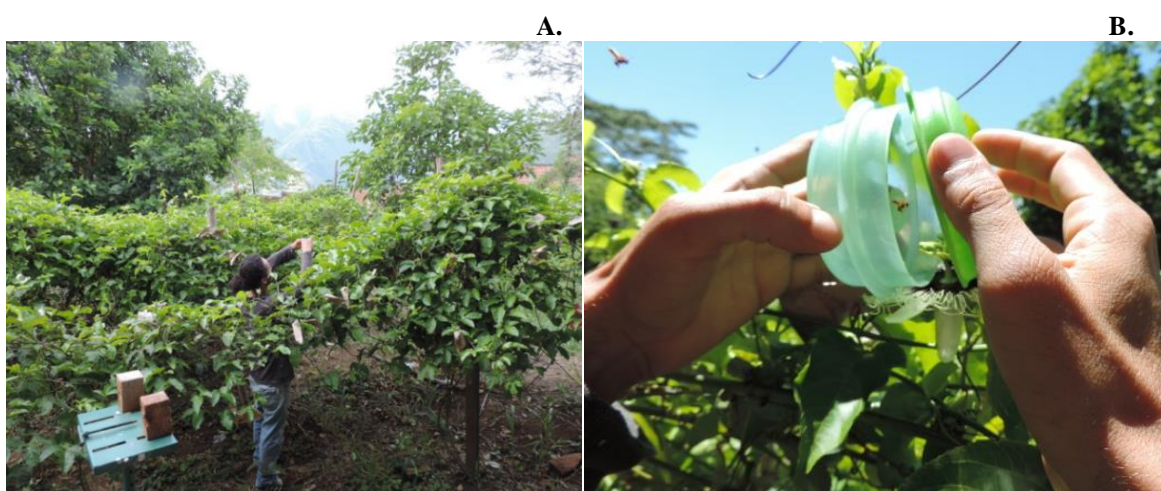


Figura 5. Captura de los visitantes florales. A. Cultivo experimental de *P. edulis* f. *flavicarpa*; B. Método de captura directa usando recipiente plástico (Fotografía: Luis Romero, 2016). Bucaramanga (Santander-Colombia).

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

La cuantificación de los visitantes florales se realizó durante el primer periodo de floración del cultivo experimental (julio-octubre, 2016), y consistió en el conteo de individuos observados sobre las flores seleccionadas, las observaciones se realizaron cada 20 min, entre las 12:00 y las 17:00 h; ya que es en este intervalo del día es cuando sucede la antesis floral (12:00 y 15:00), además, hay mayor actividad de los visitantes florales del maracuyá, incluyendo las de los polinizadores, según Akamine y Girolami (1959), Hoffmann, 2000 y Kishore *et al.* (2010). No se hicieron capturas de visitantes para la cuantificación, debido a que se podía generar emisiones por la manipulación de las flores o por el corte en alguno de sus tejidos, por lo que se optó por hacer observaciones directas evitando la menor interferencia con los visitantes florales. Durante el experimento, se mantuvo una bitácora de campo, donde se registraban las fechas de los muestreos, hora del registro, número de etiquetas de las muestras de flores, fase de la flor, especie de himenóptero y número de individuos por especie (Anexo 1). Se registraron datos de temperatura, humedad relativa, radiación, e índice UV, en función de la hora del día, datos proporcionados por la Estación Meteorología adscrita a la Escuela de Ingeniería Civil de la UIS, ubicada dentro del campus universitario.

2.5. Selección de las flores para extracción de la fragancia

La selección de las flores de *P. edulis* f. *flavicarpa* para el muestreo de los analitos se realizó en horas de la mañana (8:00 a 9:00). En total se escogieron cinco flores en fase de botón floral en distintos días de muestreo (las cinco flores se muestrearon en el mes de octubre del año 2016, los días fueron el 13, 18, 19 y el 20). Para la selección de las flores se tuvo en cuenta la presencia de signos evidentes de antesis, como la separación leve de los sépalos del eje de la flor, el fácil acceso a la muestra para instalación del equipo de SPME, además, la flor no debía presentar signos de deterioro o daños por patógenos.

2.6. Extracción, identificación y cuantificación de los componentes de la fragancia de flores en diferentes fases

La extracción de los COV se realizó, usando microextracción en fase sólida en espacio de cabeza (HS-SPME). El proceso se llevó a cabo directamente en la muestra floral, con el fin de reducir las alteraciones en las emisiones por el corte de tejido vegetal (Twidle *et al.*, 2015; Montero *et al.*, 2016).

Para la extracción de los COV se empleó una fibra para SPME compuesta de Carboxen/Poli (dimetil) siloxano (CAR/PDMS) de 85 μm de grosor, un recipiente de acrílico de 10 x 10 x 10 cm (espacio de cabeza), con orificio para insertar la fibra del dispositivo SPME y sistema de bisagra para abrir y cerrar. El recipiente se limpió con iso-propanol y se purgó con nitrógeno gaseoso antes de cada muestreo, se realizaron blancos de la fibra y del recipiente, que consistían en introducir la fibra en el recipiente durante 30 min, para su posterior desorción en el equipo de cromatografía (Figura 6).



Figura 6. Blancos de la fibra (CAR/PDMS) y del recipiente de acrílico. Equipo para el análisis de los COV: Cromatógrafo de gases: *Agilent Technologies GC 7890* (Palo alto, CA, EE.UU.), detector selectivo de masas: *Agilent Technologies 5973C* (Ionización por impacto de electrones, 70 eV). Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas CROM-MASS, CENIVAM, UIS-Bucaramanga-Santander. Fotografías: Luis Romero, 2016.

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

Antes de las extracciones de los COV en las diferentes fases de la flor, se expuso la fibra SPME al undecanoato de metilo durante 20 s (21 °C), que se usó como estándar interno (ISTD), posterior a esto, se llevó la fibra SPME con el estándar interno adsorbido al cultivo experimental.

La muestra seleccionada previamente (en fase botón floral) en el sitio del cultivo, se encerró en el recipiente de acrílico, evitando daños en el tejido vegetal. Se permitió un pre-equilibrio de 10 min. Se registraron la temperatura de la flor y la temperatura ambiente. Posteriormente, se expuso la fibra de SPME, para extraer los volátiles de la fragancia de la muestra durante 30 min. Después, la fibra se retiró y se llevó al laboratorio para el análisis por GC-MS, dejando instalado el montaje para las siguientes extracciones que se realizaron en la flor abierta (antesis, dos horas y media después de la antesis, y cinco horas después de la antesis), y en la fase de flor senescente (esta última extracción, se hizo la mañana del siguiente día). En todo el estudio, se realizaron 25 extracciones (Tabla 5). En la Figura 7, se muestra el montaje y el proceso de las extracciones en las distintas fases de las flores, siguiendo lo descrito por Stashenko *et al.* (2013).

Tabla 5.

Hora del día en la que iniciaron las extracciones de los COV de las flores en distintas fases florales.

Muestra	Hora y fase floral de cada extracción				
	Botón floral	Flor abierta			F. senescente*
		Antesis	2 ½ h	5 h	
Flor 1	10:50	12:55	15:30	18:00	08:30
Flor 2	10:30	13:28	16:00	18:30	08:40
Flor 3	10:50	13:40	16:10	18:40	09:20
Flor 4	11:00	13:07	15:40	18:10	09:40
Flor 5	11:30	13:25	16:40	18:00	10:00
Intervalos de horas	10:30-11:30	12:55-13:40	15:30-16:40	18:00-18:40	8:30 a 10:00

* Extracciones en la fase senescente realizadas la mañana del día siguiente a la antesis.

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

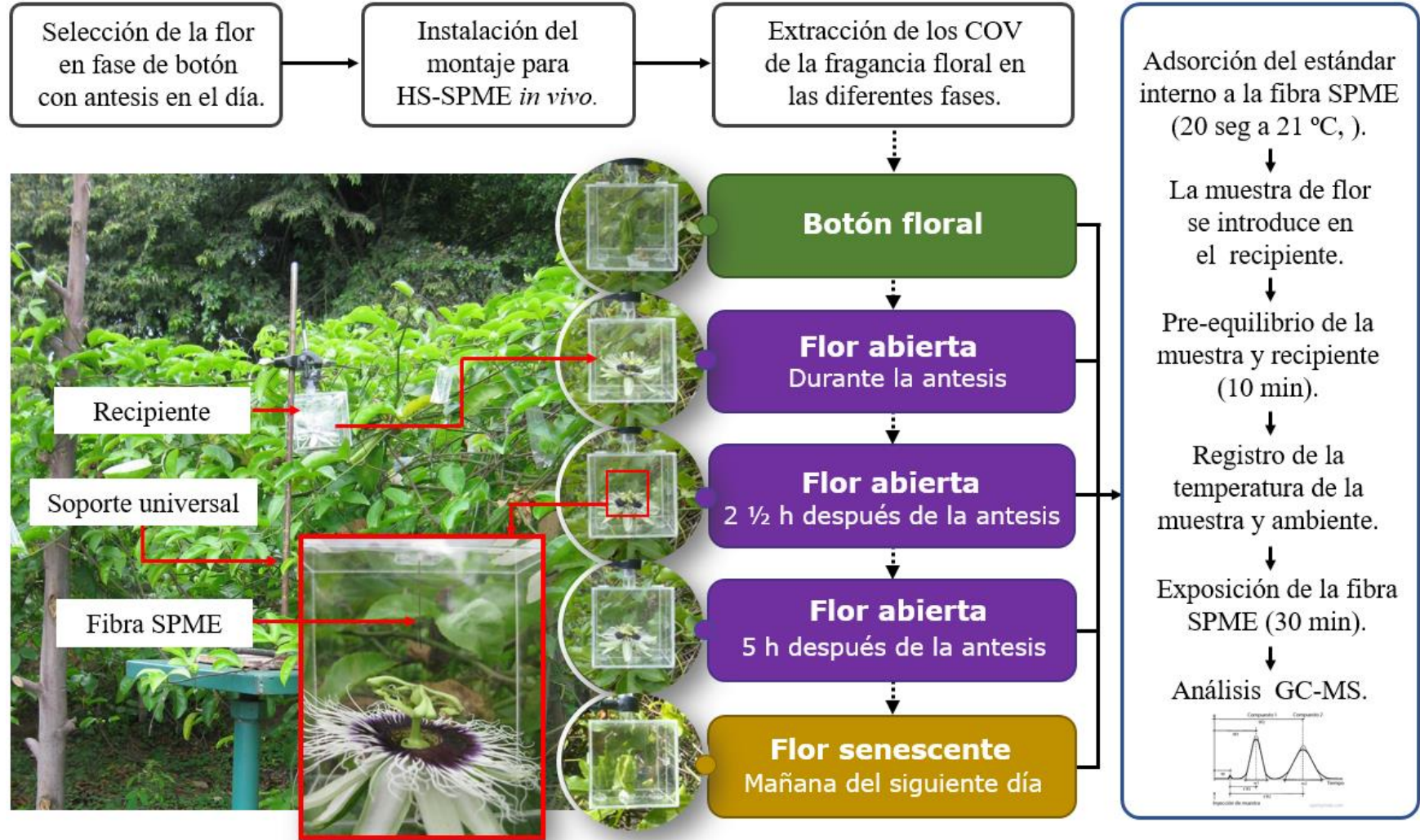


Figura 7. Montaje para la extracción de COV en las diferentes fases de la flor, SPME *in vivo*, (n=5). Cultivo experimental de *P. edulis* f. *flavicarpa* (Universidad Industrial de Santander- Colombia). Fotografía: Luis Romero, 2016.

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

El análisis de los COV se realizó en el Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas (CROM-MASS), adscrito a la Escuela de Química, siguiendo lo descrito por Stashenko *et al.*, (2013).

La fibra de SPME con los COV y el estándar interno, se desorbió en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases acoplado con un detector selectivo de masas [Agilent Technologies GC 7890 (Palo alto, CA, EE.UU.), detector selectivo de masas Agilent Technologies 5973C (Ionización por impacto de electrones, 70 eV)], con inyector *split/splitless*, operado en modo *splitless*, a 250 °C, se usó helio (99,9995%, fabricante: Linde, Bucaramanga, Colombia) como gas de arrastre, con velocidad lineal de 27 cm s⁻¹; sistema de datos-DA G1701 MS-ChemStation HP MS, que incluía bibliotecas espectrales de Wiley, NIST y Adams; la desorción en el puerto de inyección se efectuó durante 10 min; se usó una columna capilar DB-WAX (J & W Scientific Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m x 0,25 mm d.i. con recubrimiento de poli (etilenglicol) (PEG) de 0,25 µm; la temperatura del horno se programó desde 50 °C (5 min) hasta 150 °C (2 min) a 5 °C / min, luego, hasta 230 °C (10 min) a 5 °C / min; temperatura de la cámara de ionización fue de 230 °C; temperatura de la línea de transferencia de 230 °C; energía de electrones: 70 eV. Rango de masas: m/z 30-400. Se usaron estos parámetros operacionales para el análisis, según lo descrito por Stashenko y Martínez (2007) y Stashenko *et al.* (2013).

La identificación tentativa de los diferentes compuestos se realizó comparando sus espectros de masas con los de las bases de datos (Adams; NIST y Wiley), y comparando sus índices de retención lineales (IRL), que determinan la retención de un compuesto comparándolo con los tiempos de retención de *n*-alcanos analizados bajo las mismas condiciones operacionales (Van de Dool y Kratz, 1963), utilizando la Ecuación 1.

$$\text{Índice de retención lineal, IRL} = 100 + 100 \frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Dónde:

- n: Número de átomos de carbono en el *n*-alcano, que eluye antes del analito x.
- N: Número de átomos de carbono en el *N*-alcano, que eluye después del analito x.
- t_{RX} : Tiempo de retención del analito x.
- t_{Rn} : Tiempo de retención de *n*-alcano.
- t_{RN} : Tiempo de retención de *N*-alcano.

2.7. Análisis de los datos

Se realizó análisis descriptivo de los dos grupos de variables (Visitantes florales y componentes de la fragancia de *P. edulis* f. *flavicarpa*). Se evaluó si los datos presentan distribución normal, u homogeneidad de varianza, mediante la prueba Kolmogoroff-Smirnov y prueba Levene, respectivamente (Anexo 2). Posteriormente se evaluó si el número de visitantes florales difirió, significativamente, respecto a la fase de la flor mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis

Se calculó el coeficiente de variación del área total relativa al estándar interno de los compuestos en los cromatogramas en cada fase floral. Para determinar si hay una relación entre la frecuencia de los visitantes florales y la concentración de los componentes de la fragancia producidos por las flores de la planta del maracuyá, se estimó el coeficiente de correlación de Spearman. El esquema general del análisis de datos se muestra en la Figura 8. Las pruebas de Kruskal Wallis, Kolmogoroff-Smirnov, Levene y correlación de Spearman se realizaron mediante el *software* libre *RStudio* (Licencia de código abierto, versión 1.1.423 Windows).

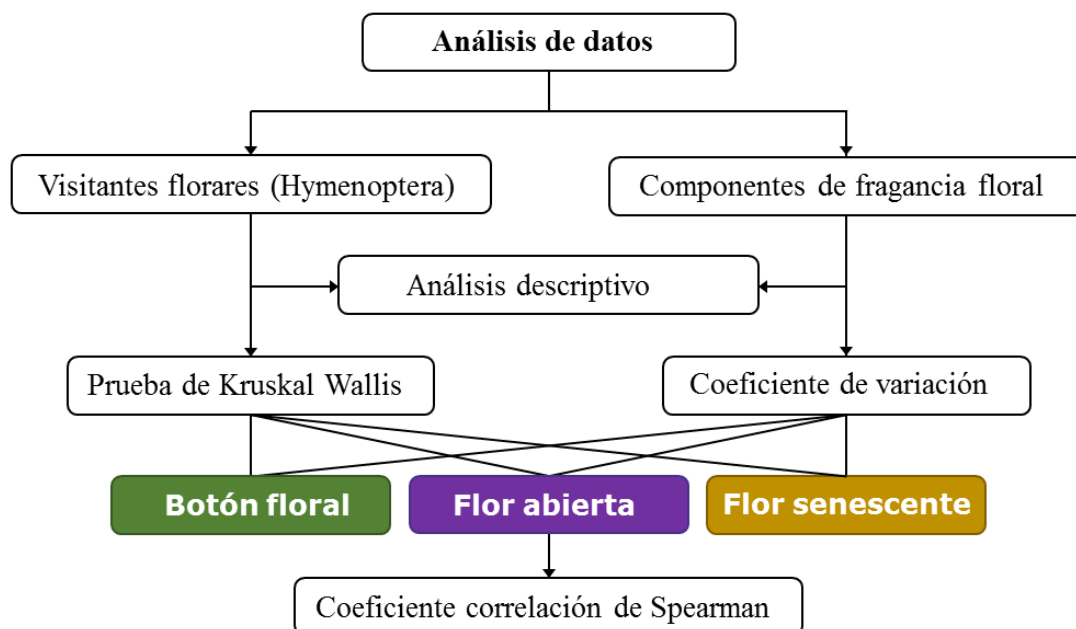


Figura 8. Esquema general del análisis estadístico que se realizó en el presente estudio.

El coeficiente de correlación de Spearman, entre los componentes de la fragancia floral y los visitantes florales, se calculó, únicamente, con datos tomados en las flores abiertas (antes, dos horas y media después de la antesis, y cinco horas después de la antesis). Los valores de los componentes de la fragancia floral utilizados para la correlación, se tomaron del área total relativa de los COV de los cromatogramas obtenidos en las cinco flores muestreadas (15 cromatogramas en total). El número de visitantes florales que se utilizó para correlacionar con los valores de los cromatogramas, se obtuvo a partir de la sumatoria de individuos registrados en grupos de cinco flores, sin embargo, los grupos se formaron a partir de 25 flores. En la Figura 9 se muestra el esquema general para el tratamiento de datos para el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman.

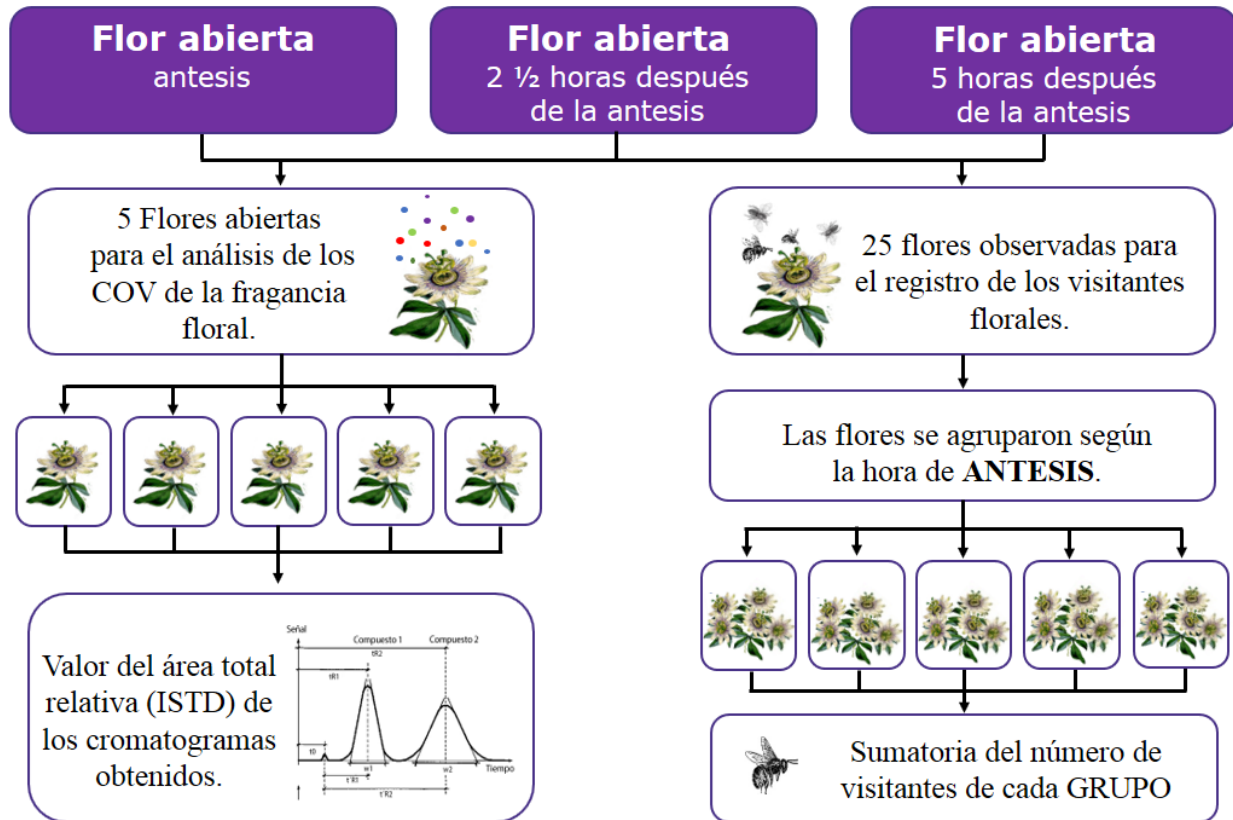


Figura 9. Esquema general de tratamiento de datos para el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman. Cinco flores para el muestreo de los componentes de la fragancia floral y 25 flores divididas en grupos de cinco flores en las tres etapas de la flor abierta (antesis, dos horas y media después de la antesis y cinco horas después de la antesis).

3. Resultados

3.1. Visitantes florales de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*

En las muestras de flores en diferentes fases, se identificaron visitantes florales del orden Hymenoptera, *Trigona angustula* Illiger (Superfamilia: Apoidea, familia: Apidea), *Trigona hyalinata* Lepeletier, *Trigona fulviventris* Guérin-Ménéville, e individuos de género *Xylocopa* sp. (una morfoespecie, identificación no específica). La especie *T. angustula* (89.6%) obtuvo el mayor porcentaje del número de visitantes observados (Figura 10A), seguida de *Xylocopa* sp. (7.8%, Figura 10B). Las especies *T. hyalinata* y *T. fulviventris* se asignaron como visitantes ocasionales, ya que obtuvieron menos del 3% de los registros entre las dos especies (1.8% y 1.0%, respectivamente), además, el tiempo de permanencia sobre las flores fue muy corto (Figuras 10C y 10D), contrario a *Xylocopa* sp., que permanecían más tiempo en las flores alimentándose de néctar.

A. Orden: Hymenoptera; Familia: Apidae; Tribu: Meliponini; Especie: *Trigona angustula*, 89.6%



VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

B. Orden: Hymenoptera; Familia: Apidae; Tribu: Xylocopini; Género: *Xylocopa* sp.,
7.7 %



C. Orden: Hymenoptera; Familia: Apidae; Tribu: Meliponini; Especie: *Trigona hyalinata*,
1.8%



D. Orden: Hymenoptera; Familia: Apidae; Tribu: Meliponini; Especie: *Trigona fulviventris*,
1.0 %.



Figura 10. Visitantes florales (Hymenoptera) de *P. edulis* f. *flavicarpa* y porcentaje del número de visitantes. A. *T. angustula*, B. *Xylocopa* sp., C. *T. Hyalinata*, C. *T. fulviventris*. Fotografía: Elson Meneses Pelayo-Luis Romero, 2017. Bucaramanga- Santander (Colombia).

3.2. Visitantes en diferentes fases de la flor

El porcentaje de visitantes observados respecto a las diferentes fases de la flor, se muestra en la Tabla 6; el porcentaje se calculó con el número de individuos observados en las flores seleccionadas en diferentes fases (registros cada 20 min, 17 días de muestreos, 1034 registros de visitantes florales). Se observó el mayor porcentaje de *T. angustula* en flores abiertas (85.01%); mientras que los visitantes de *Xylocopa sp.* solo se observaron en flores abiertas (7.8%); *T. hyalinata* y *T. fulviventris* se registraron ocasionalmente en las diferentes fases de la flor de maracuyá (el porcentaje de visita de estas dos especies fue menor al 3%).

Tabla 6.

Porcentaje de visitantes florales en las diferentes fases de la flor de P. edulis f. flavicarpa.

Porcentaje de visitantes observados en las diferentes fases de la flor, %				
Especie	Botón floral	Flor abierta	Flor senescente	Total
<i>T. angustula</i>	2.7	85.0	1.8	89.6
<i>T. hyalinata</i>	0	1.6	0.2	1.8
<i>T. fulviventris</i>	0.7	0.3	0	1.0
<i>Xylocopa sp.</i>	0	7.7	0	7.7

El número de visitantes en las diferentes fases de la flor se muestra en la Figura 13. En el 75% de las observaciones, se registraron de uno a tres individuos de *T. angustula* en la fase de flor abierta, mientras que en un 25% de las observaciones, se contaron de cuatro a nueve visitantes de esta especie. La prueba de Kruskal Wallis, con un nivel de significancia del 0.05, determinó que el número de visitantes observados de *T. angustula* difiere entre las fases de la flor (P. valor= 2.2e-16, Chi-cuadrado 50.183, *gl*=2). *Xylocopa sp.* visitó exclusivamente las flores abiertas, por lo tanto, se descartó la prueba de Kruskal Wallis; la especie *T. hyalinata* se observó en flores abiertas

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

y flores senescentes, mientras que *T. fulviventris* se registró en botones florales y flores abiertas, estas dos especies siempre se registraron de a un solo individuo por observación (Figura 11).

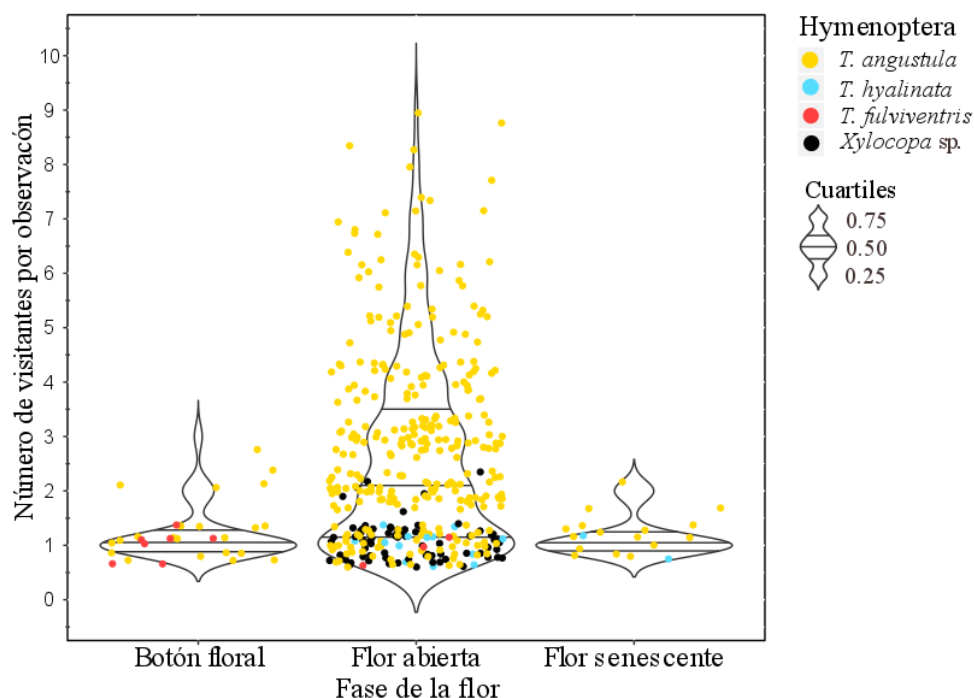


Figura 11. Número de visitantes florales observados en flores en diferentes fases (n: 35 muestras en la fase de botón floral; 57, en flor abierta y 35, en flor senescente).

3.3. Antesis floral y visitantes florales durante el día (12:00-17:00)

La fase de antesis (apertura floral) ocurrió a distintas horas del día como se muestra en la Figura 12. Se registraron los mayores porcentajes de flores en antesis a las 12:40, 13:00 y 13:20 (24, 26 y 18%, respectivamente); mientras que los mayores porcentajes de visitantes florales de *T. angustula* ocurrieron entre las 13:20 y las 14:00, este intervalo se asignó como las horas del día de mayor actividad de visitas de esta especie, donde se pudo registrar hasta nueve visitantes por observación, pero generalmente fueron tres visitantes por observación (Figura 13). A partir de las 16:20 horas no se observaron visitantes de esta especie. Estas pequeñas abejas realizaron forrajeo del polen en las flores, y mantuvieron un comportamiento de defensa en contra de los otros visitantes. Los porcentajes de visitas de *Xylocopa* sp., *T. hyalinata* y *T. fulviventris* no mostraron

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

tendencia a ocurrir en un intervalo de hora particular del día; estas abejas se alimentaron del néctar y, en el caso específico de *T. hyalinata*, también realizó actividades de forrajeo del polen, posiblemente, los pocos registros de estas tres especies se deben a la presencia dominante de *T. angustula* (observación personal).

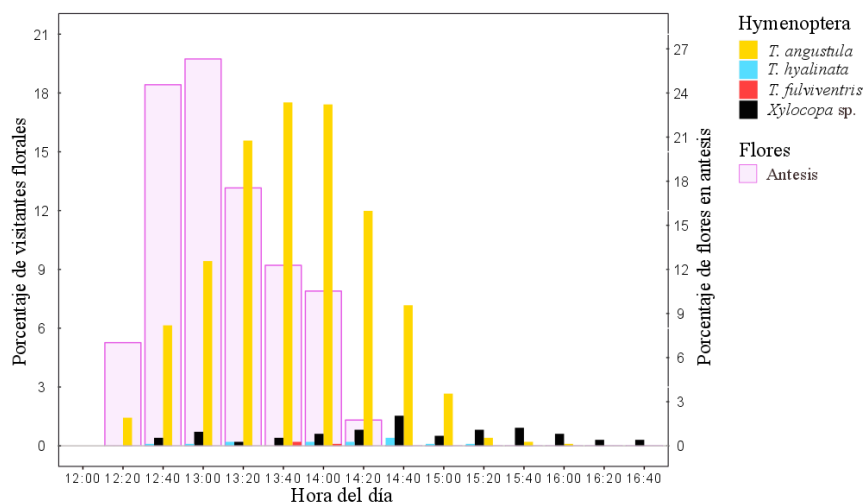


Figura 12. Porcentaje de flores en antesis (barras translúcidas) y porcentaje de abejas visitantes (barras amarillas) en función de la hora del día (n flores: 53, 17 días de muestreo, n visitantes florales registrados en las flores abiertas: 978).

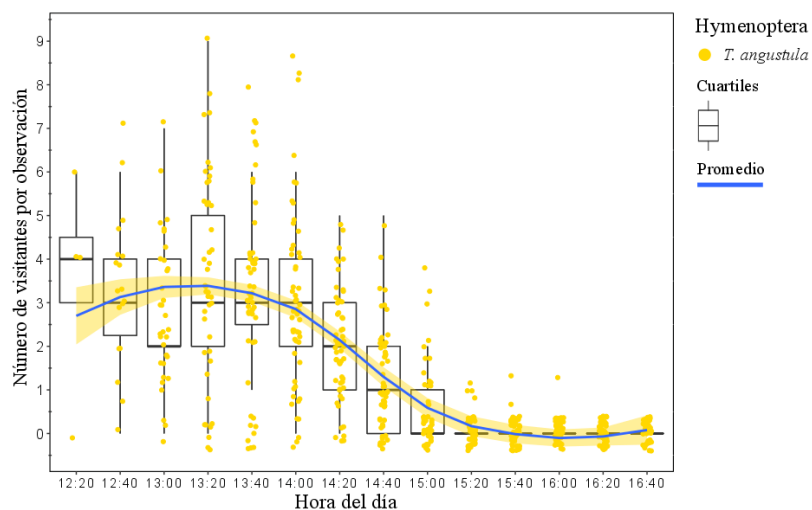


Figura 13. Individuos de la especie *T. angustula* registrados por observación en función de la hora del día (17 días de muestreo).

3.5. Componentes de la fragancia de flores en diferentes fases

Se registraron 39 compuestos orgánicos volátiles en la fragancia de las flores de *P. edulis* f. *flavicarpa* (> 0,1%), de los cuales, 30 se identificaron tentativamente con base en sus espectros de masas e índices de retención lineales y nueve se asignaron como no identificados (N.I.).

El número y la cantidad relativa de compuestos en la flor abierta fueron mayores respecto a los de las flores en las fases de botón y senescente. En las flores abiertas, la emisión de compuestos fue mayor durante la antesis, y disminuyó dos horas y media, y cinco horas, después de la antesis. En la Tabla 7, se muestran los COV encontrados junto con los valores de los índices de retención lineales calculados y los reportados en la literatura; además, se reporta el contenido promedio relativo del compuesto al estándar interno (ISTD) para cada fase floral. La composición típica de la fragancia en las flores en las diferentes fases, se muestra en los cromatogramas de la Figura 14.

Los valores del coeficiente de variación de la composición de la fragancia floral en las cinco muestras de flores en cada fase floral, mostraron alta variación (botón floral: 16.0%, flor abierta en antesis: 85.2%, flor abierta a dos y media horas después de la antesis: 30.8%, flor abierta a cinco horas después de la antesis: 49.3% y flor senescente: 25.5%).

Los compuestos mayoritarios en la fragancia de las flores fueron el 1,4-dimetoxibenceno y el pentadecano, varios compuestos presentaron cantidad relativamente baja o solo se encontraron en una sola muestra de flor (Tabla 7 y Figura 15).

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

Tabla 7.

Índices de retención lineales y composición de COV en la fragancia de cinco flores de *P. edulis f. flavicarpa* en sus diferentes fases florales [promedio de la C.R. con respecto al ISTD (media, \pm SD, superíndices: número de veces que se registró el COV)].

Nº	Compuesto	IRL ^{exp}	IRL ^{lit}	Botón floral	Flor abierta			Flor senescente	Referencia IRL ^{lit}
					Antesis	2 ½ h después	5h después		
1	<i>trans</i> - β -Ocimeno	1237	1250	0.09 ³ \pm 0.07	0.06 ³ \pm 0.03	0.04 ⁴ \pm 0.02	0.08 ³ \pm 0.03	0.07 ³ \pm 0.00	Babushok <i>et al.</i> , 2011
2	Tridecano, C ₁₃	1300	1300		0.03 ² \pm 0.02				Chung <i>et al.</i> , 1993
3	2,6-Dimetil-2,4,6-octatrieno	1380	1392	0.03 ¹					Davies, 1990
4	Tetradecano, C ₁₄	1400	1400		0.26 ³ \pm 0.08	0.08 ³ \pm 0.03	0.03 ³ \pm 0.02		Chung <i>et al.</i> , 1993
5	Benzaldehído	1502	1518		0.02 ¹	0.02 ² \pm 0.01	0.02 ¹		Babushok <i>et al.</i> , 2011
6	Pentadecano, C ₁₅	1500	1500	0.01 ¹	2.71 ³ \pm 1.28	1.01 ³ \pm 0.52	0.35 ³ \pm 0.13	0.15 ³ \pm 0.05	Chung <i>et al.</i> , 1993
7	N.I (P.M.182)	1518		0.04 ³ \pm 0.03	0.01 ¹				
8	1-Trideceno	1522			0.0 ¹				
9	Linalool	1525	1543		0.02 ³ \pm 0.01	0.03 ⁴ \pm 0.01	0.04 ² \pm 0.01		Babushok <i>et al.</i> , 2011
10	<i>trans</i> - β -Cariofileno	1596	1598		0.01 ² \pm 0.01				Babushok <i>et al.</i> , 2011
11	Hexadecano, C ₁₆	1600	1600		0.03 ³ \pm 0.01	0.02 ² \pm 0.01		0.01 ¹	Chung <i>et al.</i> , 1993
12	Hexadeceno (Isómero)	1617			0.18 ³ \pm 0.07	0.04 ³ \pm 0.02	0.02 ¹		
13	Hexadeceno (Isómero)	1620			0.02 ² \pm 0.01				
14	N.I. C ₁₅ H ₂₂ O (P.M. 222)	1652			0.06 ³ \pm 0.03	0.02 ² \pm 0.00			
15	N.I. C ₁₅ H ₂₂ O (P.M. 222)	1658			0.04 ³ \pm 0.02	0.01 ¹			
	Undecanoato de metilo (ISTD)	1688							
16	Heptadecano, C ₁₇	1700	1700		0.09 ³ \pm 0.05	0.04 ³ \pm 0.03	0.03 ² \pm 0.00	0.03 ² \pm 0.02	Chung <i>et al.</i> , 1993
17	8-Heptadeceno	1713	1712				0.06 ² \pm 0.02	0.03 ³ \pm 0.02	Havlik <i>et al.</i> , 2006
18	1,4-Dimetoxibenceno	1724	1728	0.02 ¹	3.93 ⁵ \pm 3.20	3.05 ⁵ \pm 1.66	1.22 ⁵ \pm 1.37	0.03 ² \pm 0.00	Babushok <i>et al.</i> , 2011

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

Continuación de la Tabla 7.

Nº	Compuesto	IRL ^{exp}	IRL ^{lit}	Botón floral	Antesis	2 ½ h después	5h después	Flor Senescente	Referencia (IRL ^{lit})
19	Heptadecadieno (Isómero)	1758			1.72 ³ ±0.75	0.29 ³ ±0.15	0.07 ³ ±0.04	0.01 ¹	
20	Heptadecadieno (Isómero)	1764			0.01 ² ±0.00				
21	Heptadecadieno (Isómero)	1767			0.01 ¹				
22	N.I. (P.M 234)	1807			0.01 ¹				
23	3,5-Dimetoxitolueno	1825	1838		0.03 ² ±0.02				Lee <i>et al.</i> , 2005
24	Heptadecadieno (Isómero)	1842			0.03 ³ ±0.01	0.01 ¹		0.03 ¹	
25	Alcohol bencílico	1847	1865		0.19 ⁵ ±0.06	0.23 ⁵ ±0.09	0.18 ³ ±0.08		Babushok <i>et al.</i> , 2011
26	Heptadecadieno (Isómero)	1885			0.01 ² ±0.00	0.01 ¹			
27	Metileugenol	1987	2006		0.08 ² ±0.09				Babushok <i>et al.</i> , 2011
28	4-Metoxibenzaldehído	2006	2011		0.01 ² ±0.01	0.0 ¹			Nagarajan <i>et al.</i> , 2001
29	2-Metoxibenzoato de metilo	2043	2032		0.01 ¹				Meekijjaroenroj <i>et al.</i> , 2007
30	Cinnamato de metilo	2057	2056		0.08 ⁵ ±0.06	0.05 ⁴ ±0.03	0.04 ² ±0.00		Rychlik, 1998
31	N.I (P.M 234)	2063			0.02 ¹ ±0.00				
32	<i>p</i> -Anisato de metilo	2071	2071		0.01 ¹				Vinogradov, 2004
33	1,3,5-Trimetoxibenceno	2120	2150		0.35 ¹	0.07 ¹	0.10 ¹		Brophy, 2004
34	N.I. C ₁₅ H ₂₆ O (P.M. 222)	2123			0.03 ² ±0.03				
35	N.I. (P.M. 164)	2135			0.33 ⁴ ±0.51	0.02 ² ±0.02			
36	Alcohol 4-metoxibencílico	2246	2268		0.03 ³ ±0.03	0.02 ⁴ ±0.01	0.02 ¹		Babushok <i>et al.</i> , 2011
37	N.I. (P.M. 198)	2297			0.02 ¹				
38	Isoeugenol	2315	2304		0.02 ¹				Kawakami, 1991
39	N.I.	2357			0.01 ³ ±0.0				

C.R: Cantidad relativa, ISTD: Estándar interno, N.I: Compuestos no identificado. P.M.: Peso molecular. IRL^{exp}: Índices de retención lineales experimentales, IRL^{lit}: Índices de retención lineales reportados en literatura. Columna DB-WAX de 60 m.

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

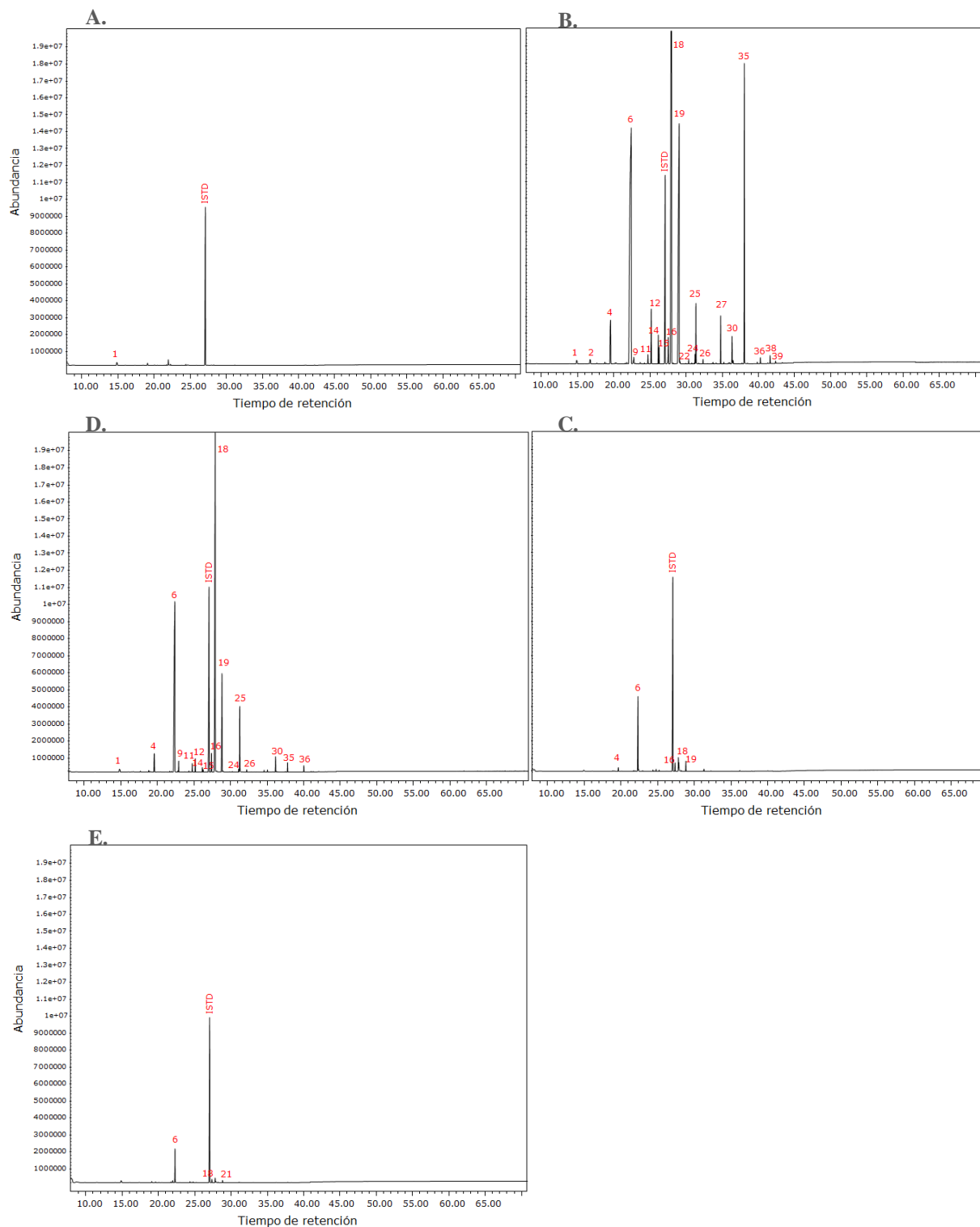


Figura 14. Perfiles cromatográficos típicos de los COV encontrados en la fragancia de las flores en diferentes fases. A. Botón floral, B. Flor abierta en antesis, C. Flor abierta dos y media horas después de la antesis, D. Flor abierta cinco horas después de la antesis, E. Flor senescente.

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

Durante el botón floral, se detectaron pocos compuestos y en baja cantidad relativa respecto al compuesto estándar interno (ISTD), siendo el compuesto *trans*- β -ocimeno el más intenso (Figura 15A). En las diferentes etapas de la flor abierta (antesis, dos horas y media después de la antesis, y cinco horas después de la antesis) se registraron diferentes compuestos y no todos se registraron en las cinco flores de cada etapa. Durante la antesis solo se registraron los compuestos 1,4-dimetoxibenceno, alcohol bencílico y cinnamato de metilo en la fragancia de las cinco flores (Figura 15B); dos horas y media después se registraron solo los dos primeros compuestos (Figura 15C); mientras que en la fragancia de las flores después de cinco horas, solo se registró el compuesto 1,4-dimetoxibenceno en las cinco flores (Figura 15D). En la senescencia de las flores, el número y la cantidad de compuestos disminuyó notablemente con respecto a la flor abierta; en algunas flores, se encontró el pentadecano mayoritariamente y, en menor cantidad, los compuestos *trans*- β -ocimeno, heptadecano, 8-heptadeceno, 1,4-dimetoxibenceno (Figura 15E).

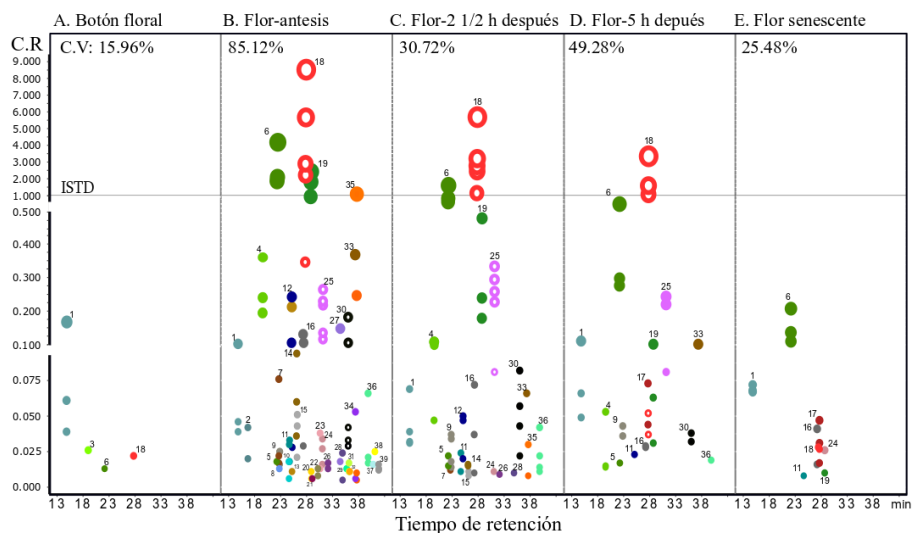


Figura 15. Compuestos orgánicos volátiles identificados y cuantificados en la fragancia de las cinco flores en diferentes fases (*P. edulis* f. *flavicarpa*). Los compuestos 1,4-dimetoxibenceno (18), alcohol bencílico (25) y cinnamato de metilo (30), se detectaron en las cinco flores de una etapa en particular. R.C: Cantidad relativa con respecto al ISTD, CV: Valor del coeficiente de variación. El número de los compuestos corresponde al de la Tabla 7.

3.5. Registros de las variables ambientales durante los muestreos

Los resultados de las variables ambientales registradas por la estación meteorológica (adscrita a la Escuela de Ingeniería Civil UIS) durante el muestreo de los visitantes florales se muestran en la Figura 16, el valor promedio de temperatura durante el intervalo de mayor actividad de *T. angustula* fue de 28 °C, de la radiación del 65%, del índice UV de 7.5 y de la humedad relativa de 63%.

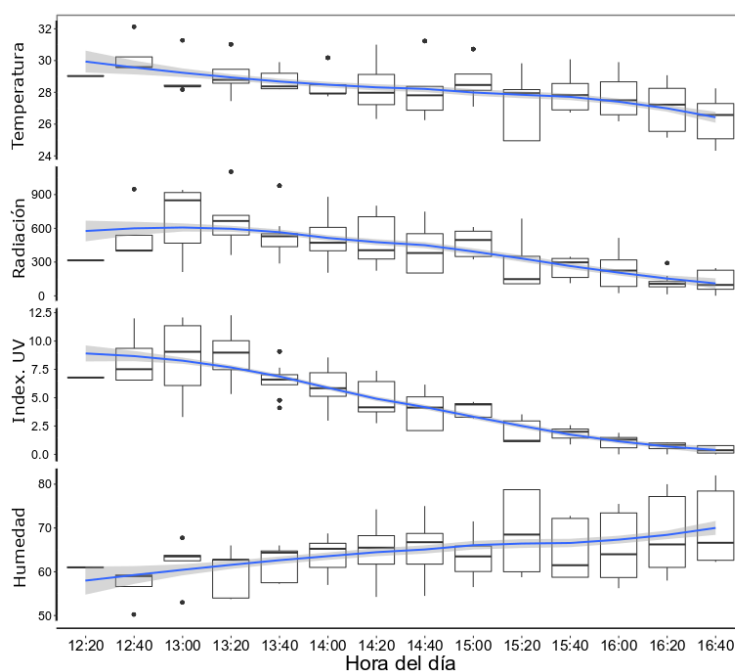


Figura 16. Variables ambientales registradas durante el experimento (Datos registrados los días 7, 8, 9, 16, 18, 19, 21, 23, 25, 26, 27 del mes de julio, y los días 8, 9, 10, 11, 12, 13 de agosto del año 2016)

3.6. Visitantes florales asociados a los componentes de la fragancia floral de *P. edulis* f *flavicarpa*

El número de visitantes de la especie *T. angustula* (especie más frecuente) y los componentes de la fragancia de las flores de *P. edulis* f. *flavicarpa* en las diferentes fases de la flor se muestran en la Figura 17. Se observa, que el número de visitantes y el área cromatográfica total relativa de componentes de la fragancia floral varió dependiendo de la fase de la flor. Durante la antesis, se

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

registró mayor actividad de visitantes y mayor emisión de compuestos; dos horas y media después de la antesis, el número de visitantes y emisión de compuestos disminuyó; cinco horas después de la antesis, no se observaron visitantes florales y la emisión de compuestos fue menor. Durante las fases de botón floral y de la flor senescente, el número de visitantes es bajo, al igual que la emisión de compuestos volátiles (Figura 17).

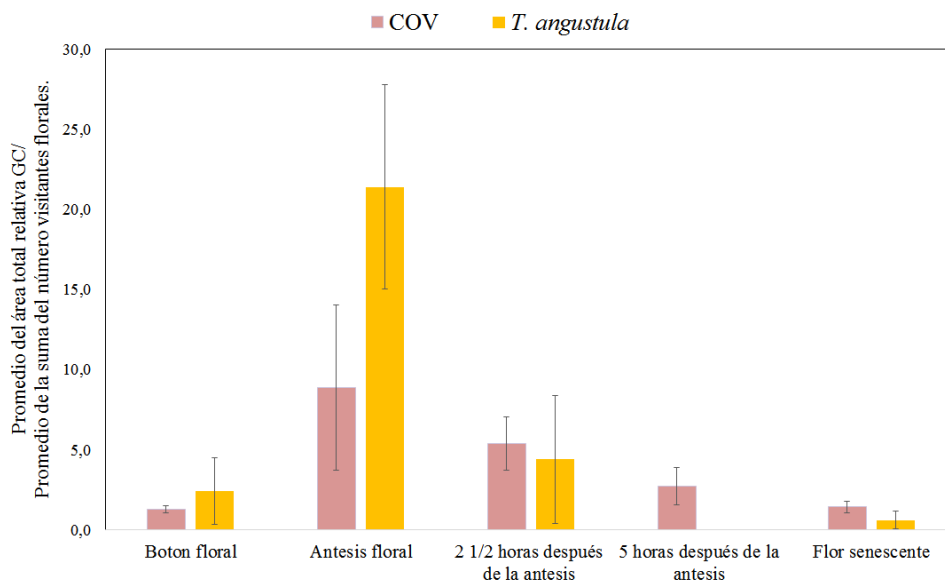


Figura 17. Promedio de la cantidad relativa de componentes de la fragancia floral (COV) y promedio de los visitantes florales (*T. angustula*) en las diferentes fases de la flor de *P. edulis* f. *flavicarpa*.

El coeficiente de correlación de Spearman calculado entre el número visitantes de *T. angustula* y el área total relativa de compuestos de la fragancia de las flores abiertas confirma la relación positiva entre variables (Rs: 0.68, P-valor: 0.0065).

4. Discusión

Durante la investigación, se observó frecuentemente a la especie *Trigona angustula* sobre las flores abiertas de *P. edulis* f. *flavicarpa*, realizando generalmente actividad de forrajeo de polen, trabajo frecuente de las abejas pequeñas sin aguijón del género *Trigona* (Ramalho., *al et* 1994), que se consideran visitantes generalistas de las flores (Callen *et al.*, 1990) y polinizadores importantes de las regiones tropicales y subtropicales (Crane, 1992). Autores han informado que especies de la tribu Meliponini pueden ocasionar disminución en la polinización en los cultivos de maracuyá, debido al alto robo del polen, el cual no llega a estar disponible para ser transportado a otra flor por *Xylocopa* sp. (Junqueira *et al.* 2013, Siqueira *et al.* 2009).

La actividad de vuelo de especies de genero *Trigona* puede ser afectada por varios factores. Según lo reportan Timothy *et al.*, (1993), *T. carbonaria* Smith, es afectada por la temperatura y la radiación, registrando mayor actividad de vuelo a temperatura superiores a 18 °C y radiación mayor de 15 W. En el experimento, los promedios de temperatura y el de radiación, se mantuvieron en los valores apropiados para la actividad de vuelo de estas abejas pequeñas (superiores a 18 °C y 15 W). La disminución en el promedio de visitas después de la 16:20 puede ser debido a que el vuelo de los insectos es energéticamente costoso y solo se puede mantener dentro de un rango de temperatura torácica definido, en *A. mellifera* se ha mostrado las tasas metabólicas de vuelo disminuyen a temperaturas del toráx altas (Norgate *et al.*, 2002),

El número de visitantes de *Xylocopa* sp. durante la investigación estuvo entre uno y dos visitantes por flor, considerándose este valor bajo, según lo publicado por Arias (2014) y Da Silva *et al.* (1999), quienes registraron hasta ocho visitantes por flor durante el periodo de antesis. La poca frecuencia de *Xylocopa* sp., deberse a la presencia de individuos *T. angustula* (se observó

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

comportamiento de defensa por las flores), urbanización de la zona, o factores climáticos, como las altas temperaturas y radiación. Según Da Silva *et al.* (1999), la recolección del néctar y el polen de estas abejas grandes son afectadas por las altas temperaturas y humedades relativas, ellos reportaron el número máximo de visitas a temperaturas promedio de 26 °C y 55% de humedad relativa (14:00 a 15:00). En el presente estudio, la temperatura promedio y la humedad relativa en este intervalo de tiempo fue de 28 °C y 65%, respectivamente. No se descarta que la temporada de lluvia pudo afectar las vistas de *Xylocopa* sp durante la investigación, como lo evidenciaron González y González (2009) en Caquetá (Colombia), donde observaron que el número de crías (lavas y pupas) y adultos en los nidos de *Xylocopa lachnea* fue menor en el mes de julio (2006), comparando con el mes de diciembre del (2008), diferencia atribuida a la época de lluvia.

La gran mayoría de los compuestos identificados en la fragancia de las flores de *P. eduli* f. *flavicarpa* también se encontrado como componentes de las fragancias florales en diversas familias de angiospermas (Chang y Kim; 2009, Knudsen, *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2012 y Hetherington y Ramírez, 2016), excepto el 2,6 dimetil-2,4,6-octratieno, que ha sido reportado en la fragancia de frutas de *Myrica rubra* Sieb (Cheng *et al.*, 2015) y en la corteza de la planta medicinal *Cunninghamia lanceolata* (Peng *et al.*, 2010), y el 6,8-heptadecadieno, sobre el cual no se encontró información en la base de datos Scopus Elsevier, ni tampoco en The Pherobase (fecha de búsqueda: 09/12/2017).

La fragancia floral de algunas especies de *Pasiflora* ya ha sido estudiada previamente, por ejemplo, Varassin *et al.* (2000) obtuvieron COV de las flores de *P. alata*, *P. galbana*, *P. mucronata* y *P. speciosa*, reportando variación interespecífica en la composición de la fragancia floral, también reportaron que la fragancia intensa de las flores (*P. alata*, *P. galbana* y *P. mucronata*) estaba constituida por mezclas de varios compuestos, mientras que las flores con fragancia que no

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

se podía percibir por el olfato (*P. speciosa*), estaba constituida por solo un compuesto, estos autores concluyeron que la polinización de las flores con fragancia intensa es realizada por las abejas y los murciélagos (familias Apidea y Euglossinae), guiados por la fragancia, mientras que la polinización de las flores con baja emisión es realizada por colibríes, que son guiados por el color de las flores, y no por el olor. Otro trabajo en *Passiflora* fue realizado por Montero *et al.* (2016), quienes identificaron la fragancia floral de *P. alata*; *P. quadrangularis*; *P. cincinnata*; *P. coccinea*; y *P. edulis*, y encontraron variedad intraespecífica en la composición de COV; se resalta que *P. edulis* se identificaron 24 compuestos, siendo el 1,4-dimetoxibenceno el compuesto mayoritario, al igual que el presente trabajo. En la Tabla 8 se muestran los COV reportados por Varassin *et al.* (2000) y Montero *et al.* (2016) y que fueron también encontrados en fragancia floral en *P. edulis* f. *flavicarpa*. La variación en la composición de COV intraespecífica e interespecífica puede ser debido factores genéticos o ambientales (De Moraes *et al.*, 2001; Dudareva *et al.*, 2004; Gouinguene y Turlings, 2007; Peñuelas y Llusà, 2001).

Varios estudios han relacionado los compuestos volátiles encontrados en la fragancia de las flores de maracuyá como señales esenciales para atraer polinizadores en diferentes plantas. Por ejemplo, Dötterl *et al.* (2005) mediante bioensayos electroantenográficos mostraron que abejas hembras de la especie *Andrena vaga* Panzer, respondían con mayor intensidad al compuesto 1,4-dimethoxibenceno (compuesto mayoritario de la fragancia floral del maracuyá), que prevalecía entre los compuestos de la fragancia floral de *Salix caprea* y *S. atroconerea* (Salicaceae). Asimismo, Jürgens *et al.* (2014) mostraron que los cambios en la emisión de compuestos florales de *S. caprea* durante el día y la noche atraían a diferentes tipos de visitantes florales (abejas y polillas, respectivamente); igualmente, con bioensayos electroantenográficos determinaron que *Apis mellifera* respondía diferencialmente al 1,4-dimethoxibenceno. Uno de los ejemplos más

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

llamativos de interacción entre planta e insecto involucra a las orquídeas de las subtribus Stanhopeinae y Catasetinae (Orchidaceae), que se polinizan exclusivamente por abejas macho de la tribu Euglussine (Neotropicales), que son atraídos por la fragancia floral, constituida principalmente por 1,4-dimethoxibenceno, alcohol bencílico, cinnamato de metilo y linalool (Williams y Whitten, 1983), compuestos que también se encontraron en la fragancia de las flores del maracuyá. Los compuestos pentadecano, 1,4-dimetoxibenceno, (*E*)-ocimeno y linalool también se encontraron en las fragancias de flores de palmas en Ecuador y Puerto Rico, que son polinizadas principalmente por escarabajos (Coleóptera), moscas (Diptera) y abejas (Hymenoptera) (Knudsen *et al.*, 2001), por lo tanto, no se descarta que el pentadecano encontrado en gran cantidad (relativa al ISTD) en las flores de maracuyá esté asociado a la atracción de otros grupos insectos visitantes.

En este estudio, no se descarta la influencia de los componentes de la fragancia de las flores de maracuyá en la atracción *Xylocopa* sp. debido a que en repetidas ocasiones se observó que estas abejas podían localizar flores ocultas entre las hojas, además, las visitas de estas abejas se dieron exclusivamente en las flores abiertas, cuando la emisión de la fragancia fue mayor respecto a la fase botón floral y flor senescente.

Los resultados de este trabajo generan nuevas preguntas de investigación, por ejemplo, la relación de los compuestos como el 1,4-dimethoxibenceno, alcohol bencílico y cinnamato de metilo comunes en la fragancia floral del maracuyá, en la atracción de las abejas de la especie *T. angustula* y *Xylocopa* sp., ya que los polinizadores no siempre detectan eficazmente los compuestos aromáticos dominantes de las plantas (Fraser *et al.*, 2003). Por lo tanto. Se sugieren los bioensayos electroantenográficos, la utilización de túneles de viento, o el uso de cebos

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

impregnados de compuestos individuales o la mezcla de algunos, para confirmar la respuesta de los visitantes florales a la fragancia floral de *P. edulis* f. *flavicarpa*.

Tabla 8.

Compuestos orgánicos volátiles encontrados por Varassin et al. (2000)¹ y Montero et al. (2016)² y también encontrados en P. edulis f. flavicarpa.

	Compuestos volátiles de la fragancia floral de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>													
<i>Passiflora</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>P. alata</i> ¹								X						
<i>P. galbana</i> ¹								X						
<i>P. mucronata</i> ¹	X	X	X	X	X	X	X	X						
<i>P. speciosa</i> ¹														
<i>P. alata</i> ²								X	X	X	X			
<i>P. quadrangularis</i> ²								X		X	X	X		
<i>P. cincinnata</i> ²	X										X		X	
<i>P. coccinea</i> ²	X	X								X				
<i>P. edulis</i> ²	X	X		X				X	X			X		X

1. tridecano, 2. Tetradecano, 3. Pentadecano, 4. Hexadecano, 5. Heptadecano, 6. Linalool, 7. Alcohol 4-metoxibencílico, 8. Alcohol bencílico, 9. 1,4 dimetoxibenceno, 10. *trans*- β -Ocimeno, 11. Linalool, 12. Cinnamato de metilo, 13. Benzaldehído, 14. 1,3,5-trimetoxibenceno.

5. Conclusiones

Trigona angustula, *T. hyalinata*, *T. fulviventris* y *Xylocopa* sp. fueron los visitantes florales identificados en las diferentes fases de la flor de *P. edulis* f. *flavicarpa*. El número de visitantes varió dependiendo de fase de la flor, siendo durante la fase de flor abierta donde se registró mayor actividad de visitas.

La especie *Trigona angustula* fue la más frecuente en las flores abiertas de *P. edulis* f. *flavicarpa*, su mayor actividad de visitas se registró durante la antesis de las flores, disminuyendo progresivamente en las siguientes horas del día. *Xylocopa* sp. visitó exclusivamente las flores abiertas, pero no se pudo observar un patrón de visitas durante el día.

En la fragancia de las flores de *P. edulis* f. *flavicarpa* se identificaron 39 compuestos diferentes; la emisión de estos compuestos florales varió dependiendo la fase de flor, coincidiendo la mayor emisión con la fase floral de mayor actividad de visitantes florales. La mezcla de compuestos de la fragancia floral de *P. edulis* f. *flavicarpa* no es el mismo en las fases florales, pero los compuestos 1,4-dimethoxibenceno y alcohol bencílico son típicos en las flores abiertas.

El número de visitantes de la especie *T. angustula* se asoció con la mayor emisión de compuestos volátiles; se encontró una asociación positiva entre visitantes y la emisión de compuestos orgánicos volátiles de las flores: a mayor intensidad de la fragancia, mayor número de visitantes florales.

Se sugieren posteriores estudios de bioensayos electroantenográficos, la utilización de túneles de viento, o el uso de cebos impregnados de compuestos individuales o la mezcla de algunos, para confirmar la respuesta de los visitantes florales a la fragancia floral de *P. edulis* f. *flavicarpa*.

Referencias Bibliográficas

- Agronet, (2012). Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia. Análisis estadísticos, maracuyá. Recuperado de [http:// www.agronet.gov.co/estadistica/](http://www.agronet.gov.co/estadistica/) [consultado el 10 de febrero del 2017].
- Akamine, E. & Girolami, G. (1959). Pollination and fruit set in the yellow passion fruit. University of Hawaii. *Technical Bulletin*, 39: 1-44.
- Angel, C., Nates, G., Ospina R. y Melo, C. (2011). Biología floral y reproductiva de la gulupa *Passiflora edulis* SIMS f. *edulis* floral and reproductive Biology of the ‘Gulupa’ *Passiflora edulis*. *Caldasia*, 33 (2): 433-51.
- Arias, J. C., Ocampo, J. A. & Urre, R. (2014). La polinización natural en el maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) como un servicio reproductivo y ecosistémico. *Agronomía Mesoamericana*, 25 (1): 73–83.
- Arthur, C. L. & Pawliszyn, J. (1990). Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62 (19).
- Babushok, V. I., Linstrom, P. J., & Zenkevich, I. G. (2011). Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 40 (4), 043101.
- Bicchi, C., Drigo, S. & Rubiolo, P. (2000). Influence of fibre coating in headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants. *Journal of Chromatography*, 892 (1-2).
- Braunschmid, H., Mükisch, B., Rupp, T., Schäffler, I., Zito, P., Birtele, D., & Dötterl, S. (2017). Interpopulation variation in pollinators and floral scent of the lady’s-slipper orchid *Cypripedium calceolus* L. *Arthropod-Plant Interactions*, 1-17.
- Brophy, J. J., Goldsack, R. J., & Foster, P. I. (2004). Leaf oils of the genus *Brombya* (Rutaceae). *Journal of Essential Oil Research*, 16: 402-404.
- Byers, K. J., Vela, J. P., Peng, F., Riffell, J. A., & Bradshaw, H. D. (2014). Floral volatile alleles can contribute to pollinator-mediated reproductive isolation in monkeyflowers (*Mimulus*). *The Plant Journal*, 80 (6): 1031-1042.
- Burger, H., Ayasse, M., Dötterl, S., Kreissl, S., & Galizia, C. G. (2013). Perception of floral volatiles involved in host-plant finding behaviour: comparison of a bee specialist and generalist. *Journal of Comparative Physiology A*, 199 (9): 751-761.

- Calle, Z., Guariguata, M. & Giraldo, E. (2010). La producción de maracuyá (*Passiflora edulis*) en Colombia: perspectivas para la conservación del hábitat a través del servicio de polinización. *Interciencia*, 35 (3): 207-12.
- Callen, L., Thomas, A., Darchen B. & Darchen R. (1990). Quelques facteurs determinant le comportement de butinage d' *Hypotrigena pothieri* (Trigonini) dans la vegetation de Cote-d'Ivoire. *Apidologie*, 21: 69-83
- Cárdenas J. (2005). Mejoramiento en el manejo del cultivo, producción y comercialización del maracuyá en la zona geográfica de los llanos orientales. Productora de Jugos, Departamento de Fomento Agrícola. *Material Impreso*, 40 p.
- Chang, K. M., & Kim, G. H. (2009). Constituents of the Essential Oil from *Eclipta prostrata* L. *Preventive Nutrition and Food Science*, 14(2): 168-171.
- Cheng, H., Chen, J., Chen, S., Wu, D., Liu, D., & Ye, X. (2015). Characterization of aroma-active volatiles in three Chinese bayberry (*Myrica rubra*) cultivars using GC–MS–olfactometry and an electronic nose combined with principal component analysis. *Food Research International*, 72: 8-15.
- Corbet, S., & Willmer, P. (1980). Pollination of the yellow passionfruit: nectar, pollen and carpenter bees. *The Journal of Agricultural Science*, 95 (03): 655–66.
- Chung, T. Y., Eiserich, J. P. & Shibamoto, T. (1993). Volatile compounds isolated from edible Korean chamchwi (*Aster scaber* Thunb). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41: 1693-1697.
- Crane, E. (1992). The past and present status of beekeeping with stingless bees. *Bee World*, 73: 29-42
- Da Silva, M., Brucknerl C., Picanc, M. & Molina, A. (1999). Número floral, clima, densidad poblacional de *Xylocopa* Spp. (Hymenoptera: Anthophoridae) y polinización del maracuyá (*Passiflora edulis* f *flavicarpa*). *Mairon*, 47 (1): 10.
- Davies, N. W. (1990). Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. *Journal of Chromatography. A.*, 503:1-24.
- De Moraes, C., Mescher, M. & Tumlinson J. (2001). Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature*, 410 (6828): 577-80.
- Deginani, N. (2001). Las especies argentinas del género *Passiflora* (Passifloraceae). *Darwiniana*, 39: 43-129.
- Dötterl, S., Fussel, U., Jurguens, A. & Aas, G. (2005). 1,4-Dimethoxybenzene, a floral scent compound in willows that attracts an oligolectic bee. *Journal of Chemical Ecology*, 31: 2993-2998.
- Dötterl, S. & Schaffler, I. (2007). Flower scent of floral oil-producing *Lysimachia punctata* as attractant for the oil-bee *Macropis fulvipes*. *Journal of Chemical Ecology*, 33: 441-445.

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

- Dudareva, N. & Negre, F. (2005). Practical applications of research into the regulation of plant volatile emission. *Current Opinion in Plant Biology*, 8 (1): 113-18.
- Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. & Orlova, I. (2006). Plant volatiles: Recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25 (5).
- Dudareva, N., & Pichersky, E. (2006). Metabolic engineering of floral scent of ornamentals. *Journal of crop improvement*, 18 (1-2): 325-346.
- Dudareva, N., Pichersky, E. & Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology*, 135 (4): 1893-1902.
- Eltz, T., Ayasse, M. & Lunau, K. (2006). Species-specific antennal responses to tibial fragrances by male orchid bees. *Journal of Chemical Ecology*, 32:1.
- Harrison J., & Fewell J (2002) Environmental and genetic influences on flight metabolic rate in the honey bee, *Apis mellifera*. *Comp Biochem Physiol A* 133: 323–333
- Hoffmann, M., Pereira, T. N., Mercadante, M. B., & Gomes, A. R. (2000). Pollination of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Passiflorales, Passifloraceae) by bees (Hymenoptera, Anthophoridae) in Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. *Iheringia. Série Zoologia*, (89), 149-152.
- Filella, I., Bosch, J., Llusà, J., Peñuelas, A., & Peñuelas, J. (2011). Chemical cues involved in the attraction of the oligolectic bee *Hoplitis adunca* to its host plant *Echium vulgare*. *Biochemical Systematics and ecology*, 39 (4): 498-508.
- Fraser, A. M., Mechaber, W. L., & Hildebrand, J. G. (2003). Electroantennographic and behavioral responses of the Sphinx moth *Manduca sexta* to host plant headspace volatiles. *Journal of Chemical Ecology*, 29 (8): 1813-1833.
- Freitas, B. M., & de Oliveira Filho, J. H. (2003). Ninhos racionais para mamangava (*Xylocopa frontalis*) na polinização do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*). *Ciência Rural*, 33(6), 1135-1139.
- Flamini, G., Cioni, P. L. & Morelli, I. (2003). Use of solid-phase micro-extraction as a sampling technique in the determination of volatiles emitted by flowers, isolated flower parts and pollen. *Journal of Chromatography A*, 998 (1-2): 229-33.
- Gaydou, E. M., Randriamiharisoa, R. & Bianchini, J. P., (1986) Composition of the essential oil of ylang-ylang (*Canaga odorata* Hook Fil. et Thomson forma genuina) from Madagascar. *Journal of Agricultural. Food Chemistry*, 34 (3): 481-487.
- González, V. & González, M. (2009). Biological and taxonomic notes on maracuya bees of the genus *Xylocopa* (Hymenoptera: Apidae, Xylocopini) in Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 14 (2): 31-40.
- Gracie, C. (1993). Pollination of *Cyphomandra endopogon* var. *endopogon* (Solanaceae) by *Eufriesea* spp.(Euglossini) in French Guiana. *Brittonia*, 45 (1): 39-46.

- Gouinguene, S., & Turlings, T. (2007). The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. *Plant Physiology*, 129 (3): 1296-1307.
- Harborne, Jeffrey B. (2001). Secondary metabolites: Attracting pollinators. *Encyclopedia of the life*, 1–5, John Wiley & Sons, Ltd. University of Reading, Reading, UK. www.els.net sciences.
- Havlik, J., Kokoska, L., Vasickova, S. & Valterova, I. (2006). Chemical composition of essential oil from the seeds of *Nigella arvensis* L. and assessment of its antimicrobial activity, *Flavour and Fragrance Journal*, 21 (4): 713-717.
- Hetherington, M. C., & Ramírez, S. R. (2016). Evolution and diversity of floral scent chemistry in the euglossine bee-pollinated orchid genus *Gongora*. *Annals of Botany*, 118 (1): 135-148.
- Holopainen, J. K. (2004). Multiple functions of inducible plant volatiles. *Trends in Plant Science* 99 (11).
- Jaramillo, J., Cárdenas, J. & Orozco, J. (2008). Manual sobre el cultivo del maracuyá (*Passiflora edulis*) en Colombia. *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA*, 1-80.
- Junqueira, C. N., Yamamoto, M., Oliveira, P. E., Hogendoorn, K., & Augusto, S. C. (2013). Nest management increases pollinator density in passion fruit orchards. *Apidologie*, 44(6), 729-737.
- Jürgens, A., Gluck, U. Aas, G. & Dötterl, S. (2014). Diel fragrance pattern correlates with olfactory preferences of diurnal and nocturnal flower visitors in *Salix caprea*. *Journal Botanical*, 175: 624-640.
- Kawakami, M. & Kobayashi, A. (1991). Volatile constituents of green mate and roasted mate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39 (7): 1275-1279.
- Kearns, C., Inouye, D. W. & Waser, N. M. (1998). ENDANGERED MUTUALISMS: The conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29: 83-112.
- Kehl, A., Dötterl, S., Aas, G., & Rambold, G. (2010). Is flower scent influencing host plant selection of leaf-galling sawflies (Hymenoptera, Tenthredinidae) on willows. *Chemoecology*, 20 (3): 215-221.
- Kishore, K., Pathak, K. A. & Shukla R. (2010). Studies on floral biology of passion fruit (*Passiflora* SPP). *Pakistan Journal of Botany*, 42 (1): 21–29.
- Klatt, B. K., Burmeister, C., Westphal, C., Tschardt, T., & von Fragstein, M. (2013). Flower volatiles, crop varieties and bee responses. *PLoS One*, 8 (8): e72724.
- Klein, A. M., Vaissière, B. E., Cane J. H., Dewenter I. S., Cunningham, S. A., Kremen C. & Tschardt T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *The Royal Society*, 274 (1608).

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

- Knudsen, J., Eriksson R., Gershenzon, J. & Stahl, B. (2006). Diversity and distribution of floral scent. *Botanical Review*, 72 (1): 1-120.
- Knudsen, J., Tollsten L. & Berstrom, L. (1993). Review article number 76. Floral scents-a checklist of volatile compounds by head-space techniques. *Phytochemistry*, 33 (2): 253–80.
- Knudsen, J. T., Tollsten, L., & Ervik, F. (2001). Flower scent and pollination in selected neotropical palms. *Plant Biology*, 3 (06): 642-653.
- Kubo, R., & Ono, M. (2014). Innate attractant for long-tongued bumblebee, *Bombus diversus* diversus in floral scent of bumblebee-pollinated epiparasitic plant, *Monotropastrum humile* (Ericaceae). *Entomological Science*, 17 (4): 432-434.
- Lee, K. G., Lee, S. E., Takeoka, G. R., Kim, J. H., & Park, B. S. (2005). Antioxidant activity and characterization of volatile constituents of beechwood creosote, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85 (9): 1580-1586.
- Li, Z. G., Lee, M. & Shen D. (2006). Analysis of volatile compounds emitted from fresh *Syringa oblata* flowers in different floescence by headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 576 (1): 43–49.
- Matile, P. & Altenburger. R. (1988). Rhythms of fragrance emission in flowers. *Planta*, 174 (2): 242-47.
- McGregor, S. E. (1976). Insect pollination of cultivated crop plants. *Agriculture Handbook*, (Vol. 496). Washington (DC): Agricultural Research Service, US Department of Agriculture.
- Meekijjaroenroj, A., Bessièrè, J. M. & Anstett, M. C. (2007). Chemistry of floral scents in four *Licuala* species (Arecaceae). *Flavour and Fragrance Journal*, 22 (4): 300-310.
- Montero, D., Marques, M., Meletti, L., Kampe, M., & Polozzi, S. (2016). Floral scent of brazilian *Passiflora*: five species analised by dynamic headspace. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88 (3): 1191-1200.
- Muller, F., Bernhard, J., Berger, M., Yegen, O. & Cakir, C. (1997). Seasonal variations in the chemical compositions of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4821-25.
- Nagarajan, S., Rao, L. J., & Guirudutt, K. N. (2001), Chemical composition of the volatiles of *Decalepis hamiltonii* (Wight Arn). *Flavour and Fragrance Journal*, 16 (1): 27-29.
- Nates, G. P. (1990). Abejas de Colombia. III Clave para generos y subgeneros de Meliponinae (Hymenoptera: Apidae) en Colombia. *Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle*, 3 (2): 21-33.
- Nates, G. P. & Fernandez F. (1992). Abejas de Colombia II: Claves preliminares para las familias, subfamilias y tribus (Hymenoptera: Apoidea). *Acta Biológica Colombiana*, 2 (7/8): 55-89.

- Ne'eman, G., Jürgens, A., Newstrom-Lloyd, L., Potts, S. G., & Dafni, A. (2010). A framework for comparing pollinator performance: effectiveness and efficiency. *Biological Reviews*, 85(3), 435-451.
- Norgate, M., Boyd-Gerny, S., Simonov, V., Rosa, M. G., Heard, T. A., & Dyer, A. G. (2010). Ambient temperature influences Australian native stingless bee (*Trigona carbonaria*) preference for warm nectar. *PLoS One*, 5(8), e12000.
- Nunes, C. E., Gerlach, G., Bandeira, K. D., Gobbo-Neto, L., Pansarin, E. R., & Sazima, M. (2016). Two orchids, one scent? Floral volatiles of *Catasetum cernuum* and *Gongora bufonia* suggest convergent evolution to a unique pollination niche. *Flora*, 232: 207-216.
- Ocampo, J., Coppens, G. & Jarvis, A. (2010). Distribution of the genus *Passiflora* L. Diversity in Colombia and its potential as an indicator for biodiversity Management in the Coffee Growing Zone. *Diversity*, 2 (11): 1158–80.
- Ocampo, J., Coppens, G., Restrepo, M., Jarvis, A. & Salazar, M. (2007). Diversity of Colombian Passifloraceae: Biogeography and an updated list for conservation. *Biota Colombiana*, 81 (1): 1-45.
- Ouyang, G., Chen, Y., Setkova, L. & Pawliszyn, Janusz. (2005). Calibration of solid-phase microextraction for quantitative analysis by gas chromatography. *Journal of Chromatography A.*, 1097 (1-2): 9-16.
- Pansarin, E. R., & do Amaral, M. D. C. E. (2009). Reproductive biology and pollination of southeastern Brazilian *Stanhopea Frost ex Hook* (Orchidaceae). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 204 (3): 238-249.
- Passionfruit. (2011). Supply and demand. [http:// passionfruitjuice.com](http://passionfruitjuice.com) [consultado el 3 de octubre 2011].
- Pecetti, L., Tava, A., Felicioli, A., Pinzauti, M., & Piano, E. (2002). Effect of three volatile compounds from lucerne flowers on their attractiveness towards pollinators. *Bulletin of Insectology*, 55: 21-28.
- Peng, W. X., Ma, Q. Z., Zhang, Z. F., Zhang, X., y Qi, H. C. (2010). Analysis on nano biomedical components of acetic ether extractives of *Cunninghamia lanceolata* Biology by Py-GC/MS. *In Nanoelectronics Conference (INEC), 2010 3rd International* (pp. 1417-1418). IEEE
- Peñuelas, J. & Llusà J.. (2001). The complexity of factors driving volatile organic compound emissions by plant. *Biology Plantarum*, 44 (4): 481-87.
- Pichersky, E. & Gershenzon, J. (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 5 (3): 237-43.
- Pichersky, E., Noel, J. P. & Dudareva, N. (2006). Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science (New York, N.Y.)*, 311 (5762): 808-11.

- Rader, R., Bartomeus, I., Garibaldi, L. A., Garratt, M. P., Howlett, B. G., Winfree, R., ... & Bommarco, R. (2016). Non-bee insects are important contributors to global crop pollination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113 (1), 146-151.
- Ramalho, M., Giannini, T., Malagodibraga, K. & Fonseca, V. (1994). Pollen harvest by stingless bee foragers (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Grana*, 33: 239-44.
- Ramirez, William. (2006). Hibridacion interespecífica en *Passiflora* (Passifloraceae), mediante polinización manual, y características florales para la polinización. *Lankesteriana*, 6 (3): 123-31.
- Reinhard, J., Sinclair, M., Srinivasan, M. V., & Claudianos, C. (2010). Honeybees learn odour mixtures via a selection of key odorants. *PloS one*, 5 (2): e9110.
- Rychlik, M., Schieberle, P., & Grosch, W. (1998). Compilation of odour thresholds, odour qualities and retention indices of key food odorants. *Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie and Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München*.
- Salzmann, C. C., Nardella, A. M., Cozzolino, S., & Schiestl, F. P. (2007). Variability in floral scent in rewarding and deceptive orchids: the signature of pollinator-imposed selection?. *Annals of Botany*, 100 (4): 757-765.
- Schade, F., Legge R. L. & Thompson, J. E. (2001). Fragrance volatiles of developing and senescing carnation flowers. *Phytochemistry*, 56 (7): 703-10.
- Schuurink, R. C., Haring, M. A., & Clark, D. G. (2006). Regulation of volatile benzenoid biosynthesis in petunia flowers. *Trends in plant science*, 11(1), 20-25.
- Shang, C., Yaoming, H., Deng, C. & Hu, K. (2002). Rapid determination of volatile constituents of *Michelia alba* flowers by gas chromatography-mass spectrometry with solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography. A.*, 942 (1): 283-88.
- Schiestl, F. P., & Glaser, F. (2012). Specific ant-pollination in an alpine orchid and the role of floral scent in attracting pollinating ants. *Alpine Botany*, 122 (1): 1-9.
- Siqueira, D-M., Kiill, L., Martins C. F., Borges, L. I., Pitombeira, S. & Feitoza, E. (2009). Ecologia da polinização do maracujá-amarelo, na região do vale do submédio São Francisco. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31 (1): 1-12.
- Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E. & Martinez J. R. (2004). Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (mill.) N. E. Brown, grown in Colombia, and Evaluation of its in Vitro Antioxidant Activity. *Journal of Chromatography A*, 1025 (1): 93-103.
- Stashenko, E. E. & Martínez, J. R. (2007). Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction. *Biochemical and Biophysical Methods*, 70 (2): 235-42.

- Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Cardenas, V. S., Saavedra, B. R. & Duran, C. D. (2013). GC-MS Study of compounds isolated from *coffea arabica* flowers by different extraction. *Jss. Journal*, 36 (17): 2901-14.
- Steeghs, M., Bais, H. P., Gouw, J., Goldan, P., Kuster, W., Northway, M., Fall, R. & Vivanco, J. M. (2004). Proton-transfer-reaction mass spectrometry as a new tool for real time analysis of root-secreted volatile organic compounds in *Arabidopsis* 1. *Plant Physiology*, 135 (1): 47-58.
- Suassuna, T, Bruckner, H., Carvalho, R. & Borém, A. (2003). Self-incompatibility in passionfruit: evidence of gametophytic-sporophytic control. *Theoretical and Applied Genetics*, 106 (2): 298-302.
- Tholl, D., Boland, Wilhelm., Hansel, A., Loreto, F. & Ro, U. (2006). Practical approaches to plant volatile analysis. *The Plant Journal*, 45 (4): 540-60.
- Timothy, A. & Hendrikz. (1993). Factor influencing flight activity of colonies of the stingless bee. *Trigona carbonaria* (Hymenoptera: Apidae). *Australian Journal of Zoology*, 41: 343-53.
- Tressl, R., Friese, L., Fendesack, F. & Köppler, H. (1978). Gas chromatographic-mass spectrometric investigation of hop aroma constituents in beer, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26 (6): 1422-1426.
- Twidle, A. M., Mas, F., Harper, A. R., Horner, R. M., Welsh, T. J., & Suckling, D. M. (2015). Kiwifruit flower odor perception and recognition by honey bees, *Apis mellifera*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63 (23): 5597-5602.
- Ulmer, T. & MacDougal, J. M. (2004). *Passiflora*: passion flower of the world. Portland. *Timber Press, Inc*, 430 pp.
- Valverde, J., Calatayud, J., Gómez, J. M. & Perfectti, F. (2014). Variación intraestacional en los visitantes florales de *Erysimum mediohispanicum* en Sierra Nevada. *Ecosistemas*, 23 (3): 83-92.
- Van Schie, C., Haring, M. y Schuurink, R. C. (2006). Regulation of terpenoid and benzenoid production in flowers. *Current Opinion in Plant Biology*, 9 (2): 203-8.
- Varassin I., Trigo, J. R. & Sazima, M. (2000). The role of nectar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of *Passiflora* (Passifloraceae) in the south-eastern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 136: 139-152.
- Vinogradov, B. A. (2004). Production, composition, properties and application of essential oils, recuperado de <http://webbook.nist.gov/cgi/inchi?ID=C121982&Mask=2000#ref-20> [Citado el 9 de febrero del 2018].
- Vuillaume C. (1991). Principales resultados obtenidos y Programa de Investigación sobre Passifloras en la red internacional del IRFA-Cirad. *Memorias Primer Simposio Internacional sobre Passifloras*. IPGRI, FAO, U Nacional, ICA, Palmira, Colombia, p 79.

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

- Wadhams, L. J., Blight, M. M., Kerguelen, V., Le Métayer, M., Marion-Poll, F., Masson, C., & Woodcock, C. M. (1994). Discrimination of oilseed rape volatiles by honey bee: novel combined gas chromatographic-electrophysiological behavioral assay. *Journal of chemical ecology*, 20 (12): 3221-3231
- Watanabe, N., Watanabe, S., Nakajima, R., Moon, J. Naoharu Watanabe. & Shimokihara, Keiko. (2014). Formation of flower fragrance compounds from their precursors by enzymic action during flower opening formation of flower fragrance compounds from their precursors by enzymic action during flower opening. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57 (7): 37-41.
- Williams, N. H. & Whitten, W. M. (1983). Orchid floral fragrances and male euglossine bees: methods and advances in the last sedquidecade. *The Biological Bulletin*, 164: 355-395.
- Van Den Dool, H. y Kratz, P. D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal Chromatography A.*, 11: 463-471.
- Zar, J. H. (1998). Spearman rank correlation. *Encyclopedia of Biostatistics*. *Wiley Online Library*. Recuperado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/0470011815.b2a15150> [Citado el 9 de febrero del 2018].

Apéndices

Apéndices A.

Tabla para registro de los himenópteros en diferentes fases de la flor de *P. edulis f. flavicarpa*.

Fecha		Numero de franja:	Numero planta:	Numero de franja:	Numero planta:	Numero de franja:	Numero planta:	Numero de franja:	Numero planta:	Numero de franja:	Numero planta:
Hora y num. conteo		Num. Muestra floral:	Ubicacion:		Num. Muestra floral:		Ubicacion:		Num. Muestra floral:		Ubicacion:
		Fase floral:	Morfoespecie observada	Fase floral:	Morfoespecie observada	Fase floral:	Morfoespecie observada				
12:00	20 min										
	20 min										
13:00	20 min										
	20 min										
14:00	20 min										
	20 min										
15:00	20 min										
	20 min										
16:00	20 min										
	20 min										
17:00	20 min										
	20 min										
Observaciones:											

VISITANTES FLORALES Y FRAGANCIA FLORAL

Apéndices B.

Pruebas de Normalidad y Homogeneidad de varianza en los registros de los visitantes.

H_0 : Se acepta que la muestra proviene de una distribución normal y las varianzas de las poblaciones son

Prueba de Normalidad/Homogeneidad	Kolmogorov-Smirnov		Levene	
	Estadístico	P-valor	Estadístico	P-valor
Registros (Hymenoptera) en las tres las fases	0.51189	2.2e-16	96.308	2.2e-16
Registros (Hymenoptera) en Botón floral	0.52785	2.2e-16	7.9579	3.052e-05
Registros (Hymenoptera) en flor abierta	0.45673	2.2e-16	194.18	2.2e-16
Registros (Hymenoptera) en flor senescente	0.53345	2.2e-16	7.7234	7.083e-05

iguales, Toma de decisión: $P < 0.05$, se rechaza la H_0 .