

Aumento de las visitas florales de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) en cultivos al usar la feromona de Nasonov sintética

Increase of the flower-visit by *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) in crops by the use of the synthetic Nasonov pheromone

Raúl Pardo P.¹
Giomar Nates P.²

Resumen

El objetivo del trabajo fue determinar si mediante la aplicación de la feromona de Nasonov sintética puede incrementarse el número de visitas florales de la abeja común, *Apis mellifera* L., en algunos cultivos, con miras a mejorar la polinización. Inicialmente se probó la atracción individual de la mayoría de los componentes de la feromona (Neral, Nerol, (Z,E) Citral, Geraniol y los ácidos geránico y nerólico) en una fuente de alimento artificial, consistente en dos cajas de petri con sacarosa al 50%, la cual era reemplazada en el momento de hacer una prueba, en una de las cajas, por papel de filtro impregnado con el componente a ensayar, mientras que la otra servía de patrón; luego se registró el número de abejas que se posaban sobre cada caja. Con base en los resultados de estas pruebas se preparó una mezcla de componentes que se probó en un cultivo de fresa; allí se construyó un invernadero dividido en cuatro parcelas de 9 m² y en el centro se colocó una colmena; la feromona se aplicó en dos parcelas, mientras las dos restantes actuaron como patrón, luego se registró el número de visitas florales. Los componentes más atractivos de la feromona de Nasonov fueron: Nerol (200 µg), Neral (50 µg) y (Z,E) Citral (100 µg); poco atractivos resultaron el Geraniol y los ácidos geránico y nerólico. La mezcla de componentes obtenida fue: Neral: 1, (Z,E) Citral: 2, Nerol: 4, Geraniol: 2, ácidos geránico y nerólico: 2. Esta mezcla

resultó ser mucho más atractiva que cualquier componente solo, y al aplicarse sobre el cultivo de fresa aumentó el número de visitas florales, lo que sugiere la posibilidad de su uso como atrayente para incrementar la polinización y producción de los cultivos.

Palabras Claves: Abeja común, *Apis mellifera*, Polinización, Acido geránico, Acido nerólico, (Z,E) Citral, Geraniol, Neral, Nerol, Feromona de Nasonov.

Summary

The aim of this study was to determine whether the application of the synthetic Nasonov pheromone could increase the number of flower-visits by the honey bee *Apis mellifera*, and consequently improve crop pollination. Initially, the attraction-power of most of the pheromone individual components (Neral, Nerol, (Z,E) Citral, Geraniol and Geranic and Nerolic acids) was tested. First, the bees were trained to visit an artificial food source (two petri dishes containing 50% sucrose). Then, the food in one petri dish was replaced by filter paper impregnated with the component to be tested, while the other remained as a control. The number of bees visiting each dish was recorded. Based on the results obtained, a mixture of the components was prepared and tested in a strawberry field. A greenhouse was built into the field and divided into four plots of 9 m², with a beehive in the center. The pheromone was applied to two of the plots and the others served as controls. The number of visits to the flowers was then recorded. The most attractive components of the Nasonov pheromone were: Nerol (200 µg), Neral (50 µg) and (Z,E) Citral (100 µg). Geraniol, and Geranic and Nerolic acids were the least attractive. The mixture of Neral: 1; (Z,E) Citral: 2; Nerol: 4; Geraniol: 2; and Geranic and Nerolic acids: 2; proved to

be more attractive than any one of the individual components alone, and when this mixture was spread over the strawberry field, the number of flower visits increased. These results suggest that the Nasonov pheromone could be used to attract honeybees and thus improve pollination and crop productivity.

Introducción

Una tercera parte de la alimentación de los países desarrollados procede directa o indirectamente de plantas entomófilas, en las cuales el estudio de la polinización por insectos tiene un lugar privilegiado. La abeja común, *Apis mellifera* L., ha mostrado ser, en términos generales, el mejor polinizador. En los Estados Unidos, cerca de la mitad de las 4,3 millones de colmenas que existen son alquiladas para polinizar cultivos y las ganancias obtenidas, gracias a ellas, se calculan en 3,2 billones de dólares (Robinson et al. 1989), esto demuestra el valor que tiene la abeja para la agricultura.

Debido a que los cultivos atraen las abejas en diferente grado, en los últimos años se ha venido trabajando para mejorar la atracción y polinización de los que son poco atractivos, hasta el punto de que ya se han registrado varios productos comerciales, aunque su eficacia es discutible. Burgett y Fisher (1979) no tuvieron éxito al aplicar, en trébol rojo, el «Beeline», un suplemento alimenticio que contiene azúcares, grasas, minerales, vitaminas y polen; lo mismo le sucedió a Rajotte y Fell (1982) al tratar manzanos con «Beelure», compuesto principalmente por una mezcla de azúcares. Recientemente, Loper y Roselle (1991) ensayaron «Beescent», mezcla de una feromona no específica y otros atrayentes naturales, sobre patilla, obteniendo un incremento en el número de visitas florales pero no en la producción; el mayor logro parece haberlo obtenido Mayer et al. (1989), quienes mostraron que el «Beescent» incrementó tanto las visitas como la producción en manzano, cerezo y peral. Otros compuestos probados son las feromonas de las glándulas mandibulares de la reina, con las cuales Currie et al. (1992 a,b) demostraron un aumento en visitas y producción en peral y arandano, y sólo de visitas en manzano.

¹ Biólogo. Instituto Nacional de Salud, Grupo de Entomología. Apartado Aéreo 80080. Santafé de Bogotá, D.C., Colombia.

² M.Sc. Profesora Asociada, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. Apartado Aéreo 23227. Santafé de Bogotá, D.C., Colombia.

Además de las anteriores sustancias se ha visto que la feromona de Nasonov, producida por la glándula del mismo nombre y ubicada debajo de la base del VII tergo abdominal de la abeja obrera (Fig. 1) podría usarse con los mismos fines, pues tiene entre otras funciones la de atraer compañeras a fuentes de alimento. La feromona está compuesta por siete sustancias terpenoides: Geraniol, ácidos geránico y nerólico, Neral ([Z] Citral), Geranial ([E] Citral), Nerol y (E,E) Farnesol (Pickett et al. 1980), las que en buena parte son de relativa fácil consecución. Con relación a su poder de atracción se ha probado que los componentes sintéticos de la feromona atraen abejas a fuentes de alimento artificial, ya sea individualmente o en mezcla, y presentan un efecto de aditividad (Williams et al. 1981); sin embargo, son escasas las pruebas realizadas en cultivos, las cuales indican un aumento en el número de visitas florales (Free 1987).

Materiales y Métodos

El trabajo se realizó en la Universidad Nacional de Colombia, en Santafé de Bogotá, D.C., con colmenas del apiario perteneciente al Laboratorio de abejas del Departamento de Biología. A 80 m del apiario se montaron dos estaciones de trabajo, y en cada una se entrenó un grupo de abejas de una colmena para hacer visitas diarias en busca de alimento artificial (sacarosa al 50%). Cada estación tenía cuatro puntos de alimentación dispuestos a 30 cm de altura, en los cuales el alimento se rotaba del uno al otro a intervalos de 15 min., previo el retiro de las abejas que lo estaban consumiendo, con el fin de obligarlas a buscarlo en cualquiera de los otros puntos, simulando así las condiciones de forrajeo natural, en donde las abejas visitan muchas fuentes de alimento y mantienen expectativa por él (Fig. 2a). Inmediatamente antes de cada prueba, las abejas debían estar alimentándose en los puntos más retirados de la colmena de entrenamiento. El alimento se colocó en dos cajas de petri de 9 cm de diámetro, cubiertas con mallas metálicas con orificios de 16 mm², y dispuestas sobre una lámina rectangular de vidrio de

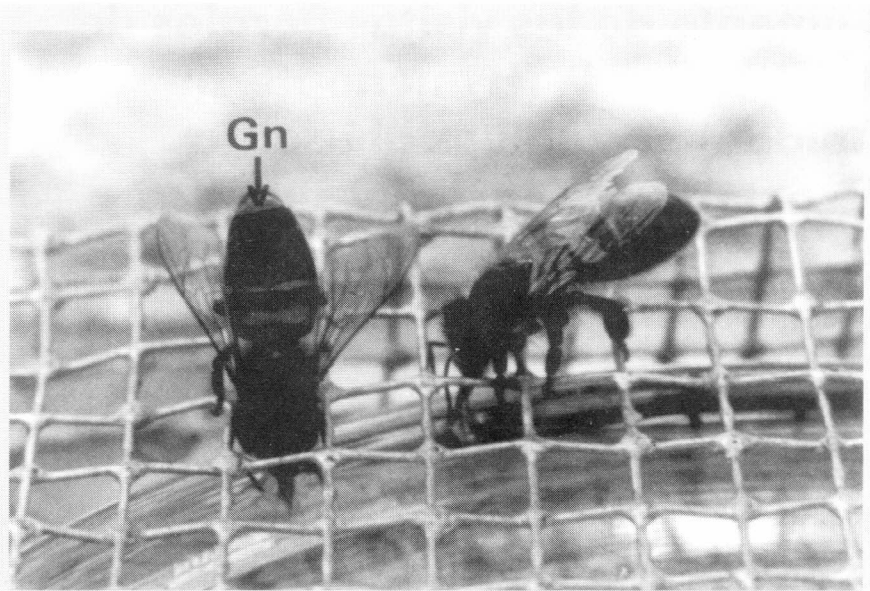


Figura 1. Abeja obrera exponiendo la glandula de Nasonov (Gn) en una fuente de alimento artificial (Sacarosa 50%). (Foto: Francisco Ceballos)

825 cm², a la cual estaban adheridos dos círculos de papel blanco de 7 cm de diámetro, distanciados 30 cm entre sí, con el objeto de que al ensayar la feromona o sus componentes, el aspecto del punto de alimentación fuera el mismo que cuando se alimentaba, como se verá más adelante.

En el momento de cada prueba, de 100 a 200 abejas debían estar alimentándose; entonces, se retiraba el alimento y en el punto de enfrente se colocaban dos cajas de Petri con sus respectivas mallas sobre otra lámina de vidrio, cada caja contenía 5 círculos de papel de filtro Wattman No. 1 de 7 cm de diámetro, sobre los cuales se depositaban las sustancias a ensayar. En una caja (A) se colocaba 1 ml de solución de feromona o componente en aceite mineral, mientras en la otra (B) sólo aceite, actuando ésta como patrón (Fig. 2b). Dos observadores contaban las abejas tan pronto como se iban posando sobre las mallas de cada caja; a intervalos de 2,5 min se invertía la ubicación de las cajas para prevenir el efecto de posición, a la vez que las mallas se cambiaban por otras limpias para evitar la influencia de la feromona huella.

Se probaron seis de los siete componentes de la feromona de Nasonov. Individualmente se ensayaron: Geraniol, Neral

([Z] Citral) y Nerol, y en mezcla los ácidos geránico y nerólico. El Geranial se probó como (Z,E) Citral, en donde está en mezcla con su isómero Neral. Los ácidos se elaboraron en los laboratorios de química de la Universidad Nacional de Colombia, en Santafé de Bogotá; el resto de componentes fueron donados por BASF Química Colombiana S.A. y Lucta Grancolombiana Ltda. Cada componente fue examinado en concentraciones de 50, 100 y 200 µg. Con base en lo anterior se seleccionó la concentración en que cada uno actuaba mejor y se hizo una mezcla de feromona que también se ensayó; además se determinó por cuánto tiempo mantenía su efecto haciendo pruebas a las 2, 4, 6, 8 y 96 h después de preparada. Cada prueba duró 10 min y se repitió 10 veces. En promedio se hicieron tres repeticiones por día por estación, entre las 8:30 y las 17:00 h, en donde la temperatura no debía ser menor de 15°C ni mayor de 23°C, con ausencia de lluvia y viento. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Chi cuadrado (X²) con p<0,005.

Efecto de la Aplicación de la Feromona de Nasonov en un Cultivo de Fresa

La mezcla de feromona de Nasonov obtenida inicialmente se aplicó sobre flores de

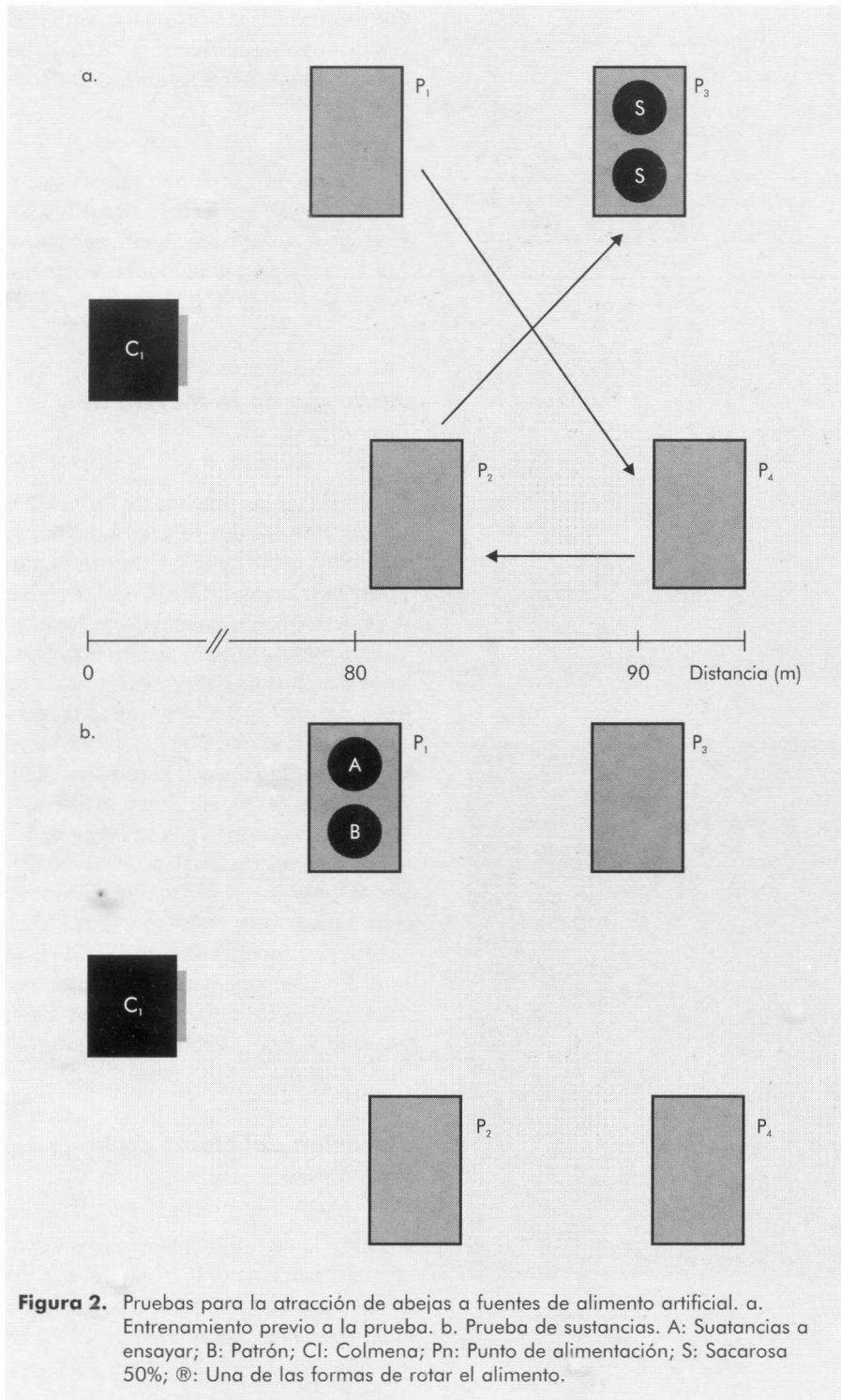


Figura 2. Pruebas para la atracción de abejas a fuentes de alimento artificial. a. Entrenamiento previo a la prueba. b. Prueba de sustancias. A: Sustancias a ensayar; B: Patrón; C1: Colmena; Pn: Punto de alimentación; S: Sacarosa 50%; @: Una de las formas de rotar el alimento.

un cultivo de fresa (*Fragaria ananassa* var. Douglas) ubicado en el municipio de Engativá, anexo a Santafé de Bogotá, D.C. Dentro del cultivo se construyó un invernadero de 6 x 6 x 2 m que se dividió en cuatro parcelas de 3 x 3 m; en el centro se colocó una colmena conformada por su reina y seis panales cubiertos con abe-

jas. La feromona se aplicó con atomizador manual sobre dos de las cuatro parcelas, una de enfrente a la piquera de la colmena y la otra correspondiente a la parte posterior opuesta, en cantidad de 5,7 ml de mezcla en aceite mineral, mientras que a las otras dos parcelas, que actuaron como patrón, sólo se les aplicó aceite.

En el momento de cada prueba, un observador por parcela contó el número de visitas florales durante 10 min. En cada prueba se obtuvo un solo dato de visitas en parcelas con o sin feromona, sumando los resultados de las dos parcelas respectivas. Para verificar que las abejas tuvieran la misma probabilidad de visitar cualquier parcela se registró el número de visitas antes de cada prueba. Se hicieron 10 repeticiones por prueba, dejando un día de por medio entre cada repetición. Durante todo el trabajo se llevó un registro de la temperatura dentro del invernadero. El análisis estadístico se hizo aplicando la prueba de "t" de Student para muestras dependientes.

Resultados y Discusión

Atracción de los Componentes Individuales de la Feromona

Cada componente actúa mejor en una concentración determinada. El más atractivo parece ser el Nerol (200 µg), seguido del Neral (50 µg) y el (Z,E) Citral (100 µg); el Geraniol (100 µg) y los ácidos geránico y nerólico (100 µg) resultaron poco atractivos (Tabla 1).

En las pruebas con Nerol, los resultados fueron contrarios a los reportados por Williams et al. (1981), quienes encontraron que la concentración de 200 µg era poco atractiva. Debido a que son escasos los trabajos con este componente, es difícil discutir a fondo los resultados.

Con respecto al Neral, los resultados concuerdan con los de Williams et al. (1981) para la concentración de 200 µg, en la cual el componente es poco atractivo; el presente trabajo se encontró que a una concentración más baja (50 µg), el componente se hace más atractivo.

En cuanto al (Z,E) Citral se ratifica que es más atractivo que el Geraniol (Weaver et al. 1964). Además, se confirma que el Geraniol es uno de los componentes menos atractivos (Williams et al. 1981). Por último, la poca atracción de los ácidos geránico y nerólico, contrario a la literatura que indica que son muy atractivos

Tabla 1. Efecto de los componentes individuales de la feromona de Nasonov sobre la atracción de abejas.

Componente	Concentración de cajas de petri (Mg)		No. pruebas de 10 en que A ó B reciben significativamente más visitas		No. total de abejas que posan sobre A ó B (Promedio de 10 pruebas)	
	A	B	A	B	A	B
	Nerol	50	0	2	0	65
	100	0	5	0	55	40
	200	0	10	0	100	14
Neral ([Z] Citral)	50	0	9	0	115	37
	100	0	7	1	75	49
	200	0	6	1	83	69
(Z, E) Citral	50	0	6	0	141	81
	100	0	8	0	125	77
	200	0	7	0	183	125
Geraniol	50	0	3	0	58	42
	100	0	5	0	59	40
	200	0	3	0	47	43
Acidos geránico y nerólico	50	0	1	0	52	45
	100	0	3	0	69	56
	200	0	3	0	66	52

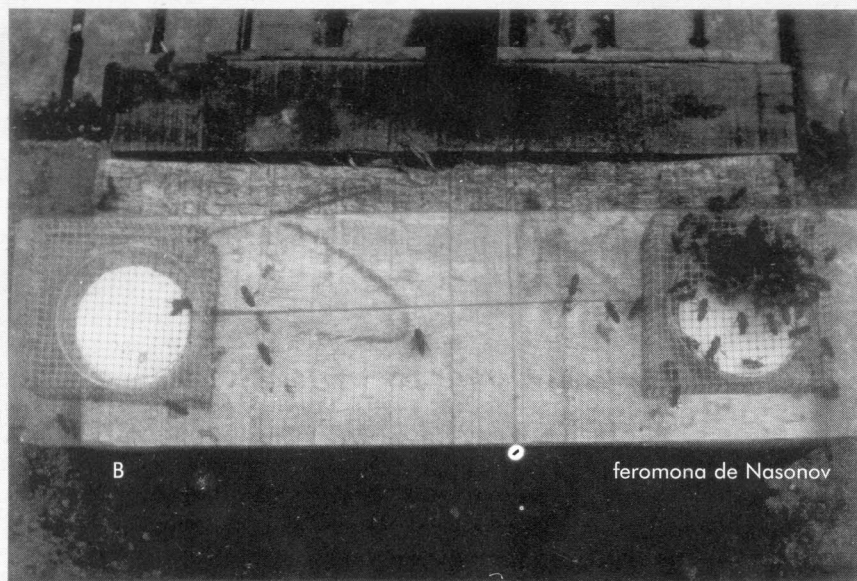


Figura 3. Abejas atraídas por la feromona de Nasonov sintética. B: Patrón. (Foto: Francisco Ceballos)

(Boch y Shearer 1964; Williams et al. 1981), puede explicarse en que no se ensayaron en estado puro, debido a fallas al obtener los ácidos en el laboratorio, impidiendo así una valoración correcta de su efecto.

Los resultados indican que la variación en concentración, dentro del rango ensaya-

do (50-200 µg), influye de diferente forma en la atracción de cada componente. Para el Nerol, al aumentar la concentración aumenta el poder de atracción; para el Neral ocurre lo contrario y la mayor atracción se logra con la concentración más baja; para otros componentes como Geraniol ([Z,E] Citral), Geraniol y los ácidos geránico y nerólico, la concentra-

ción óptima fué la intermedia, perdiendo o al menos no modificándose la atracción con concentraciones superiores o inferiores.

Con relación a los patrones puede decirse, en general, que de los 150 realizados, ninguno recibió visitas significativas (Tabla 1), a excepción de dos repeticiones, una con Neral (100 µg) y otra con (200 µg).

Atracción de la Mezcla de Feromona

Con base en las pruebas de los componentes individuales se determinó que la feromona debía tener las siguientes proporciones: Neral: 1, (Z,E) Citral: 2, Nerol: 4, Geraniol: 2, ácidos Geránico y Nerólico: 2. Esta mezcla, diferente a la encontrada en la glándula de Nasonov (Pickett et al. 1980), resultó fuertemente atractiva para las abejas (Fig. 3), a tal grado que luego de retirada la caja con feromona, algunas abejas la seguían con insistencia, cosa que no ocurrió con ninguno de los componentes. En las 10 pruebas realizadas, la feromona recibió significativamente más visitas que el patrón (Fig.4). Lo anterior corrobora el efecto de aditividad para los componentes ya planteado por algunos autores (Boch y Shearer 1964; Shearer y Boch 1966; Williams et al. 1981).

Duración del Efecto de la Feromona

La mezcla de feromona mantuvo su poder de atracción por lo menos hasta ocho horas después de preparada (Fig.5), a una temperatura promedio de 17°C. En las 50 pruebas llevadas a cabo, hasta este tiempo, la feromona siempre recibió significativamente más visitas. Con relación a las pruebas realizadas a las 96 horas, en sólo cinco de las 10 hechas, la feromona tuvo más visitas y una prueba fue significativa para el patrón, lo que indica que a este tiempo ha perdido gran parte de su poder. Comparada con la mezcla preparada por Williams et al.(1981), que mantuvo su poder por cuatro horas a 20°C, la

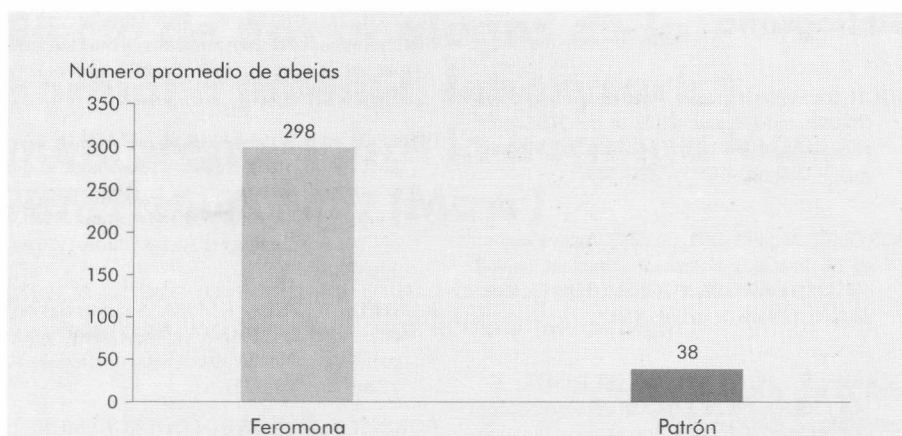


Figura 4. Atracción de la feromona de Nasonov a fuentes de alimentación artificial.

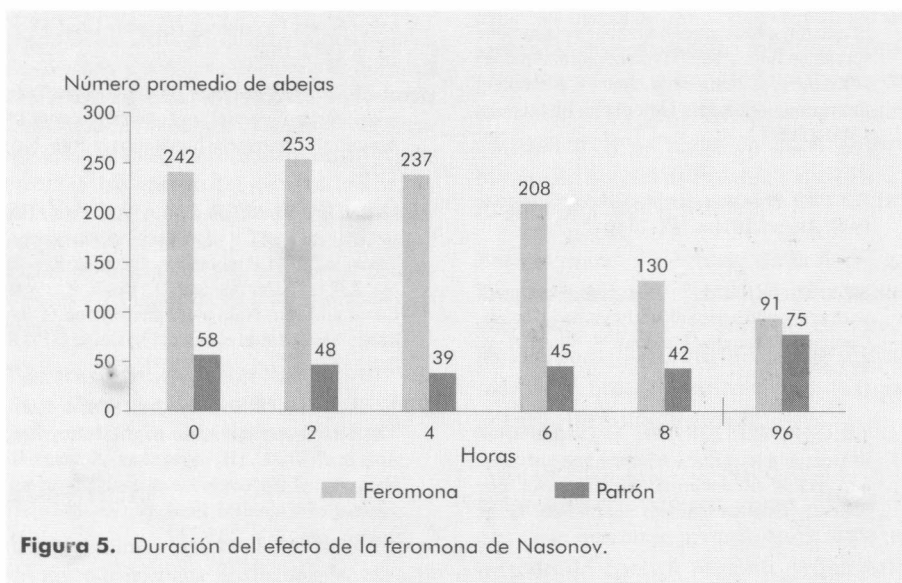


Figura 5. Duración del efecto de la feromona de Nasonov.

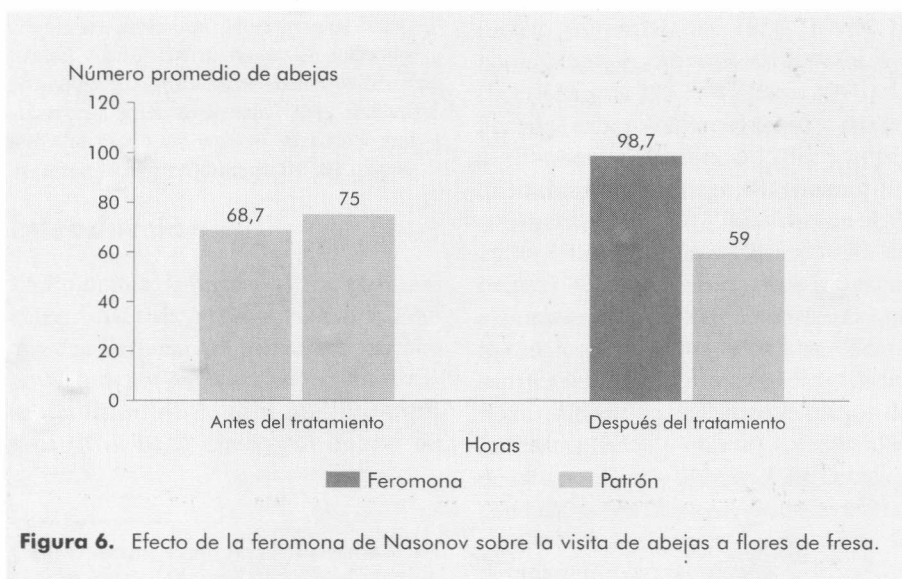


Figura 6. Efecto de la feromona de Nasonov sobre la visita de abejas a flores de fresa.

presente mezcla dura mucho más tiempo; la diferencia puede deberse a que aquí se usaron cantidades mayores de algunos componentes, la de (Z,E) Citral fue 15 veces mayor y la de Nerol 20; además, la temperatura, bajo la cual se hicieron las pruebas, fue menor, lo que disminuye la evaporación de los componentes, permitiendo que la mezcla dure más tiempo.

Aplicación de la Mezcla de Feromona a un Cultivo de Fresa

En el análisis de las pruebas realizadas antes del tratamiento se determinó, mediante la prueba de "t" de Student con intervalo de confianza del 95%, que no había diferencia significativa entre las visitas ($T_c=0,89$), lo que confirma que las abejas no tenían preferencia por ninguna parcela (Fig. 6). La aplicación de la misma prueba estadística al rociar las plantas con la feromona, mostró diferencia significativa entre ésta y el patrón ($T_c=2,71$), evidenciando que la feromona, de Nasonov es la responsable del incremento en la atracción de abejas (Fig. 6). Un aspecto importante que debe mencionarse es que las abejas visitaron, en general, sólo las flores y no otras estructuras, como ha ocurrido en trabajos anteriores (Waller 1970).

El éxito en el incremento de visitas florales con el uso de la feromona de Nasonov en proporciones diferentes a las reportadas en la glándula puede deberse a que como es usada en varias situaciones, cada una requiere una mezcla determinada; en el caso de la atracción a flores, la feromona preparada parece ser adecuada. El poder de atracción podría aún mejorarse si se probaran ácidos geránico y nerólico de óptima calidad y se adicionara el Farnesol, componente que no fué ensayado. Además, debe tenerse en cuenta la existencia de otras sustancias que han demostrado su efectividad en el incremento de visitas y polinización, como el «Beescent» y la feromona de la glándula mandibular de la reina; mientras, por otra parte se ha encontrado evidencia de una nueva feromona que repele las visitas florales (Giurfa y Nuñez 1992). Esto muestra que el ambiente químico que rodea la atracción floral es complejo y

aunque los resultados obtenidos hasta hoy son buenos, falta mucha investigación.

Conclusiones

- De los componentes de la feromona de Nasonov ensayados, los más atractivos fueron: el Nerol, Neral y (Z,E) Citral; poco atractivos resultaron el Geraniol y los ácidos geránico y nerólico, aunque con estos últimos hay algunas dudas debidas al grado de pureza.
- Al ser mezclados en proporción de Neral: 1, (Z,E) Citral: 2, Nerol: 4, Geraniol: 2, ácidos geránico y nerólico: 2, son más atractivos que cualquier componente solo y mantienen su poder por lo menos hasta ocho horas después de preparada la mezcla y expuesta al medio ambiente con temperatura promedio de 17°C.
- Al aplicar la feromona sobre flores de fresa se incrementa el número de visitas florales bajo condiciones de invernadero y con temperatura promedio de 29°C. La feromona de Nasonov sintética obtenida es un atractivo floral que podría utilizarse para mejorar la polinización de cultivos.

Bibliografía

- BOCH, R.; SHEARER, D. 1964. Identification of Nerolic and Geranic acids in the Nasonoff pheromone of the honey bee. *Nature (Inglaterra)*. v. 202 no. 4929, p. 320-321.
- BURGETT, M.; FISHER, G. 1979. An evaluation of Beeline as a pollinator attractant on red clover. *American Bee Journal (Estados Unidos)*. v. 119 no. 5, p. 356-357.
- CURRIE, R.; WINSTON, M.; SLESSOR, K.; MAYER, D. 1992a. Effect of synthetic queen mandibular pheromone sprays on pollination of fruit crops by honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal Economic Entomology (Estados Unidos)*. v. 85 no. 4, p. 1293-1299.
- ; —————; —————. 1992b. Effect of synthetic queen mandibular pheromone sprays on honey bee (Hymenoptera: Apidae) pollination of berry crop. *Journal Economic Entomology (Estados Unidos)*. v. 85 no. 4, p. 1300-1306.
- FREE, J. 1987. *Pheromones of social bees*. Comstock Publ. Assoc., Ithaca, NY. 218p.
- GIURFA, M.; NUNEZ, J. 1992. Honeybee mark with scent and reject recently visited flowers. *Oecologia (Estados Unidos)*. v. 89 no. 1, p. 113-117.
- LOPER, G.; ROSELLE, R. 1991. Experimental use of Beescent to influence honey bee visitation and yields of watermelon. *American Bee Journal (Estados Unidos)*. v. 131 no. 12, p. 777.
- MAYER, D.; BRITT, R.; LUNDEN, J. 1989. Evaluation of Beescent as a honey bee attractant. *American Bee Journal (Estados Unidos)*. v. 129 no.1, p. 41-42.
- PICKETT, J.; WILLIAMS, I.; MARTIN, A.; SMITH, M. 1980. Nasonov pheromone of the honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). I. Chemical characterization. *Journal of Chemical Ecology (Estados Unidos)*. v. 6 no. 2, p. 425-434.
- RAJOTTE, E.; FELL, R. 1982. A comercial bee attractant ineffective in enhancing apple pollination. *HortScience (Estados Unidos)*. v. 17 no. 2, p. 230-231.
- ROBINSON, W.; NOWOGRODZKI, R.; MORSE, R. 1989. The value of honey bees as pollinators of U.S. Crops. *American Bee Journal (Estados Unidos)*. v. 129 no. 6, p. 411-423.
- SHEARER, D.; BOCH, R. 1966. Citral in the Nasonoff pheromone of the honey bee. *Journal of Insect Physiology (Estados Unidos)*. v. 12, p. 1513-1521.
- WALLER, G. 1970. Attracting honey bees to alfalfa with Citral, Geraniol and Anise. *Journal of Apicultural Research (Inglaterra)*. v. 9 no. 1, p. 9-12.
- WEAVER, N.; WEAVER, E.; LAW, J. 1964. The attractiveness of Citral to foraging honey bees. Texas A. & M. University, Progress Report No. 2324. 7p. *In*: Shearer D.; Boch, R. 1966. Citral and The Nasonoff pheromone of the honey bee. *Journal of Insect Physiology (Estados Unidos)*. v. 12, p. 1513-1521.
- WILLIAMS, I.; PICKETT, J.; MARTIN, A. 1981. The Nasonov pheromone of the honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). II. Bioassay of the components using foragers. *Journal of Chemical Ecology (Estados Unidos)*. v. 7 no. 2, p. 225-237.