Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Comportamiento recolector de la abeja Apis mellifera en cultivos comerciales: estudios descriptivos y evaluación de herramientas que mejoran su eficacia como polinizador

Susic Martín, Cinthia S.

2015-04-01

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Susic Martín, Cinthia S.. (2015-04-01). Comportamiento recolector de la abeja Apis mellifera en cultivos comerciales: estudios descriptivos y evaluación de herramientas que mejoran su eficacia como polinizador. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Susic Martín, Cinthia S.. "Comportamiento recolector de la abeja Apis mellifera en cultivos comerciales: estudios descriptivos y evaluación de herramientas que mejoran su eficacia como polinizador". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-04-01.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Comportamiento recolector de la abeja *Apis mellifera* en cultivos comerciales: estudios descriptivos y evaluación de herramientas que mejoran su eficacia como polinizador

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Cinthia S. Susic Martín

Director de Tesis: Profesor Dr. Walter M. Farina

Consejero de Estudios: Profesor Dr. Walter M. Farina

Lugar de trabajo: Grupo de Estudio de Insectos Sociales. IFIBYNE-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2015

Fecha de defensa: 1 de Abril de 2015

Comportamiento recolector de la abeja *Apis mellifera* en cultivos comerciales: estudios descriptivos y evaluación de herramientas que mejoran su eficacia como polinizador

En esta Tesis se estudiaron aspectos del comportamiento recolector de la abeja *Apis mellifera* vinculados con el rendimiento de diferentes cultivos agrícolas. Estos estudios abarcaron la descripción de la conducta de la abeja en campos de girasol *Helianthus annuus* (L.) cultivados para producir semilla híbrida (girasol-semilla) y la evaluación de los efectos de formulaciones sintéticas aplicadas en colmenas que se utilizaron para la polinización de cultivos de girasol-semilla, de manzana *Malus domestica* (L.) y de pera *Pyrus communis* (L.). El comportamiento recolector de la abeja melífera en cultivos de girasol-semilla fue estudiado en campos con líneas parentales macho fértil (MF) y macho estéril (ME) que presentaban distinto grado de variabilidad morfológica. En todos los casos evaluados, las abejas mostraron una marcada constancia por visitar inflorescencias del mismo parental, conducta que disminuye su potencialidad para transferir polen desde las líneas MF hacia las ME. Este comportamiento fue aun más marcado en cultivos cuyos parentales presentaron acentuadas diferencias morfológicas. Los resultados obtenidos sugieren que en campos con parentales dimórficos la transferencia de polen tiene lugar en las colmenas por medio de contactos corporales entre abejas ubicadas en la entrada del nido. Estos individuos facilitarían el intercambio de polen entre las abejas que retornan y las que parten a recolectar. También se estudió el efecto de herramientas tendientes a mejorar la eficiencia polinizadora de la abeja melífera. Para ello se evaluó el uso de formulaciones sintéticas que imitan olores florales en colmenas utilizadas para polinizar cultivos de las tres especies agrícolas previamente mencionadas. Se aplicó Facilitador Girasol (FG) en colmenas ubicadas en cultivos de girasol-semilla. Las colmenas tratadas con FG presentaron mayores niveles de actividad que las colmenas control, tanto en el número de abejas ingresantes como en la densidad de abejas en el cultivo adyacente a las mismas. El rendimiento informado por cosechadoras con sistema GPS evidenció aumentos de al menos un 25% en los lotes aledaños a las colmenas tratadas. En colmenas situadas en cultivos de manzana se aplicó el Facilitador Manzana (FM), y su utilización incrementó el rendimiento en al menos un 15%. Esto se observó contabilizando los frutos por árbol en las cercanías de las colmenas tratadas y a partir del análisis de los datos de rendimiento proporcionados por el establecimiento en donde se desarrolló el estudio. Finalmente, en cultivos de pera se aplicó el Facilitador Pera (FP) en las colmenas utilizadas para realizar el servicio de polinización de los mismos. Se monitoreó la actividad, la recolección de polen y el desarrollo del área de cría de las colmenas, y el rendimiento final de los cultivos lindantes. La actividad de las colmenas tratadas con FP no difirió de la de las colmenas control. En las colmenas expuestas a FP, el peso de las cargas de polen fue significativamente superior al de las colmenas control, así como también el área de cría. Finalmente, el rendimiento obtenido contabilizando el número de frutos por árbol en las cercanías de las colmenas tratadas mostró un incremento promedio del 20%. Estos resultados permiten concluir que las estimulaciones cultivo-específicas realizadas en colmenas de abejas melíferas promueven la actividad de este insecto en el campo, además de mejorar el estado sanitario de las colmenas e incrementar el rendimiento de los cultivos. Estos aspectos permiten considerar a estas estimulaciones como herramientas adecuadas para un sistema agrícola que debe ser cada vez más rentable, pero además sustentable y amigable con el medio ambiente.

Palabras clave: polinización entomófila, cultivos comerciales, formulaciones sintéticas, *Apis mellifera*, *Helianthus annuus*, *Malus domestica*, *Pyrus communis*.

Honeybee *Apis mellifera* foraging behavior in commercial crops: descriptive studies and assessment of tools that improve its pollination efficiency

In this Thesis we studied aspects of the honeybee foraging behavior that concern crop yield in different agricultural settings. We described its behavior in sunflower *Helianthus annuus* (L.) crops for hybrid seed production and studied the effects of synthetic mixes applied in hives used to pollinate sunflower hybrid seed crops, apple *Malus domestica* (L.) crops, and pear *Pyrus communis* (L.) crops. Studies on honeybee foraging behavior at sunflower hybrid seed crops were pursued at fields with Male Fertil (MF) and Male Sterile (MS) parental lines that showed variable dimorphism between them. Honeybees showed constancy on inflorescences within each parental, and therefore a decreased potential to transfer pollen from MF to MS lines. This behavior was even more persistent at fields whose parentals differed sharply. Our results suggest that at fields with dimorphic parentals the transfer of pollen occurs by means of body contacts between bees at the hive entrance. Individuals remaining at the hive entrance would enable pollen transference between incoming bees and those departing to forage. We also studied the effect of tools which tend to improve honeybee pollination efficiency. We evaluated the application of synthetic mixes that mimic flower odors in hives pollinating crops of the three previously mentioned agricultural species. We applied Sunflower Synthetic Mix (SSM) in hives located at sunflower hybrid seed crops. Activity in hives with SSM was higher both in terms of number of incoming bees and honeybee density in the crop. Yield revealed by GPS harvesters showed a 25% increase in crops adjacent to treated hives. We applied Apple Synthetic Mix (ASM) in hives used to pollinate apple crops, and recorded an increment of at least 15% regarding yield levels. This result was obtained by counting fruits at trees in the hives' surrounding and analyzing final yield data provided by the farmers. Finally, at pear crops we applied Pear Synthetic Mix (PSM) in hives pollinating them. We recorded activity, pollen gathering and brood area in hives, as well as nearby crop yield. Activity in hives treated with PSM did not differ from control ones. Pollen load weight in PSM hives was significantly higher than in control ones, and the same was true for brood area. Finally, when we counted the amount of fruits per tree at the vicinity of the treated hives, we obtained a 20% increasing mean. Our results suggest that treatment of honeybee hives with crop-specific synthetic mixes promotes the activity of this insect in the field, improves hive health conditions and increases crop yield. As a result, these treatments should be considered appropriate tools within the context of an agricultural system which must be much more profitable as well as sustainable and environmentally friendly.

Keywords: insect pollination, crops, synthetic mix, *Apis mellifera*, *Helianthus annuus*, *Malus domestica*, *Pyrus communis*.

Agradecimientos

Agradezco a la vida y a la evolución profesional y espiritual que me atravesó durante esta etapa. A la naturaleza y a las abejas que me dejaron conocerlas un poco más, a la fascinación que me producen, al gran amor y al profundo respeto que despiertan en mí.

Gracias a INSSOC, el grupo de trabajo que materializó este deseo de trabajar en polinización: a Walter por dirigir la tesis y a todos los que estuvieron siempre, ya se fueron del labo o se incorporaron hace poco: Gonza Jijita, Elba, Gabi, Anita, Sol, Fran, Pau, Ceci, Roxy y especialmente a los compartieron su tiempo y su trabajo conmigo en las campañas: Caro, Andres Diego, Juan "P" (infinitas gracias!). Gracias Ali por cuidar y querer a Valen! Gracias a todos porque como grupo y muchos también individualmente me acompañaron, me contuvieron y me aconsejaron; gracias por los momentos divertidos y los de catarsis!. Gracias Héctor por compartir tus conocimientos, por las charlas y los mates!

Gracias a todos los que abrieron las puertas de sus establecimientos productivos: a Héctor Majo (Padre e Hijo) y a Chacra Coletti. Gracias a Kleppe S.A., especialmente al Ing. Iuorno por toda su colaboración!!; a Rodolfo y su esposa por toda su hospitalidad. Gracias Manje por toda tu ayuda y por todo lo que me enseñaste!! Gracias también a Tomás, otro gran ayudante de campo! Gracias a Hugo Minucchi y René Sardi de DOW por su cooperación.

A los que me acompañaron de cerca: Kito y a los incondicionales: mi hermano (y también Gaby y Moni!), Baby (y Mati!), a Nati (te extraño!). A mis amigas de siempre: Titi, Mari, Ceci, Lu, Loli, Caro, Vale y Dani; y a mi amiga Roma! A mis amigas del interior (jaja!): Nati y Marian. A mamá y a la abuelita porque siempre están conmigo.

Gracias a todos porque formaron parte de una etapa que recordaré con mucho cariño.

A mi hermano

Índice

1. Introducción General 1
1.1. La abeja *Apis mellifera* 1
1.1.1. La abeja melífera como modelo de estudio 2
1.1.2. La biología social de la abeja melífera 8
1.2. La polinización y su importancia en la producción agrícola 13
1.2.1. Polinización mediada por colmenas trashumantes 15
1.3. Cultivos dependientes del servicio de polinización 17
1.3.1. Cultivos de girasol 17
1.3.2. Cultivo de frutales 20
1.4. Desarrollos tendientes a incrementar la eficiencia polinizadora de la abeja melífera 23
1.4.1. Atractantes 23
1.4.2. Formulaciones sintéticas que imitan olores florales 24
1.5. Objetivos 28
1.5.1. Objetivos particulares e hipótesis 28
2. Polinización y constancia floral de la abeja melífera en cultivos de girasol *Helianthus annuus* para la producción de semilla híbrida 32
2.1. Introducción 32
2.1.1. Hipótesis 36
2.2. Materiales y Métodos 37
2.2.1. Sitio de estudio y animales 37
2.2.2. Morfología floral y estudios palinológicos 38
2.2.3. Comportamiento recolector de la abeja melífera en el cultivo 39
2.2.4. Adherencia del polen de girasol al cuerpo de abejas recolectoras y abejas de colmena 40
2.2.5. Estadística 42
2.3. Resultados 43
2.3.1. Morfología floral 43
2.3.2. Comportamiento recolector 47

2.3.3. Determinación de granos de polen de girasol adherido al cuerpo de las abejas....50
2.4. Discusión y conclusiones....51
3. Evaluación del efecto de un formulado sintético específico sobre el comportamiento recolector de la abeja melífera en cultivos de girasol para la producción de semilla híbrida....56
3.1. Introducción....56
3.1.1. Hipótesis....60
3.2. Materiales y Métodos....61
3.2.1. Sitio de estudio y animales....61
3.2.2. Estimulación olfativa de las colmenas....63
3.2.3. Actividad en las colmenas....64
3.2.4. Rendimiento del cultivo....65
3.2.5. Estadística....70
3.3. Resultados....71
3.3.1. Estimulación olfativa de las colmenas....71
3.3.2. Evaluación del efecto de un formulado sintético específico en la actividad recolectora....71
3.3.3. Evaluación del efecto de un formulado sintético específico en el rendimiento de los cultivos....75
3.4. Discusión y conclusiones....77
4. Evaluación del efecto de un formulado sintético específico sobre el comportamiento recolector de la abeja melífera en cultivos de manzana....82
4.1 Introducción....82
4.1.1 Hipótesis....89
4.2 Materiales y Métodos....90
4.2.1 Sitio de estudio y animales....90
4.2.2. Estimulación olfativa de las colmenas....94
4.2.3. Actividad en las colmenas y rendimiento del cultivo lindante....97
4.3 Resultados....100
4.4 Discusión y conclusiones....110
5. Evaluación del efecto de un formulado sintético específico sobre el comportamiento recolector de la abeja melífera en cultivos de pera....116
5.1 Introducción....116
5.1.1. Hipótesis....122
5.2 Materiales y Métodos....122

5.2.1. Evaluación del efecto de un formulado sintético específico sobre la actividad recolectora y el desarrollo del área de cría de la abeja melífera en cultivos de pera 122
5.2.1.1 Sitio de estudio y animales 122
5.2.1.2. Floración del cultivo 123
5.2.1.3. Estimulación olfativa de las colmenas 125
5.2.1.4. Actividad en las colmenas 126
5.2.1.5 Desarrollo del área de cría en las colmenas 128
5.2.1.6. Estadística 129
5.2.2. Evaluación del efecto de un formulado sintético específico sobre el rendimiento en cultivos de pera 130
5.2.2.1. Sitio de estudio y animales 130
5.2.2.2. Estimulación olfativa de las colmenas 132
5.2.2.3. Actividad en las colmenas y rendimiento del cultivo lindante 134
5.2.2.4. Estadística 135
5.3 Resultados 136
5.3.1 Evaluación del efecto de un formulado sintético sobre la actividad recolectora y el desarrollo del área de cría 136
5.3.2 Evaluación del efecto del formulado sintético sobre el rendimiento de los cultivos de pera 141
5.4 Discusión 144
6. Discusión General 148
7. Biliografía 156
8- Anexo 167

1. Introducción General

1.1. La abeja *Apis mellifera*

La abeja melífera y la especie humana comparten una larga historia a lo largo de la cual estos insectos fueron observados, estudiados, relatados, retratados y temidos. Estudios sobre su biología tanto individual como social se plasman en una extensa bibliografía que cuenta con descripciones tan antiguas como las de Aristóteles entre sus primeros capítulos (343AC; *Historia animalium*). Esta especie ha fascinado al hombre desde tiempos remotos por muchas de sus características sin iguales y entre ellas su miel. Los jeroglíficos del Templo del Sol (Egipto), y que datan del año 2400 AC (**Figura 1**) son los registros más antiguos de la práctica apícola, y dan testimonio de la sofisticada apicultura desarrollada por esa civilización.

Figura 1. Registro más antiguo de la práctica apícola. Jeroglífico en Templo del Sol construido en 2400 AC. El Cairo, Egipto.

1.1.1. La abeja melífera como modelo de estudio

La abeja melífera reconoce su entorno por medio de claves de distinta modalidad sensorial (visual, olfativa, auditiva y magnética, entre otras). Los estímulos visuales son percibidos a través de los ojos y los olfativos principalmente por medio de las antenas (von Frisch 1967; Winston 1987). La asombrosa capacidad que exhiben las abejas para distinguir y aprender colores, formas y olores es el resultado de 80 millones de años de co-evolución con las angiospermas (plantas con flor) y fue el tema central de investigación de Karl von Frisch desde principios del siglo XX (Menzel 1985). A él le siguieron un sinnúmero de estudios sobre aprendizaje y memoria que utilizaron a la abeja melífera como modelo de estudio (Menzel y Erber 1978; Menzel 1985; Giurfa 2007).

Aprendizaje asociativo

Entre los aspectos más estudiados del comportamiento de la abeja melífera se encuentra el aprendizaje asociativo. Durante este tipo de aprendizaje se establece una relación predictiva entre (al menos dos) eventos contingentes. En la naturaleza y durante los vuelos de recolección de las abejas estos dos eventos pueden ser, por ejemplo, las claves químicas de las flores y la recompensa que ofrecen (Menzel y Erber 1978). La relación predictiva establecida entre estos estímulos le permite a estos individuos reducir el nivel de incertidumbre de su entorno (Giurfa 2007).

El aprendizaje asociativo fue ampliamente estudiado en condiciones experimentales controladas. Uno de los protocolos utilizados para su estudio, en condiciones controladas, es el condicionamiento clásico o Pavloviano (Pavlov 1927).

Ivan Pavlov desarrolló este condicionamiento utilizando a un perro como sujeto experimental (**Figura 2**). Sus ensayos consistieron en hacer sonar una campana (estímulo condicionado o EC) anticipadamente a la presentación de alimento (estímulo incondicionado o EI) y medir la salivación generada en el animal (respuesta refleja). Este procedimiento permitió que el sujeto experimental asociara un estímulo originalmente neutro (el sonido de la campana) con otro biológicamente relevante (el alimento) que generaba la respuesta refleja de salivación en el individuo. Pavlov demostró de esta manera que si presentaba el sonido de la campana con cierta anticipación temporal al alimento durante varios ensayos, el sonido de la campana desencadenaría finalmente por sí solo la salivación (Pavlov 1927).

Figura 2. Dispositivo experimental utilizado para ensayos de condicionamiento clásico. El perro es el sujeto experimental. A la derecha de la foto se observa a Ivan Pavlov.

En el caso de la abeja melífera la herramienta más usada para estudiar las habilidades cognitivas vinculadas al aprendizaje asociativo, en condiciones experimentales controladas, es el condicionamiento olfativo clásico o Pavloviano. En ellos las abejas son inmovilizadas individualmente en tubos metálicos, como se observa en la **Figura 3**, de manera que su cabeza quede expuesta y puedan mover libremente sus antenas y piezas bucales (Frings 1944).

Figura 3. Abeja amarrada en cepo metálico para la realización de un ensayo de condicionamiento clásico. Como se observa en la foto, el individuo puede mover libremente sus antenas y piezas bucales.

Durante estos ensayos se presentan contingentemente un olor (EC) y una gota de solución azucarada que es ofrecida con un palillo sobre una de las antenas del animal (estímulo apetitivo que funciona como EI) (Takeda 1961; Bitterman, Menzel et al. 1983). La respuesta refleja (o incondicionada) comúnmente estudiada en estos individuos es la respuesta de extensión de probóscide (REP), que es un comportamiento que exhiben cuando este alimento líquido contacta sus antenas o tarsos (Frings 1944). La REP se condiciona a un olor cuando éste se presenta

solapado con la ingesta de solución azucarada en un orden y número de repeticiones definidos (Bitterman et al. 1983).

Los condicionamientos olfativos clásicos más utilizados son el condicionamiento absoluto y el condicionamiento diferencial (Takeda 1961; Bitterman et al. 1983). En el condicionamiento absoluto se presenta un olor que a priori representa un estímulo neutro, y que antecede o está solapado en el tiempo con la presentación de la recompensa (contacto de las antenas con una solución azucarada). Luego de sucesivas presentaciones pareadas de estos estímulos, seguidos de la ingesta de solución, se establece la asociación entre ambos estímulos (EC: olor y EI: solución azucarada). Así, el estímulo inicialmente neutro adquiere un valor predictivo y, como resultado del condicionamiento, su sola presentación desencadena la respuesta de extensión de probóscide (REP) (Takeda 1961). En el condicionamiento diferencial se evalúa la capacidad de un sujeto experimental de discriminar entre dos olores de los cuales sólo uno es recompensado (Bitterman et al. 1983). A lo largo del entrenamiento las abejas aprenden a discriminar entre ambos olores y a responder positivamente sólo al olor pareado a la recompensa (Giurfa 2003). Luego del condicionamiento se espera que la sola presencia del EC recompensado (EC+) desencadene la REP, y que el EC no recompensado (EC-) no la desencadene.

Discriminación y generalización de olores

Otro de los aspectos estudiados en detalle en la abeja melífera son los comportamientos de discriminación y generalización de olores florales. En cada

vuelo recolector las abejas exhiben fidelidad a una especie floral particular distinguiendo, a partir de claves químicas y visuales entre fuentes de recursos. A este comportamiento se lo denomina constancia floral (Grant 1950; Free 1963; von Frisch 1967; Waser 1986; Goulson 1999). Además, y dado que un estímulo en la naturaleza raramente se presenta de manera idéntica dos veces, estos insectos también reconocen indicadores de los estímulos (Pelz et al. 1997). Es decir, si la información que adquieren en dos fuentes de recursos comparte ciertas características, las abejas responderán en ambas fuentes de recursos con un comportamiento similar. A este comportamiento se lo denomina generalización. Los estudios de discriminación y generalización realizados bajo el paradigma del condicionamiento olfativo clásico, y que se detallarán a continuación, permiten reproducir y estudiar en profundidad ambos comportamientos (Pearce 1987; Bhagavan y Smith 1997; Pelz et al. 1997).

En el contexto del condicionamiento clásico, y dado un comportamiento desencadenado por un estímulo condicionado, se habla de generalización cuando un segundo estímulo similar pero no idéntico, promueve la misma respuesta comportamental (Bhagavan y Smith 1997; Ghirlanda y Enquist 2003). Al contrario, durante la discriminación, los estímulos son percibidos como diferentes y desencadenan respuestas comportamentales distintas. En abejas melíferas se observó generalización olfativa entre olores puros que presentan distintos grupos funcionales y el mismo largo de cadena carbonada (Guerrieri et al. 2005). Por el contrario, mezclas conformadas por los mismos compuestos pero en distinta

proporción (Wright et al. 2008) y distintas concentraciones de un mismo olor (Ditzen et al. 2003) pueden ser discriminadas por estos insectos.

La importancia de los olores en el contexto de la recolección de recursos de la abeja trasciende la orientación individual hacia los parches florales e identificación de las especies vegetales en ellos a través del aprendizaje asociativo de claves (Wright y Schiestl 2009) porque las claves olfativas son físicamente transferidas desde el sitio de recolección hacia el nido (von Frisch 1923; Farina et al. 2005; Díaz et al. 2007). La información olfativa adquirida por cada individuo recolector (información privada, Danchin et al. 2004) se vuelve pública cuando es compartida entre congéneres a través de interacciones sociales que implican intercambio de alimento boca a boca (trofalaxia). En este sentido se ha demostrado que las abejas recolectoras que son reclutadas hacia determinadas fuentes de alimento, adquirieron la información asociada con el olor floral en el interior del nido (Farina et al. 2005). Como consecuencia de ello el éxito reproductivo de las plantas se relaciona, en gran medida, con el uso de la información olfativa de las abejas en el contexto de la recolección de alimento, y éste último a su vez con la biología social de estos insectos.

1.1.2. La biología social de la abeja melífera

Una apis, nulla apis

(Una abeja es lo mismo que ninguna abeja)

Proverbio Latino

Organización Social

Las abejas melíferas (o domésticas) son insectos eusociales, lo que significa que presentan división reproductiva del trabajo, cuidado de la cría y solapamiento de generaciones que contribuyen coordinadamente en las tareas de la colonia (Michener 1974).

Los adultos de una colonia pertenecen a tres castas: reinas, zánganos y obreras, (Wilson 1971; Winston 1987) cada uno con sus propias especializaciones (**Figura 4**).

Figura 4. Castas de adultos de abeja melífera. De arriba hacia abajo: obrera, reina y zángano.

Las reinas y los zánganos son las castas reproductivas, mientras que la casta obrera es comúnmente estéril (Wilson 1971). Una colmena de abejas melífera

cuenta con una reina que es la progenitora de los restantes individuos: 200 a 1000 zánganos (machos) y 10.000 a 50.000 obreras (hembras) (Hooper 1991). Los zánganos son cuidados y alimentados por las obreras y su única función es la de aparearse, luego de lo cual mueren (Winston 1987). Sin embargo, los zánganos no se aparean con la reina de su propio nido sino con reinas jóvenes de las colonias vecinas, contribuyendo mediante la transmisión de sus genes, al éxito de su propia colonia (Seeley 2010). Las obreras, que no se reproducen, realizan muchas tareas diferentes moduladas por las necesidades de la colonia (Ribbands 1952). Entre ellas, dentro del nido cuidan la cría, realizan tareas de limpieza, maduran y almacenan la miel, almacenan el polen en las cercanías de la cría y alimentan y limpian a la reina. Fuera del nido exhiben comportamientos de defensa y recolección de alimento (Winston 1987).

Dentro de la casta de las obreras la progresión regular de tareas se relaciona con la edad, fenómeno denominado polietismo etario (Oster y Wilson 1978) (**Figura 5**). Durante los primeros días de su vida adulta las obreras realizan tareas de limpieza del nido, y cuidado de la cría y de la reina. A edades intermedias (cercanos a los 13 días de edad) reciben y procesan el alimento que ingresa a la colmena y finalmente a partir de los 20 días aproximadamente realizan tareas de defensa de la colonia y recolección de recursos fuera del nido (Lindauer 1952; Seeley 1982). El néctar y el polen son el alimento de las abejas y constituyen sus fuentes de carbohidratos y proteínas respectivamente. Las obreras también recolectan agua y resinas. El agua es usada para el enfriamiento del interior de la colmena en días

calurosos y para diluir la miel durante la preparación del alimento de las larvas. La resina se emplea en la reparación y reforzamiento del nido y como protección contra microorganismos (Seeley 1995).

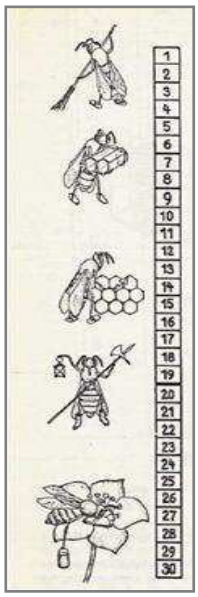


Figura 5. División de tareas en las obreras. Lindauer 1952.

Además del estadio adulto, una colonia contiene un número variable de estadios inmaduros (huevos, larvas y pupas) que varían en número a lo largo del año (Hooper 1991; Seeley 1995). Una vez que la larva emerge del huevo permanece dentro de las celdillas de cría donde es alimentada por abejas adultas con una mezcla de miel, polen y secreciones (Seeley 1995). Las interacciones que ocurren durante la alimentación entre la cría y los adultos distinguen a la abeja melífera de otros insectos con hábitos solitarios (Winston 1987).

Aprendizaje y comunicación dentro del nido

Cuando una fuente de néctar abundante es descubierta, las abejas que regresan al nido transportan el néctar recolectado hasta la colmena dentro de su buche y lo transfieren a sus compañeras mediante contactos boca a boca (trofalaxia). Así, los recursos disponibles en un momento particular se distribuyen rápidamente entre congéneres alcanzando tanto a otras obreras (von Frisch 1967) como a la cría (Nixon y Ribbands 1952), además de ser almacenados en el interior del nido. Esta distribución del alimento implica una coordinación grupal de las tareas que a su vez es modulada por factores individuales como umbrales de respuesta (Lindauer 1952) o las habilidades cognitivas de las abejas involucradas en la transferencia de néctar (Ribbands 1955). Como se mencionó anteriormente, el aprendizaje de claves olfativas relacionadas con el alimento, y que tiene lugar tanto fuera como dentro del nido, es esencial en la vida de estos insectos (Menzel 1985) y en el interior de la colmena este proceso tiene lugar durante los intercambios de alimento. Esto puede ocurrir ya sea porque la cutícula de las abejas está impregnada de olores o porque el alimento que se transfiere está aromatizado. El olor floral adherido a la cutícula de las recolectoras (von Frisch 1923) es especialmente relevante cuando las fuentes de alimento son cercanas al nido (von Frisch 1967). Sin embargo, el aroma del néctar retenido en el buche melario es relevante aun cuando su recolección haya sido lejos del nido porque mantiene sus propiedades hasta que es transferido a otros individuos.

Las memorias olfativas de abejas recolectoras que se establecen en el interior de la colmena y que tienen lugar principalmente durante los contactos trofalácticos (Farina et al. 2005, 2007), pueden ser evocadas en el contexto recolector (Arenas et al. 2007; Arenas et al. 2008; Grüter et al. 2009; Balbuena et al. 2012a) y perdurar varios días (Farina et al. 2005; Arenas y Farina 2008; Grüter et al. 2009). Por otra parte, cuando la información olfativa vinculada a los recursos disponibles alcanza a las abejas jóvenes cuyas tareas se restringen al interior de la colmena (Grüter et al. 2006), se establecen las primeras memorias olfativas que posteriormente pueden afectar sus preferencias recolectoras en el momento en que comiencen a realizar tareas fuera del nido (Balbuena et al. 2012b).

Además de los contactos trofalácticos, las abejas que regresan del exterior realizan un comportamiento estereotipado denominado "la danza de contoneo" (von Frisch 1967), que brinda información espacial (distancia, ubicación) de la fuente de alimento visitada. Se ha demostrado que este comportamiento facilita la adquisición de la información relativa a los olores florales (Díaz et al. 2007; Balbuena et al. 2012a).

Los comportamientos y habilidades cognitivas descriptos permiten a las abejas buscar y recolectar alimento eficientemente y modificar sus patrones de comportamiento en respuesta a estímulos que ocurren dentro y fuera de la colmena (Ribbands 1952; Winston 1987; Robinson 1992; Seeley 1995). Entre los cambios que ocurren afuera de un nido uno de los más relevantes es la variación en la oferta floral, que puede ser causada por diversos factores. Independientemente del factor

que lo provoque, frente a las variaciones en los recursos disponibles, las abejas dirigen la fuerza recolectora de la colmena a las fuentes de alimento más abundantes (Grüter 2008; Díaz et al. 2013). Queda demostrado que el complejo sistema de comunicación e interacciones sociales que ocurren dentro de la colmena permite la propagación de información relevante a un sinnúmero de individuos (Pankiw et al. 2004; Grüter et al. 2006) afectando la activación y reactivación del comportamiento recolector (von Frisch 1923; von Frisch 1967; Wenner et al. 1969; Arenas et al. 2007; Arenas et al. 2008). En resumen, la capacidad para adquirir y transferir información dentro de la colmena (Grüter et al. 2006; Arenas et al. 2007; Grüter 2008) le permite a estos insectos responder adaptativamente a las variaciones del entorno y en este contexto las claves olfativas desempeñan un importante rol.

1.2. La polinización y su importancia en la producción agrícola

La polinización es la transferencia de polen desde las anteras al estigma (estructuras masculina y femenina de una flor, respectivamente) y puede comprender a una o dos flores de una misma especie vegetal (Dag et al. 2008). El grado en el que cada planta depende de la polinización se relaciona directamente con su mecanismo de fertilización y reproducción, morfología floral, grado de auto-fertilidad, así como también de la disposición de las flores en la planta y entre plantas vecinas (Delaplane y Mayer 2000; Delaplane et al. 2013). Mientras que algunas especies vegetales pueden producir semillas o frutos sin polinización

mediante, la mayoría de las angiospermas sin embargo, requieren de la polinización para dar fruto (Delaplane et al. 2013). Entre las especies capaces de reproducirse sin polinización se encuentran algunos cítricos que se reproducen asexualmente (apomixis), así como también los cultivos de piña, banana y pepino sin semilla que no requieren de la fertilización de los óvulos para reproducirse (partenocarpia vegetativa) (Delaplane et al. 2013). Por su parte, en las especies que dependen de agentes vectores de polen existen dos sistemas de polinización: cruzada (xenogamia) que involucra plantas con diferente contribución genética, o autógama, en la que una flor es fecundada por su propio polen (Delaplane et al. 2013). La polinización a su vez, puede ser mediada por factores abióticos (viento y agua) o bióticos (animales). Los últimos incluyen vertebrados como aves y murciélagos e invertebrados como coleópteros, dípteros, lepidópteros e himenópteros (Faegri y Van der Pijl 1966).

La polinización animal incide en la agricultura global, y por lo tanto en la seguridad alimentaria y su diversidad (FAO; Hein 2009). Algunas estimaciones dan cuenta de que el 35% de la producción agrícola mundial está relacionada con este servicio. Otros calculan que, de toda la producción agrícola, el 22,6 y el 14,7% en los países en vías de desarrollo y desarrollados respectivamente, se benefician de la polinización animal en alguna medida (Klein et al. 2007; Aizen et al. 2008). Es importante señalar que el efecto de los polinizadores en la producción agrícola trasciende el simple rendimiento final de los cultivos, afectando su cosecha y post-cosecha (Dag et al. 2008; Gaaliche et al. 2011; Bommarco et al. 2012). La

polinización incide en la concentración de azúcares, forma, peso y textura de los frutos, entre otros parámetros (Gallai et al. 2009).

A escala de producción mundial agrícola, entre los cultivos poco a moderadamente dependientes de la polinización por insectos se encuentran los de soja, tomate, palma aceitera y colza. Entre los dependientes de este servicio se encuentran los cultivos de sandía, manzana, pera y algunos tipos de girasol; en ellos el servicio de polinización es esencial (Williams 1994; Klein et al. 2007).

1.2.1. Polinización mediada por colmenas trashumantes

En particular la abeja europea *Apis mellifera* (L.) es la especie que se utiliza con más frecuencia en los servicios de polinización. En este contexto colmenas de abejas melíferas son trasladadas (y por ello se habla de colmenas trashumantes) entre diferentes cultivos de especies vegetales que requieren en mayor o menor grado de la polinización para dar fruto. Este insecto se utiliza ampliamente a nivel global con este fin, y a pesar de la producción de miel (más de un millón de toneladas anuales a nivel mundial, FAOSTAT 2002) el rol que desempeña como polinizador se mantiene como su contribución económica más importante sopesando la importancia de todos los productos de la colmena juntos (vanEngelsdorp y Meixner 2010; Abrol 2012). La polinización de los cultivos que requieren de este servicio implica un costo que no puede separarse del proceso de producción agrícola: a los precios de mano de obra, capital, tierra, insumos como

semillas y fertilizantes, en algunos cultivos se debe adicionar el del servicio de polinización (Hein 2009). Si bien el número de colmenas por hectárea necesario para una adecuada polinización del cultivo es diferente en cada caso, se espera que sea mayor en tanto la población de polinizadores nativos sea menor (Corbet et al. 1991).

En la actualidad existe una creciente demanda de los servicios de polinización y esto se debe en gran medida a la reducción del hábitat de los polinizadores nativos y sus poblaciones (FAO; Westerkamp y Gottsberger 2002; Biesmeijer et al. 2006; Aizen et al. 2008) generada en los últimos años. Desde 1700 hasta 1980 el área total cultivada en el mundo aumentó un 466% (Meyer y Turner 1992) y continúa creciendo en la actualidad, aunque en menor medida. Desde el inicio de la Revolución Verde en 1960 y hasta el presente se intensificó el uso de la tierra mediante la aplicación de fertilizantes y pesticidas (Naylor 1996). La creciente destrucción ambiental resultante ocasionó serias reducciones en el hábitat de polinizadores nativos y consecuentemente en sus poblaciones (FAO ; Westerkamp y Gottsberger 2002; Biesmeijer et al. 2006; Aizen et al. 2008) generando una progresiva dependencia de la contratación de los servicios de polinización (Westerkamp y Gottsberger 2002; Ghazoul 2005). Paradójicamente en muchos casos las estrategias tendientes a incrementar las ganancias con mayores niveles de producción y/o rendimiento de los sistemas agrícolas afectaron seriamente este servicio, que la naturaleza proporcionaba sin costo para las personas, y en la

actualidad deben contratarse colmenas comerciales para fortalecer, cuando no íntegramente proporcionar este servicio.

A pesar de que la polinización por abejas melíferas e insectos silvestres es un importante servicio ecosistémico (servicios que las personas reciben de la naturaleza), no hay un único método aceptado que permita su valuación. Algunos estiman que puede alcanzar los 153000 millones de euros por año (Gallai et al. 2009; Calderone 2012; Delaplane et al. 2013), pero existe mucha controversia respecto al valor del servicio de polinización (Morse y Calderone 2000; Allsopp et al. 2008; Gallai et al. 2009; Hein 2009; Winfree et al. 2011). Independientemente de ello, el beneficio proporcionado a nivel global es lo suficientemente importante como para influir sobre estrategias de conservación y decisiones relacionadas al uso de la tierra (Lautenbach et al. 2012).

1.3. Cultivos dependientes del servicio de polinización

1.3.1. Cultivos de girasol

El girasol *Helianthus annuus* (L.) pertenece a la familia Asteraceae y su fruto son cipselas (aquenios de ovario ínfero) que pueden ser usadas para la producción de aceite de alta calidad y productos de confitería (Mc Gregor 1976). Entre los cultivos de los se obtienen semillas para extraer aceite, éste es el único de origen americano (Simpson y Ogorzaly 1995; Lentz et al. 2008). Aun hoy en día pueden encontrarse poblaciones silvestres de esta especie en Canadá, Estados Unidos y

México (Simpson y Ogorzaly 1995). Los aquenios fósiles más antiguos encontrados en el este de América del Norte con rasgos de domesticación datan de aproximadamente 2500 años de antigüedad (Lentz et al. 2008) y evidencian no sólo que los nativos americanos consumían estas semillas, sino que además las machacaban para extraer el aceite (Simpson y Ogorzaly 1995). La relación simbólica entre el girasol y la adoración del sol en las culturas americanas se considera una de las principales causas de su deliberada eliminación luego del establecimiento de la hegemonía española (Lentz et al. 2008).

Las plantas silvestres de girasol son ramificadas y tienen numerosos y relativamente pequeños capítulos, mientras que el girasol domesticado tiene generalmente un gran capítulo apical. Una inflorescencia puede tener entre 1.000 y 4.000 flores, dependiendo del cultivar y el tamaño del capítulo (Mc Gregor 1976). El pericarpo varía en su color: generalmente se utilizan las ralladas en las confituras o *snacks*, mientras que las negras son procesadas para la obtención de aceite (Simpson y Ogorzaly 1995). Las flores tubulosas son hermafroditas protándricas (están presentes los órganos reproductivos de ambos sexos y la parte masculina madura antes que la femenina) (Mc Gregor 1976; Abrol 2012). Muchas variedades son auto-incompatibles (Free y Simpson 1964; Mc Gregor 1976) y por lo tanto para que se produzcan semillas el polen debe provenir de otra flor u otra planta (Mc Gregor 1976). La transferencia de polen entre plantas puede ser realizada por la abeja melífera ya que este polinizador visita el girasol en busca de polen y néctar (Free 1964).

El vigor híbrido o heterosis describe la potencia incrementada de una planta u otro organismo cuando éste se compara con el de sus parentales de los que difiere en uno o más caracteres heredados. En las plantas, por ejemplo, los efectos de este vigor se observan en términos de mayor tamaño, uniformidad, volumen y calidad o resistencia a factores ambientales desfavorables (Mc Gregor 1976). Las primeras referencias a los posibles efectos heteróticos en girasol fueron hechas en el año 1970 (Kinman 1970), y ya en ellas se conjeturó sobre la necesidad de las abejas en este sistema.

El girasol cultivado para la producción de semilla híbrida se produce por medio de la Esterilidad Masculina Citoplasmática. Esta tecnología comprende una línea EMacho estéril (ME) que debe ser polinizada por una línea restauradora (o Macho Fértil; MF) mediante polinización cruzada (Mc Gregor 1976). El polen de girasol es demasiado pesado y pegajoso como para ser transportado por el viento (Yadav et al. 2002) y por lo tanto debe ser transferido entre líneas parentales por agentes polinizadores. En este sentido, los incrementos en el rendimiento de cultivos de girasol para la producción de semilla híbrida obtenidos en presencia de colmenas de abejas melíferas dan cuenta de la estrecha relación entre ambos factores (Free 1963; Yadav et al. 2002; Greenleaf y Kremen 2006; Oz et al. 2009; De Estrada et al. 2012).

El desarrollo de plantas híbridas contribuyó en las últimas décadas a incrementar el número de semillas por hectárea en cultivos de girasol semilla (De Estrada et al. 2012) y a posicionar a este cultivo en el segundo lugar en importancia,

en términos de la superficie media anual cosechada, precediendo al cultivo de soja (Chacoff et al. 2010). Esta tendencia también se observó en Argentina. Según el ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, el rendimiento del grano de girasol a campo se incrementó en casi un 170% en el período 1975 a 1995 como consecuencia del reemplazo de las variedades por híbridos. El rendimiento de aceite, por su parte, acompañó este crecimiento a razón de un incremento de 11,5 kg por hectárea por año en el período 1982 a 2006 y en los años subsiguientes se mantuvieron los rendimientos a pesar de la degradación ambiental. Como consecuencia, el aporte de la Argentina a la producción mundial de aceite de girasol alcanzó el 9%, y en lo que respecta a la exportación se situó en el segundo lugar después de Ucrania (Franco 2010). Es interesante notar que, a pesar de la relevancia de este cultivo, aún restan determinar las causas de las variaciones estacionales observadas en su rendimiento.

1.3.2. Cultivo de frutales

La manzana es el cultivo de árboles frutales de clima templado más importante del mundo (Simpson y Ogorzaly 1995). Junto a la ciruela, el durazno, la pera y la frutilla, pertenece a la familia Rosaceae, subfamilia Maloideae. La manzana cultivada se conoce científicamente con el nombre de *Malus domestica* (L.). *Malus* proviene de la palabra latina "malus" (mala), que refiere a la trágica mordida de Eva en el jardín del Edén. Se trata de un cultivo consumido en Eurasia desde tiempos prehistóricos, y su origen más probable es Oriente Medio (Free 1993). Su selección

parece haberse practicado tempranamente, ya que se sabe que los romanos contaban con al menos 22 variedades. Hoy en día se conocen 6500 variedades hortícolas, pero sólo algunas, entre las que se encuentran Red Delicious, Royal Gala, Granny Smith, Baldwin, Cortland y Rome dominan el mercado (Simpson y Ogorzaly 1995).

El cultivo de pera, por su parte, está en el segundo lugar de los frutales cultivados de clima templado en todo el mundo. Muchas especies de pera parecen hibridar espontáneamente y podrían haber dado origen a la producción de *Pyrus communis* (L.), la especie cultivada más ampliamente difundida. Tanto el este de Europa como el Oeste de Asia podrían ser su centro de origen, ya que ambas son regiones de gran diversidad de especies de *Pyrus*. Específicamente en Eurasia se cultiva desde el final del período clásico Griego y su introducción en América parece coincidir con las primeras conquistas españolas o inglesas (Simpson y Ogorzaly 1995).

La dependencia de los servicios de polinización en cultivos frutales, así como en el cultivo de girasol, es también marcada. Específicamente, tanto en cultivos de pera como de manzana las flores que no son polinizadas caen rápidamente (Free 1993). La fertilización inadecuada da lugar a frutos deformes y más propensos a ser descartados. Más aún, la mayoría de los cultivares de pera y manzana son auto estériles (Free 1993).

En relación a los recursos que ofrecen, la buena calidad del néctar de las flores de manzana en términos de volumen y concentración (Mc Gregor 1976; Free 1993; Delaplane y Mayer 2000; Díaz et al. 2013) se contrapone con la oferta pobre de néctar en las flores de pera (Farkas y Orosz-Kovács 2003; Díaz et al. 2013). Esta diferencia en la calidad de los recursos, sumado a la capacidad de las abejas para modular su comportamiento frente a los cambios en la oferta floral permite explicar la dinámica de recolección de la abeja melífera observada en ecosistemas agrícolas mixtos de manzana y pera. Se describió una predominante recolección de néctar en las flores de manzana y de polen en las flores de pera con un pico de recolección de cada recurso en el máximo nivel de floración de cada cultivo respectivamente (Díaz et al. 2013).

Finalmente, vinculado a su aspecto económico, el mercado de frutas de pepita tiene relevancia a nivel global. Su producción mundial es de 90 millones de toneladas, de las cuales el 5,5% corresponde a América del Sur. La producción Argentina, por su parte, constituye el 40% del volumen de la región, aportando aproximadamente el 35% en manzana y el 65% en pera. En 2013 la producción argentina de manzana alcanzó las 970.000 toneladas, conformadas principalmente por las variedades Red Delicious, Granny Smith y Gala y Royal Gala. En ese mismo año, se obtuvieron 890.000 toneladas de pera con predominio de las variedades Williams, Packams y D´Anjou (Minagri 2014).

1.4. Desarrollos tendientes a incrementar la eficiencia polinizadora de la abeja melífera

1.4.1. Atractantes

Cuando una colmena es trasladada a un cultivo la especie floral cultivada constituye el recurso más abundante y por lo tanto las abejas dirigirán su fuerza recolectora hacia ella. Aun así, el pico de actividad recolectora sobre el cultivo no se alcanza inmediatamente, y bien puede suceder que una vez obtenido disminuya rápidamente porque los recursos que ofrece el cultivo no son atractivos para las abejas. En cualquiera de los dos casos la polinización será insuficiente. Con el objetivo de incrementar la eficiencia de polinización, y por lo tanto el cuaje y los rendimientos de los cultivos, se han desarrollado diversos productos. En general se trata de sustancias (azúcares, aceites o feromonas) que se mezclan con agua y se aplican por aspersión convencional sobre los cultivos promoviendo la visita de las abejas a los mismos. Entre ellos se encuentran Bee-Here®, Beeline®, Beelure®, Bee-Scent®, y Pollenaid®. Su utilización puede incrementar la polinización de un cultivo por ejemplo, alejando a las abejas de la flora circundante que compite con el cultivo por las visitas recolectoras (Delaplane y Mayer 2000). Sin embargo, y a pesar de que la aplicación incrementa las visitas, no necesariamente esto está acompañado de un incremento en la polinización. En el caso de los productos a base de azúcar se ha reportado una disminución en la eficiencia polinizadora porque las abejas se desvían a recolectar las soluciones aplicadas sobre el follaje en lugar del recurso proporcionado por las flores (Free 1965). La aplicación de productos con feromonas

como Bee-Scent® (a base de feromonas de la glándula de Nasonov) y Fruit Boost® (con feromona mandibular sintética de la reina) no resulta eficaz en todos los casos. En cultivos de manzana, pera y sandía se obtuvieron resultados dispares entre variedades respecto al número de visitas de abejas a las flores y los rendimientos finales de los cultivos (Mayer et al. 1989; Loper y Roselle 1991; Delaplane y Mayer 2000). Si bien todos estos productos proporcionan a los apicultores y agricultores herramientas para mejorar los servicios de polinización, su efecto debe estudiarse en cada cultivo y variedad.

1.4.2. Formulaciones sintéticas que imitan olores florales

Los olores florales son una mezcla compleja de compuestos volátiles (Dudareva y Pichersky 2006), de los cuales sólo algunos de ellos son necesarios para dirigir el comportamiento de búsqueda de alimento (Pham-Delegue et al. 1986; Riffell et al. 2009; Byers et al. 2014). Teniendo en cuenta esto, en el laboratorio del Grupo de Estudio de Insectos Sociales, se desarrollaron formulados sintéticos que imitan olores florales de algunas especies agrícolas de importancia económica; específicamente de girasol, manzana y pera. Estas formulaciones sintéticas, en adelante Facilitador Girasol (FG), Facilitador Manzana (FM) y Facilitador Pera (FP) no pudieron ser discriminadas de las fragancias naturales correspondientes por abejas que fueron entrenadas a distinguir entre ellas (Díaz 2013) sugiriendo que podrían ser las mezclas clave que las abejas utilizan para el reconocimiento de las

flores respectivamente (Pham-Delegue et al. 1993; Wadhams et al. 1994; Blight et al. 1997; Laloi et al. 2000; Riffell et al. 2009; Reinhard et al. 2010).

Específicamente, para desarrollar el Facilitador Girasol (FG) se realizaron condicionamientos diferenciales usando el olor natural de las flores de girasol y diferentes combinaciones de olores presentes en el perfil de volátiles de las flores de girasol. Entre las mezclas se seleccionó, para conformar el FG, aquella que cuando fue presentada con la recompensa en condicionamientos diferenciales realizados en el paradigma de REP, las abejas no pudieron discriminar del olor natural de las flores de girasol. Se realizaron ensayos preliminares a campo en colmenas ubicadas en el entorno de cultivos de girasol. Se comparó la actividad de colmenas tratadas con solución azucarada aromatizada con FG y colmenas control tratadas con solución azucarada aromatizada con una esencia floral sintética (jazmín). Se observaron mayores niveles de actividad (medido como cantidad de individuos que regresan a la colmena y cantidad de corbículas de polen recolectadas en la piquera de las colmenas) en las colmenas tratadas con FG. La evaluación de las memorias olfativas de abejas provenientes de colmenas expuestas a ambos tratamientos (FG y jazmín) en el protocolo de REP demostró que la aplicación de este formulado da lugar a la formación de memorias apetitivas y que éstas son específicas de los olores de los tratamientos. Asimismo se evaluó la especificidad de la actividad recolectora evaluando parámetros de "la danza de contoneo", ya que mediante este comportamiento las abejas determinan la ubicación de las fuentes de alimento (Visscher y Seeley 1982). Este estudio demostró que las abejas pertenecientes a la

colmena tratada con FG encontraron antes y explotaron de manera más persistente un cultivo de girasol situado a 600 metros de las colmenas tratadas. Complementariamente se evaluaron las preferencias recolectoras de abejas provenientes de colmenas con ambos tratamientos capturando abejas en dos parches florales cercanos: uno de ellos con un cultivo de girasol y el otro con flora nativa. Para ello se marcaron las abejas con colores diferentes según la colmena (y tratamiento) de procedencia. Se pudo determinar que las abejas capturadas en el cultivo de girasol provenían con mayor frecuencia de las colmenas tratadas con FG, mientras que su frecuencia fue mínima en el cultivo con flora nativa (Farina et al. 2011; Díaz 2013). Estos resultados permitieron demostrar que el tratamiento con FG sesga preferencias recolectoras de las abejas específicamente hacia el cultivo de girasol.

En relación al Facilitador Manzana (FM) se realizaron condicionamientos diferenciales en los cuales se presentó el FM recompensado y el olor natural de las flores de manzana no recompensado, y las abejas no fueron capaces de discriminarlos. Además se realizaron estudios preliminares a campo que consistieron en la evaluación del efecto del FM sobre la actividad de colmenas que polinizaban cultivos de manzana. Para esto, se trabajó en dos grupos de colmenas: uno de ellos fue tratado con solución azucarada aromatizada con FM, y otro grupo con solución azucarada sin aromatizar. Se evidenció un incremento en la actividad general de las colmenas tratadas con la mezcla sintética a partir del sexto día post-estimulación, coincidente con el pico de floración del cultivo de manzana.

Específicamente se registró una mayor actividad de las recolectoras sin cargas de polen en sus patas, en las colmenas tratadas con FM. Teniendo en cuenta que las abejas recolectan predominantemente néctar en las flores de manzana, y que la proporción de recolectoras de néctar se mantiene constante a lo largo de la floración (Díaz et al. 2013), se puede inferir que el aumento de recolectoras sin cargas de polen representa un aumento de las recolectoras de néctar. A partir de estos resultados, se concluyó que la aplicación de FM en colmenas que polinizan cultivos de manzana genera incrementos en los niveles de recolección sobre las flores de manzana (Farina et al. 2011; Díaz 2013).

Para el desarrollo del Facilitador Pera (FP) se realizaron condicionamientos absolutos de diferentes mezclas sintéticas y se seleccionó aquella que durante la fase de evaluación las abejas generalizaron con el olor de las flores naturales de pera. Una vez elegida esta mezcla, y para corroborar su similitud con el olor natural de las flores de pera se realizaron condicionamientos diferenciales. Se observó, al igual que durante el desarrollo de FM, que cuando el FP se presentaba apareado con la recompensa, las abejas no eran capaces de discriminarlo del olor natural de las flores de pera. Adicionalmente se realizaron condicionamientos absolutos en los cuales se condicionó la REP al FP. Seguidamente se evaluó la respuesta de las abejas a tres olores: flores naturales de pera, flores naturales de manzana y FP. El alto porcentaje de abejas (cercano al 90%) que respondieron al olor floral de pera evidenció la generalización entre el olor natural y la mezcla sintética FP. Además, el

nivel de respuesta al olor de las flores de manzana fue bajo, quedando demostrada la especificidad de FP para el olor de las flores naturales de pera (Díaz 2013).

1.5. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es evaluar el comportamiento recolector de la abeja *Apis mellifera* en cultivos agrícolas de importancia económica y los efectos del uso de herramientas tendientes a incrementar su capacidad polinizadora. Particularmente se describirá la conducta de la abeja durante la recolección en campos de girasol *Helianthus annuus* cultivados para producir semilla híbrida (girasol-semilla) y se evaluarán los efectos de formulaciones sintéticas sobre respuestas generales vinculadas a la interacción abeja-cultivo. Las formulaciones serán aplicadas en colmenas utilizadas para la polinización de cultivos de girasol - semilla, de manzana *Malus domestica* y de pera *Pyrus communis*.

1.5.1. Objetivos particulares e hipótesis

1.1. En cada vuelo recolector la abeja melífera exhibe fidelidad a una especie floral particular distinguiendo, a partir de claves químicas y visuales, entre fuentes de recursos. Los cultivos de girasol *Helianthus annuus* de producción de semilla híbrida presentan líneas parentales productoras de polen (o macho fértil: MF) y otras productoras de semilla (o macho estéril: ME). Comúnmente se contratan los

servicios de polinización de abeja melífera para asegurar el transporte de polen desde las líneas MF hacia las ME. Con el objetivo de describir el comportamiento recolector de la abeja en estos cultivos se realizarán seguimientos de abejas durante su vuelo recolector. Se plantea como hipótesis que en los cultivos de girasol - semilla que muestren mayor dimorfismo entre sus líneas parentales MF y ME, la probabilidad de que las abejas realicen vuelos cruzados entre parentales y transfieran el polen entre ellos será menor.

1.2. Los contactos corporales entre compañeras de nido en estos cultivos posibilitan la trasferencia de polen dentro de la colmena. Se plantea como objetivo determinar la presencia de granos de polen adheridos al cuerpo de abejas capturadas tanto en el interior de los nidos como sobre capítulos ME. Para ello se realizarán capturas de abejas en lotes de girasol – semilla con diferentes líneas parentales macho fértil (MF) y macho estéril (ME). Se estimará, en cada caso, el porcentaje de abejas con granos de polen de girasol adheridos a su cuerpo. Se plantea como hipótesis que en los nidos existe distribución de polen entre compañeras de nido y que existen diferencias en la adherencia de los granos entre parentales Macho Fértil.

2. Las formulaciones sintéticas desarrolladas por el Grupo de Estudio de Insectos Sociales denominadas Facilitador Girasol, Facilitador Manzana y Facilitador Pera no pudieron ser discriminadas por las abejas de las fragancias naturales correspondientes en ensayos de laboratorio realizados bajo el paradigma de REP. Su aplicación en colmenas a campo generó incrementos en la actividad recolectora de

las abejas y específicamente sobre los cultivos cuyo olor floral representan las formulaciones. Se plantea analizar si el uso de estas herramientas tiene consecuencias sobre el comportamiento recolector de la abeja y en el rendimiento final de los cultivos. Con el objetivo de evaluar la viabilidad de herramientas tendientes a mejorar la eficiencia polinizadora de la abeja melífera se aplicarán las formulaciones sintéticas mencionadas en colmenas ubicadas en cultivos de girasol, manzana y pera respectivamente, utilizadas para su polinización.

2.1. Teniendo en cuenta la dificultad de discriminación entre FG y la fragancia natural del girasol exhibida por las abejas, los mayores niveles de actividad de colmenas tratadas con este formulado, y el sesgo en el comportamiento recolector hacia las inflorescencias de girasol de abejas pertenecientes a colmenas tratadas con FG; se plantea como hipótesis que la aplicación de FG en colmenas que polinizan cultivos de girasol – semilla genera incrementos en la actividad recolectora y que ésto a su vez generará aumentos en el rendimiento final de los lotes aledaños a las colmenas tratadas. Se plantea como objetivo evaluar la incidencia del Facilitador Girasol sobre la actividad recolectora y el rendimiento de cultivos de girasol - semilla.

2.2. Teniendo en cuenta la dificultad de discriminación que las abejas exhiben entre FM y la fragancia natural de las flores de manzana y los mayores niveles de actividad de las colmenas tratadas con este formulado se plantea como hipótesis que la aplicación de Facilitador Manzana en colmenas que polinizan cultivos de manzana

Malus domestica (L.) aumenta la actividad recolectora y promueve una actividad recolectora sesgada hacia las flores de manzana incrementando el rendimiento de los cultivos de manzana en sus inmediaciones. Se plantea como objetivo evaluar la actividad de colmenas tratadas con FM y el rendimiento final de los cultivos en las inmediaciones de las colmenas tratadas.

2.3. Las flores de pera ofrecen un néctar empobrecido en azúcares y por lo tanto poco atractivo para las abejas. Según observaciones previas, las abejas recolectan polen en esta especie floral. Por otra parte, en el contexto del desarrollo del Facilitador Pera (FP), las abejas presentan dificultades para discriminar la FP de la fragancia natural de la flor de pera. Se demostró que las abejas generalizan FP específicamente con el olor natural de las flores de pera y no así con el del olor natural de las flores de manzana. Se plantea como hipótesis que las abejas de las colmenas tratadas con FP mostrarán una mayor actividad recolectora, una preferencia sesgada hacia las flores de pera y que este sesgo generará incrementos en los rendimientos de los cultivos de pera en las inmediaciones de las colmenas tratadas con FP. Se plantea como objetivo evaluar el comportamiento recolector de abejas de colmenas tratadas con FP en cultivos de pera *Pyrus communis*, considerando fundamentalmente la recolección de polen. Las variables vinculadas con la actividad y que serán consideradas serán: la carga de polen recolectada, el desarrollo de la cría dentro de los nidos y la actividad recolectora.

2. Polinización y constancia floral de la abeja melífera en cultivos de girasol *Helianthus annuus* para la producción de semilla híbrida

2.1. Introducción

La expansión de las áreas cultivadas con especies vegetales que dependen de la polinización, junto con la disminución en la abundancia y diversidad de insectos silvestres generaron en las últimas décadas una creciente demanda de los servicios de polinización (FAO; Biesmeijer et al. 2006; Oldroyd 2007; Aizen et al. 2008). El insecto polinizador más usado para estos servicios es la abeja *Apis mellifera*, y a pesar de la relevancia que tienen los productos de la colmena como la miel y la cera, su contribución económica más importante es la polinización de los cultivos (Lautenbach et al. 2012).

Las abejas melíferas visitan un amplio espectro de fuentes florales y sus colonias pueden cubrir grandes áreas cultivadas (Visscher y Seeley 1982; Steffan-Dewenter y Kuhn 2003). A pesar de su estrategia generalista (von Frisch 1967), en cada vuelo recolector estos polinizadores exhiben fidelidad a una sola especie floral, un comportamiento que se denominó constancia floral (Free 1963; Waser 1986; Goulson 1999). Este comportamiento implica la discriminación entre flores en base a diferencias sutiles en su morfología u otras claves sensoriales, así como la asociación de estos estímulos con la recompensa que ofrece cada especie floral particular (Menzel y Erber 1978). Si bien la abeja melífera no es el polinizador más

eficiente en la mayoría de los monocultivos (Mc Gregor 1976; Seeley 1985; Delaplane y Mayer 2000; Garibaldi et al. 2013) su constancia floral y su habilidad para comunicar información relacionada con los recursos a sus compañeras de nido (von Frisch 1967; Farina et al. 2005) convierten a estos insectos en los polinizadores más utilizados en un amplio espectro de ambientes agrícolas (Seeley 1985).

El grado en el que un cultivo particular depende de la polinización por insectos se relaciona con la morfología floral y el nivel de auto esterilidad de la planta entre otros factores (Delaplane y Mayer 2000). Por ejemplo los cultivos con flores imperfectas, es decir con flores femeninas y masculinas, son más dependientes del servicio de polinización. En estos casos los polinizadores transportan el polen desde las flores masculinas hacia las femeninas (Delaplane y Mayer 2000). Otros cultivos como los de soja, frambuesa y tomate dependen moderadamente de la polinización por insectos, mientras que en los cultivos de manzana, pera, alfalfa y almendras este servicio es esencial (Williams 1994).

El servicio de polinización por abejas también resulta esencial en los cultivos de girasol – semilla, que ocupan el segundo lugar en el mundo en términos de la superficie media anual cosechada, precediendo al cultivo de soja (Chacoff et al. 2010), e implican en su mayoría plantas híbridas. El vigor híbrido es la potencia incrementada de una planta cuando se compara con sus parentales en términos de, por ejemplo, el volumen y la calidad del cultivo cosechado (Mc Gregor 1976). El girasol híbrido específicamente se produce por medio de la Esterilidad Masculina

Citoplasmática, lo cual concierne una línea Macho Estéril (ME, **Figura 6**B) que debe ser polinizada con una línea restauradora o Macho Fértil (MF, **Figura 6**C) por medio de polinización cruzada (Mc Gregor 1976). Estas líneas parentales típicamente se siembran intercalando 2 a 4 surcos de MF con 6 a 9 surcos de ME (**Figura 6**). Numerosos estudios dan cuenta de los efectos heteróticos relativos al rendimiento, peso de las semillas y diámetro del capítulo en la primera generación de los cultivos que se obtienen a partir de semillas híbridas (Fick y Zimmer 1976; Chaudhary y Anand 1984; Kadkolet al. 1984; Singh et al. 1984). Asimismo, varios otros estudios evidencian el incremento en el rendimiento de estos cultivos como resultado de la presencia de colmenas de abejas melíferas (Free 1963; Moreti et al. 1996).

Figura 6. Cultivo de girasol – semilla en Hilario Ascasubi, Buenos Aires, Argentina. A) Lote cultivado con parentales MF y ME en una proporción 2:8. Los surcos con plantas de menor altura (centro de la foto) corresponden a inflorescencias MF y los más altos a ME. B) Capítulo ME. C) Capítulo MF.

A pesar de que el sistema agrícola de girasol – semilla representa una oportunidad para el desarrollo de numerosas variedades híbridas (Singh et al. 1984), la transferencia de polen entre líneas parentales (también llamados cultivares) ha sido poco estudiada. En relación a la transferencia mediada por abejas *Apis mellifera*, se reportó un bajo porcentaje de individuos con cargas de polen (6,5 – 12,8 %) visitando capítulos Macho Estéril en cultivos con líneas parentales descriptas como igualmente atractivas para las abejas (DeGrandi-Hoffman y Martin 1993). El hecho de que sólo alrededor del 10% de las abejas que visitaban los capítulos ME provinieran de capítulos MF, sugirió la existencia de mecanismos de transferencia de polen alternativos al vuelo directo entre líneas parentales. En este sentido se propuso que las abejas podrían obtener dentro de la colmena suficientes cantidades de polen como para polinizar el cultivo y que esto podría estar mediado por contactos corporales entre compañeras de nido (DeGrandi-Hoffman y Martin 1993). Este mecanismo de transferencia de polen también se observó en el entorno de parches con diversas especies florales (Free y Durrant 1966) así como también en cultivos de manzana (DeGrandi-Hoffman et al. 1984; DeGrandi-Hoffman et al. 1986) y algodón (Loper y DeGrandi-Hoffman 1994).

En el contexto de la producción de semillas híbridas de girasol es frecuente observar cultivos que presentan marcadas diferencias morfológicas entre sus líneas parentales. Esto plantea un desafío para polinizadores como la abeja *Apis mellifera* que exhiben constancia floral en su comportamiento recolector. Como consecuencia, en este capítulo se estudió la conducta de la abeja melífera durante la recolección en

lotes con líneas parentales Macho Fértil y Macho Estéril que presentaban distinto grado de variabilidad morfológica entre ellas. Se realizaron seguimientos de abejas individuales en su vuelo recolector registrándose, en cada capítulo visitado, el cultivar y el tiempo de permanencia. Además se analizó la adherencia del polen al cuerpo de abejas. Para ello se capturaron abejas en colmena y mientras recolectaban sobre capítulos ME, y se analizó la presencia de granos de polen de girasol adheridos a sus cuerpos. Complementariamente se efectuaron mediciones del alto y ancho de los capítulos en ambas líneas parentales y se midió el tamaño de grano de polen de cada parental MF.

2.1.1. Hipótesis

1- En los cultivos que muestren mayor dimorfismo entre sus líneas parentales MF y ME, menor será la probabilidad de que las abejas realicen vuelos cruzados entre parentales y transfieran el polen entre ellos.

2- Las colmenas son un lugar de distribución de polen entre compañeras de nido.

3- Existen diferencias en la adherencia de los granos entre parentales Macho Fértil.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Sitio de estudio y animales

Se estudió el comportamiento recolector de la abeja *Apis mellifera* en cultivos de girasol *Helianthus annuus* para producción de semilla híbrida comercializados por la empresa DOW AgroSciences. Este análisis se llevó a cabo durante las temporadas de floración 2012 y 2013 (Enero 2012 y 2013). Se realizaron seguimientos de abejas individuales en sus vuelos de recolección en cuatro lotes ubicados en las cercanías de Pedro Luro (39 30′0″S, 62°41′0″ W), en la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Cada lote estaba cultivado con diferentes combinaciones de cultivares Macho Estéril (ME) y Macho Fértil (MF), por lo tanto producían distintos híbridos (en adelante referiremos a los lotes productores de diferentes híbridos como: LH1, LH2, LH3 y LH4). El diseño de plantación en todos los casos consistió en filas ME y MF intercaladas en una proporción 8:2 (8 líneas de ME y 2 líneas de MF, ver **Figura 6**).

Las abejas estudiadas pertenecían a colmenas comerciales tipo Langstroth alquiladas para polinizar estos lotes y que se agruparon en el borde de los cultivos en un número variable de colmenas por grupo (**Figura 7**). Cada colmena contaba con una reina fecundada, 3 o 4 cuadros de cría operculada, reservas y aproximadamente 15.000 individuos.

Figura 7. Grupo de 30 colmenas ubicado al borde de un cultivo de girasol *Heliathus annuus* para la producción de semilla híbrida.

2.2.2. Morfología floral y estudios palinológicos

En los lotes mencionados, cada uno produciendo semillas de un híbrido diferente, se midió con una cinta métrica el diámetro y la altura (cm) de 30 inflorescencias ME y 30 MF elegidas al azar y se recolectó una muestra de polen de los últimos para medir el tamaño de grano. Las muestras palinológicas se analizaron en el laboratorio. Para cada parental de polen se colocó una gota de agua destilada en un portaobjetos, se esparció sobre la misma una pequeña cantidad de polen y se realizó la tinción de la muestra con Lugol. Se colocó el cubre objetos y se registró bajo microscopio (Labomed CXR III) el tamaño (μ) de 30 granos de polen elegidos al azar en cada preparado.

2.2.3. Comportamiento recolector de la abeja melífera en el cultivo

Se estudió el comportamiento recolector de la abeja melífera en dos lotes (LH1 y LH2) en Enero de 2012 y en otros dos (LH3 y LH4) durante Enero de 2013. Las mediciones se realizaron entre el mediodía y las 6:30 pm ambos años. Los registros consistieron en el monitoreo de abejas individuales desde el momento en que iniciaban la recolección sobre un capítulo de girasol y durante el transcurso de visitas recolectoras sucesivas entre capítulos del mismo o de diferentes cultivares (ME y MF). Para cada abeja se registraron las inflorescencias visitadas indicándose el cultivar y el tiempo de permanencia en cada una de ellas. El seguimiento de cada abeja concluyó en el momento en el que el observador perdió de vista a la abeja focal. Los registros se llevaron a cabo en lotes con un similar grado de avance de floración del cultivar ME y 100% de floración de MF (estimación visual).

Tomando en cuenta todos los registros de comportamiento se calculó la siguiente variable:

1. Porcentaje de abejas inconstantes (*%AI*) en su comportamiento recolector. Definida para cada línea parental como:

$$\%\ AI = \frac{\text{número de abejas moviéndose entre cultivares con dirección A-B}}{\text{número de abejas recolectando con constancia floral en A}} \times 100$$

Donde A y B representan los parentales ME o MF alternativamente.

Complementariamente se calculó, también para cada línea parental, el porcentaje de abejas que mostraron persistencia sobre un mismo cultivar (abejas constantes):

$$\%AC = 100 - \%AI$$

Las abejas que cambiaron de línea parental, al menos una vez, durante su vuelo recolector fueron categorizadas como abejas inconstantes (AI), mientras que las que permanecieron recolectando exclusivamente en una de ellas se categorizaron como abejas constantes (AC).

Los registros del comportamiento recolector de abejas constantes se tuvieron en cuenta para calcular otras variables:

2. Tiempo medio de recolección por inflorescencia
3. Número de inflorescencias visitadas por abeja

Ambas variables se estimaron para cada cultivar y lote estudiado.

2.2.4. Adherencia del polen de girasol al cuerpo de abejas recolectoras y abejas de colmena

En Enero de 2013 se estudió la adherencia de granos de polen de girasol al cuerpo de abejas recolectoras en dos lotes (LH3 y LH4). Para esto se capturaron abejas en las colmenas ubicadas en el borde de los cultivos y mientras recolectaban

sobre cultivares ME. En cuanto a las abejas capturadas en los nidos, se definieron tres grupos: abejas ingresantes (abejas que aterrizaban en la plataforma de la entrada de la colmena; en adelante "ingresantes"), abejas de piquera (abejas que se encontraban caminando en la entrada de la colmena; en adelante "de piquera") y abejas del interior de la colmena (en adelante "de colmena"). Para capturar a los individuos de este último grupo se removió el techo de las colmenas y se atraparon abejas adultas cerca del área de cría. En cada lote se tomaron 10 abejas de cada grupo (ingresantes, de piquera y de colmena) en 10 colmenas. Las capturas de abejas sobre inflorescencias ME se realizaron en N=30 plantas elegidas al azar en cada lote, atrapando una abeja por inflorescencia. En todos los casos se usó un tubo plástico de captura por abeja, y allí permanecieron los individuos hasta su análisis en el laboratorio. Las abejas atrapadas en el campo fueron inmediatamente adormecidas en frío usando una conservadora con hielo, y posteriormente se almacenaron en el freezer hasta su análisis.

En el laboratorio, una vez que las abejas alcanzaron la temperatura ambiente, por cada individuo se colocó una gota de agua destilada sobre un portaobjetos, se hizo contactar toda la superficie del cuerpo de la abeja con la gota y se tiñó la muestra con Lugol. Una vez colocado el cubre objetos, cada preparado se observó con microscopio (Labomed CXR III) y se determinó la presencia/ausencia de granos de polen de girasol.

2.2.5. Estadística

El diámetro del capítulo y la altura de las inflorescencias ME y MF se analizaron por medio de un análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores con cultivar y lote como factores de dos y cuatro niveles respectivamente (Sokal and Rohlf 1995). Para cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, los datos se transformaron aplicando la función $\log_{10}$. Cuando se obtuvieron diferencias significativas en la interacción entre factores, se computaron comparaciones múltiples (Prueba de Tukey) en la interacción usando el error correspondiente (Zar 1999).

El tamaño de grano de polen de girasol se comparó entre parentales de polen con un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor considerando cuatro niveles para el factor lote, seguido de un Prueba de Tukey (Zar 1999).

El tiempo medio por inflorescencia y el número de inflorescencias visitadas se analizaron por cultivar, con un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor con cuatro niveles para el factor lote, también seguido de un Prueba de Tukey. Para cumplir con los supuestos del ANOVA, el número de inflorescencias visitadas sobre el cultivar MF se transformaron aplicando la función $\log_{10}$ y se hizo un muestreo de 20 datos sin reposición (Zar 1999).

La constancia floral se comparó entre lotes para el parental MF por medio de un Prueba de homogeneidad Chi-cuadrado (χ^2) (Sokal and Rohlf 2000).

El porcentaje de abejas capturadas en los nidos y que presentaron polen de girasol adherido al cuerpo se analizó con un análisis de la varianza de medidas repetidas (ANOVA-MR) de dos factores. Se consideró lote y grupo de abejas como factores de dos y tres niveles respectivamente, tomando al factor grupo de abejas como medida repetida, seguido de un Prueba de Tukey (Zar 1999) El porcentaje de abejas con polen en el cuerpo, capturadas sobre capítulos ME, se analizó con un Prueba de homogeneidad Chi-cuadrado (χ^2) (Sokal and Rohlf 2000).

2.3. Resultados

2.3.1. Morfología floral

En LH1 se observa que los parentales ME y MF son morfológicamente muy similares entre sí (**Figura 8**A). Por el contrario, en LH4, existen marcadas diferencias entre ellos, tanto en el alto como en el ancho del capítulo (**Figura 8**B).

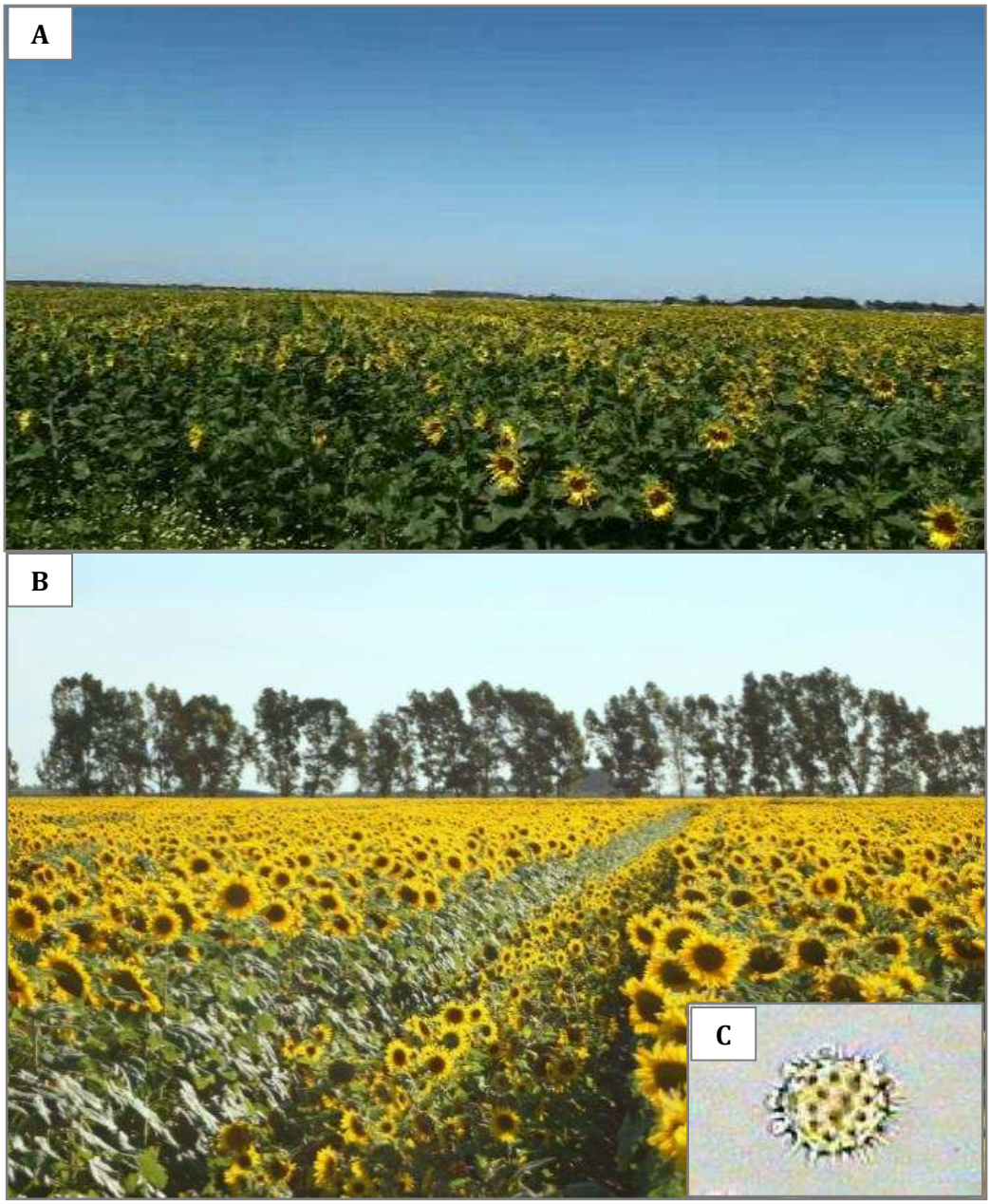


Figura 8. Cultivos de girasol (*Heliathus annuus)* para producción de semilla híbrida. Las hileras Macho Estéril y Macho Fértil están sembradas en una proporción 8:2 (es decir, cada 8 líneas de ME se intercalan 2 líneas de MF). Las fotos A) y B) muestran diferentes grados de disimilitud tanto en la altura como en el diámetro del capítulo entre parentales ME y MF. A) LH1; B) LH4; C) Aspecto de un grano de girasol al Micoscopio Óptico teñido con solución Lugol.

Las mediciones morfológicas revelaron diferencias significativas en la altura de las plantas al comparar entre las líneas parentales de LH3 y LH4 (ANOVA de dos factores, interacción lote x cultivar significativa; F= 37,50; gl= 3, p<0,0001; Prueba de Tukey (p<0,05) en la interacción. **Figura 9**A). El diámetro del capítulo entre ME y MF evidenció diferencias en tres de los cuatro lotes estudiados (ANOVA de dos factores, interacción lote x cultivar significativa; F= 18,87; gl= 3, p<0,0001; Prueba de Tukey (p<0,05) en la interacción. **Figura 9**B). Respecto al tamaño del grano de polen, se encontraron diferencias significativas entre los parentales de los distintos lotes (ANOVA de un factor, F= 52,95; gl= 3, p<0,0001); siendo el grano de polen de LH2 el de mayor tamaño y el correspondiente a LH4 el menor (**Figura 9**C).

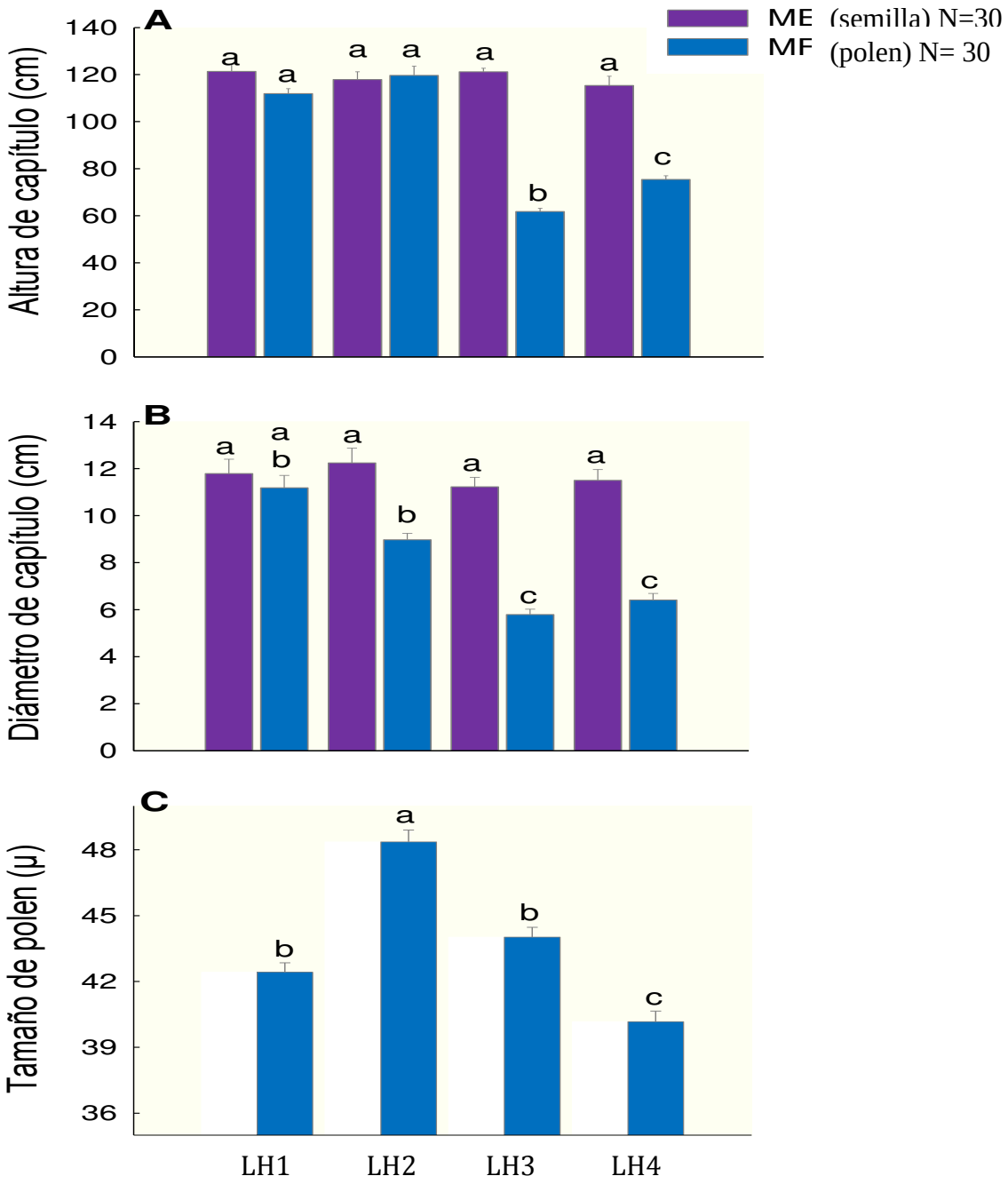


Figura 9. Variables morfológicas medidas en plantas de girasol cultivadas para la producción de semillas híbridas en cuatro lotes. A) Altura y B) Diámetro de capítulo; (cm) (media ± EE) de N=30 inflorescencias Macho Estéril (ME; semilla) y N= 30 Macho Fértil (MF; polen) en cuatro lotes. C) Tamaño del grano de polen (µ) (media ± EE; N=30). Letras diferentes indican diferencias significativas. A) y B) ANOVA de dos factores; factor de la interacción cultivar x lote significativa; p<0,05 Prueba de Tukey. C) ANOVA de un factor; p < 0,05 Prueba de Tukey).

2.3.2. Comportamiento recolector

Los tiempos de recolección sobre los capítulos ME fueron similares en todos los lotes estudiados (ANOVA de un factor, F= 1,46; gl= 3, p= 0,2297. **Figura 10**A) y mayores en general que el tiempo de recolección sobre los capítulos MF. Al comparar los tiempos de recolección sobre capítulos MF entre lotes se encontraron diferencias significativas y el mayor tiempo medio de recolección se evidenció sobre el parental de polen en LH1 (ANOVA de un factor, F= 6,56; gl= 3, p<0,001. **Figura 10**B). Es interesante notar que en LH1 las abejas invirtieron en promedio similares tiempos de recolección sobre ambos parentales y que esto sólo se observó en este lote.

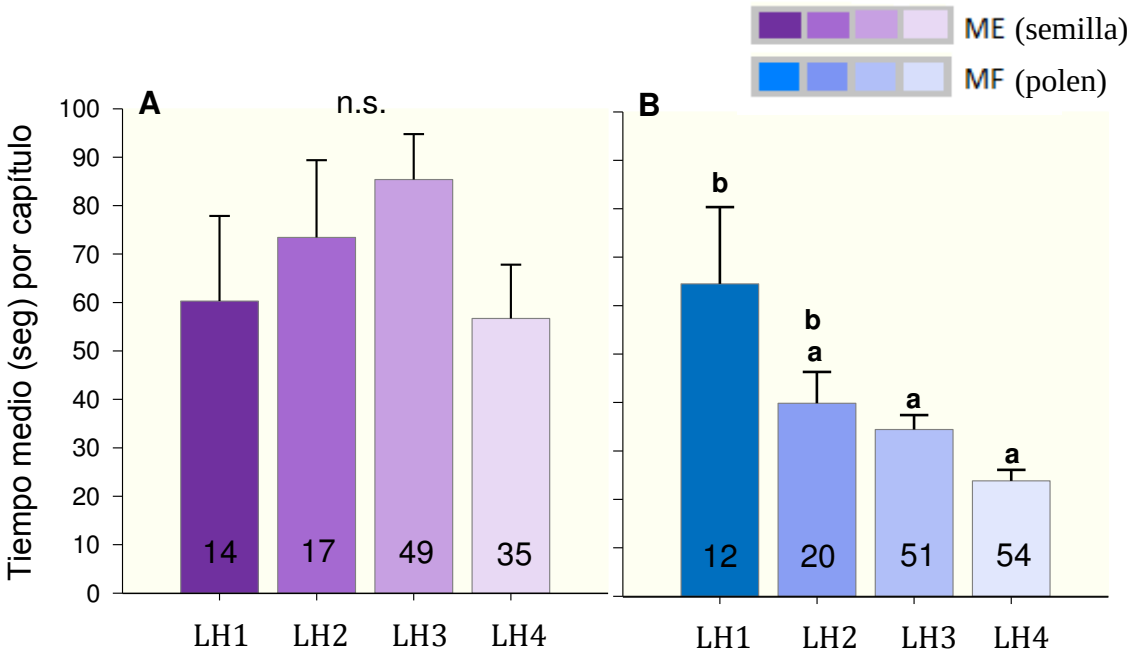


Figura 10. Tiempo de recolección de abejas individuales en cuatro lotes diferentes. Se presentan los tiempos (media ± EE) sobre los capítulos A) ME (semilla) y B) MF (polen). Las observaciones comenzaron con la llegada de una abeja a un capítulo y continuaron a lo largo de sucesivas visitas a diferentes inflorescencias del mismo cultivar, concluyendo cuando el observador perdiera de vista a la abeja focal. Diferentes letras indican diferencias significativas (ANOVA de un factor; p < 0,05Prueba de Tukey).

Al comparar entre lotes el número medio de capítulos visitados por abeja categorizada como constante en su comportamiento recolector, no se encontraron diferencias significativas en los capítulos ME (ANOVA de un factor, F= 0,27; gl= 3, p= 0,8496), pero sí en los capítulos MF (ANOVA de un factor, F= 5,98; gl= 3, p< 0,01). En este último caso se observó que las abejas visitaron más plantas en el parental de polen de LH3 (**Tabla 1**).

Tabla 1. Número de plantas visitadas por abeja en cuatro lotes diferentes. Se detalla el número medio (± EE) de capítulos ME (semilla) y MF (polen). Las observaciones comenzaron con la llegada de una abeja a un capítulo y continuaron a lo largo de sucesivas visitas a diferentes inflorescencias del mismo cultivar, hasta que el observador perdiera de vista a la abeja focal. Diferentes letras indican diferencias significativas (ANOVA de un factor; p<0,05 Prueba de Tukey)

Lote	ME media ± EE (N)	MF media ± EE (N)
LH1	5,06 ± 0,92 (16) [a]	4,45 ± 0,61 (20) [a]
LH2	4,21 ± 0,38 (43) [a]	4,35 ± 0,63 (20) [a]
LH3	4,94 ± 0,51 (49) [a]	8,85 ± 1,47 (20) [b]
LH4	4,8 ± 0,46 (35) [a]	5,3 ± 0,79 (20) [a]

El altísimo porcentaje de abejas que se observó recolectando exclusivamente sobre una de las líneas parentales durante el transcurso de las sucesivas visitas recolectoras evidenció un comportamiento prevalentemente constante en todos los lotes y sobre ambos parentales (**Figura 11**). Específicamente y concerniente a la recolección sobre el cultivar MF, se rechazó la homogeneidad de frecuencias de cambio hacia el parental ME en los cuatro lotes, (Prueba de homogeneidad Chi-cuadrado, F= 9,673; gl= 3, p= 0,0216). Se repitió el análisis excluyendo a LH1 y no se

encontraron diferencias significativas en el comportamiento sobre los restantes parentales de polen (Prueba de homogeneidad Chi-cuadrado, F= 5,579; gl= 3, p= 0,1340). Estos resultados demuestran que, en términos de frecuencia de vuelos cruzados entre parentales con dirección MF-ME (el cambio más relevante desde el punto de vista de la polinización cruzada), las abejas cambiaron más conspicuamente en el lote LH1.

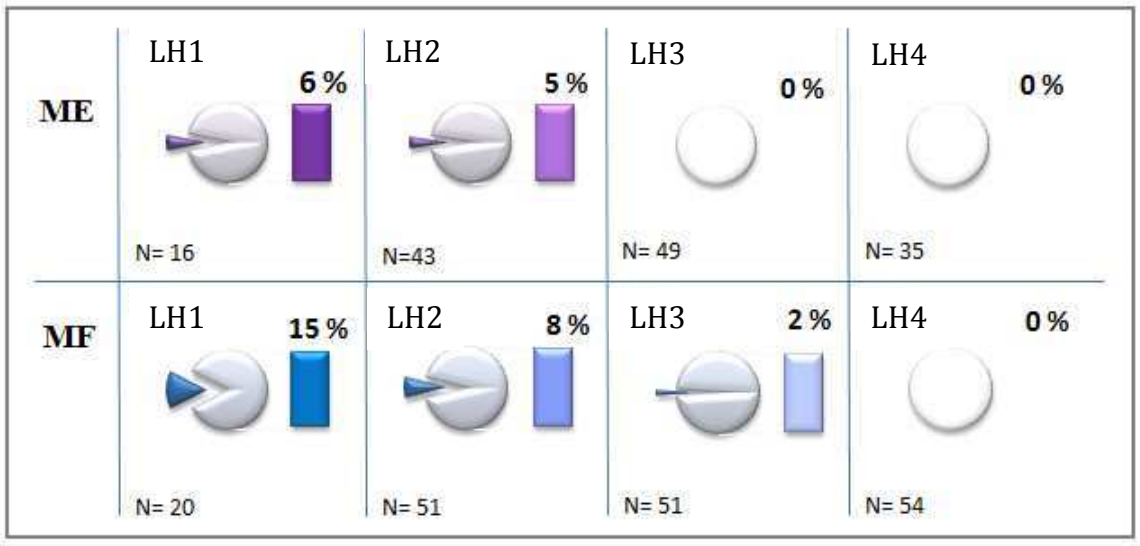


Figura 11. Porcentaje de abejas que cambiaron de cultivar en un vuelo recolector. Se individualizan los cambios desde capítulos ME (semilla) a MF (polen) (tonos lila) y desde capítulos MF a ME (tonos azul). En los lotes LH2, LH3 y LH4 las abejas mostraron el mismo comportamiento recolector sobre el parental MF ($p<0,05$, Prueba de homogeneidad Chi-cuadrado).

Las observaciones del comportamiento recolector de las abejas sobre capítulos MF y que se muestran en esta sección incluyen la recolección de néctar, polen y ambos recursos.

2.3.3. Determinación de granos de polen de girasol adherido al cuerpo de las abejas

El porcentaje de abejas con polen adherido al cuerpo fue significativamente diferente entre todas las categorías de abejas capturadas en los nidos en ambos lotes (ANOVA MR de dos factores, interacción lote*grupo de abejas no significativa; factor "grupo de abejas" F= 35,83; gl= 2, p< 0.0001; Prueba de Tukey (p< 0,05). **Figura 12**A). Además en LH4 se encontró que el porcentaje de abejas recolectoras con polen adherido al cuerpo (capturadas sobre inflorescencias ME), fue muy similar al evidenciado en el grupo de abejas categorizado como "de piquera" y cercano al 70% (**Figura 12**A y C). En el caso de LH3 el porcentaje de abejas recolectoras con polen fue similar al de abejas "ingresantes", y ligeramente superior al 40% (**Figura 12**A y B). Finalmente, el porcentaje de abejas capturadas sobre capítulos ME con polen adherido al cuerpo mostró diferencias significativas entre lotes (Prueba de homogeneidad Chi-cuadrado, F= 14,831; gl= 1; p= 0,0001. **Figura 12**A).

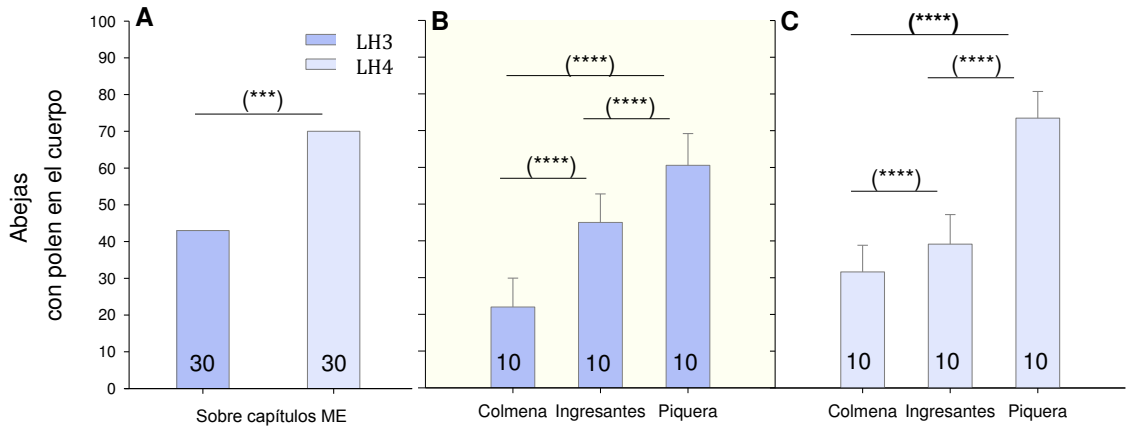


Figura 12. Porcentaje de abejas con polen de girasol adherido al cuerpo en cuatro lotes diferentes. A) Abejas capturadas sobre capítulos ME (una abeja por planta) en dos lotes; los números en las barras indican el número de abejas atrapadas. B) y C) Abejas capturadas: dentro de la colmena ("de colmena"), regresando a ella ("ingresantes") o mientras permanecían en la entrada ("de piquera"). Se atraparon 10 individuos de cada categoría por colmena. Los números en las barras indican el número de colmenas relevadas en cada lote. A) Prueba de homogeneidad Chi-cuadrado $p<0,001$. B) y C) ANOVA de medidas repetidas de dos factores; interacción lote * categoría de abejas no significativa; categoría de abejas significativa $p<0,0001$, Prueba de Tukey; *** y **** representa diferencias significativas.

2.4. Discusión y conclusiones

Este estudio demuestra que en este sistema agrícola la abeja melífera exhibe una marcada constancia floral en cada línea parental durante cada vuelo recolector. Se evidencia que cuanto mayores son las diferencias morfológicas entre los cultivares ME y MF menor es el porcentaje de vuelos cruzados entre ellos. Como consecuencia, la abeja efectúa en este sistema agrícola una transferencia de polen poco eficiente en términos de vuelos entre parentales, probablemente compensado en parte por interacciones sociales entre individuos dentro de la colmena.

Específicamente, durante la recolección de alimento las abejas cambiaron de parental con más frecuencia en LH1 (**Figura 11**), el lote más homogéneo morfológicamente (**Figura 8** y **Figura 9** A y B). En este contexto las abejas evidenciaron tiempos de recolección por inflorescencia y número de plantas visitadas similares en ambos parentales (**Figura 10** y **Tabla 1**). En LH2 se observó una menor frecuencia de vuelos cruzados entre cultivares que en LH1. Los parentales sembrados en LH2 eran homogéneos en su altura pero diferentes en el diámetro del capítulo (**Figura 9** A y B). Los capítulos ME presentaron un diámetro mayor y por lo tanto un mayor número de flores disponibles, lo que podría explicar que los tiempos de recolección sobre éstos fueron mayores que sobre los capítulos MF (**Figura 10**). En este lote (LH2) las abejas visitaron el mismo número de inflorescencias en cada parental **(Tabla 1**). Finalmente, en los lotes cuyos cultivares ME y MF mostraron marcadas diferencias morfológicas (**Figura 8B**; **Figura 9 A y B**) la constancia floral de las abejas en cada vuelo recolector fue muy marcada. En LH4 se registró 100% de constancia floral en ambos parentales, mientras que en LH3 se observó una constancia del 100% y 98% sobre las líneas ME y MF respectivamente (**Figura 11**). Además, el tiempo de recolección sobre cada planta fue marcadamente diferente: las abejas pasaron el doble de tiempo recolectando sobre los capítulos ME que sobre los capítulos MF (**Figura 10**), probablemente debido al mayor diámetro y por lo tanto mayor número de flores disponibles en los capítulos ME. El número de inflorescencias ME visitadas fue mayor que el registrado en las líneas MF (**Tabla 1**).

Se demostró que las abejas discriminan entre las líneas parentales cuando éstas difieren en su morfología, y responden comportamentalmente a los parentales ME y MF como fuentes de recursos diferentes. Por el contrario, en los lotes que presentaron mayor homogeneidad morfológica entre cultivares, las abejas mostraron comportamientos similares sobre cada uno de ellos, lo que indicaría que en este caso son percibidos como una misma fuente. Como consecuencia, el grado de disimilitud morfológica entre las líneas ME y MF determinaría la frecuencia en la que las abejas realizan vuelos cruzados entre ellos. Nuestras observaciones sugieren que la heterogeneidad entre los cultivares ME y MF perjudica la polinización cruzada de este sistema agrícola como resultado de una menor frecuencia de vuelos cruzados entre parentales. Aún así, es importante señalar que incluso en lotes con parentales morfológicamente homogéneos se registró un bajo porcentaje de abejas realizando vuelos entre ellos. El máximo valor observado en este sentido fue del 15%, y es consistente con observaciones previas (DeGrandi-Hoffman y Martin 1993). Es posible entonces que las diferencias entre las líneas ME y MF en términos de otras claves sensoriales distintas a las visuales, como olores relacionados con el polen o aromas florales combinados con diferencias en la calidad del néctar y su disponibilidad, pudieran estar influenciando el comportamiento de la abeja melífera y promoviendo la constancia floral.

La presencia de granos de polen de girasol en el cuerpo de las abejas capturadas en las colmenas y sobre inflorescencias ME podría sugerir que los contactos corporales entre compañeras de nido dentro de la colmena contribuyen a

la polinización cruzada de este cultivo. Este transferencia es particularmente evidente entre las abejas ingresantes y las que salen a recolectar. En LH3 y LH4, donde se estudió la presencia de granos de polen en el cuerpo de las abejas, se encontraron diferencias entre lotes en el porcentaje de abejas con granos de polen en el cuerpo tanto para aquellas capturadas en los nidos como en las atrapadas sobre los capítulos ME. Es probable que estas diferencias se relacionen con el tamaño del grano de polen. Los granos de polen de girasol tienen pollen kitt (sustancia lipídica que pegotea los granos, Gotelli et al. 2008), una exina ornamentada (**Figura 8**D) y con frecuencia forman agregados de cinco o más granos (Seiler 1997). Además, las fuerzas de adhesión entre partículas rugosas en el intervalo de tamaño de los granos de polen de LH3 y LH4 aumenta con el diámetro de las partículas (Kendall y Stainton 2001). Si la formación de estos apelotonamientos fuera más frecuente entre los granos de polen de LH3 (el de mayor tamaño de grano), esto dificultaría la transferencia que se produce por medio de fuerzas electrostáticas desde las anteras hacia el cuerpo de los insectos (Corbet et al. 1982). Una menor transferencia de polen al cuerpo de las abejas en el parental de polen de LH3 podría explicar porqué, para todas las categorías de abejas capturadas, se registró un menor porcentaje de abejas con polen en su cuerpo en este lote.

La polinización cruzada de este cultivo podría, por lo tanto, involucrar no sólo los vuelos entre parentales sino también mecanismos de transferencia de polen mediados por contactos corporales dentro del nido. El porcentaje de abejas con polen en el cuerpo que se registró para las abejas capturadas dentro de las

colmenas, así como trabajos previos, apoyan esta idea (DeGrandi-Hoffman y Martin 1993). Cuando las abejas recolectoras regresan a la colmena interaccionan de distinta manera con sus compañeras de nido (Balbuena et al. 2012a). Las abejas ubicadas en la entrada de la colmena y que realizan tareas de defensa, ventilación u otras relacionadas con el procesamiento y almacenamiento de alimento podrían tener un rol crucial como vectores de polen, en sus interacciones con las abejas que regresan del exterior y las que parten a recolectar (Lindauer 1952; Pacheco y Breed 2008). Los contactos corporales deliberados sumados a otros accidentales propagarían el polen adherido al cuerpo de las abejas (Free y Williams 1972) amplificando su transferencia desde las líneas MF hacia las ME. En este sentido, es importante señalar que se constató la presencia de diferentes parentales de polen a 2.4 km (observación personal), haciendo posible que las abejas de una misma colmena visiten más de un parental de polen y posibilitando la producción de semillas heterogéneas.

Teniendo en cuenta la constancia floral de la abeja melífera, estrategias como el uso de capítulos MF de mayor diámetro que aumenten la disponibilidad de polen o dispositivos que promuevan la transferencia de polen en la entrada de las colmenas (Hatjina et al. 1999), podrían incrementar el rendimiento de estos cultivos. En relación a ello y como implicancia de los resultados obtenidos, se sugiere a los productores de semilla híbrida complementar los aspectos botánicos de las técnicas de mejoramiento de producción con estudios relativos a las habilidades cognitivas del polinizador de este sistema.

3. Evaluación del efecto de un formulado sintético específico sobre el comportamiento recolector de la abeja melífera en cultivos de girasol para la producción de semilla híbrida

3.1. Introducción

El "complejo oleaginoso" conformado principalmente por los cultivos de girasol y soja es hoy el principal bloque exportador y uno de los pilares de la economía nacional. Los avances genéticos junto con la adecuada fertilización de los suelos en el contexto de la Agricultura de Precisión y la optimización de las condiciones de cosecha y post – cosecha mediante equipos adecuados, posicionaron al girasol como un cultivo de alta demanda tecnológica. Aún así, actualmente este cultivo enfrenta numerosos desafíos entre los que se encuentran limitaciones en el potencial de su rendimiento a altas densidades de siembra, variaciones estacionales y la necesidad de caracterizar ambientes girasoleros (Franco 2010).

El objetivo de la producción de semillas de girasol para siembra (girasol – semilla) es obtener semillas genética y físicamente puras, fisiológicamente sanas y libres de patógenos y concierne, en general, semillas híbridas. La eficiencia de este sistema productivo depende tanto del desarrollo *genético* como del *tecnológico*. En relación a su aspecto *genético*, este sistema es el resultado de dos descubrimientos independientes: la esterilidad masculina citoplasmática por Patrice Leclercq en 1969 en Francia y la restauración genética de fertilidad por Murray Kinman en 1970

en Estados Unidos (De Estrada et al. 2012). En este contexto, y como se detalló en el capítulo anterior, la producción de semillas de girasol híbridas se lleva a cabo mediante la siembra de cierto número de surcos de parentales de polen o líneas Macho Fértil (MF) intercalados con un número mayor (generalmente el doble o el triple) de surcos de parentales productores de semilla o parentales Macho Estéril (ME). La transferencia de polen entre ambos depende exclusivamente de la abeja melífera, y para ello las empresas productoras de semilla alquilan, en estos cultivos, el Servicio de Polinización de entre 2 y 6 colmenas comerciales por hectárea (observación personal). El desarrollo *tecnológico*, por su parte, en el marco de la denominada Agricultura de Precisión permitió adecuar el manejo del suelo y del cultivo a la variabilidad intrínseca de cada lote. Como consecuencia, los lotes que previamente eran considerados como unidades productivas, en la actualidad son manejados con una precisión sitio-específica. Este nuevo concepto de Agricultura automatizó el manejo del cultivo específicamente en cada zona del lote utilizando computadoras, sensores y otros equipos electrónicos. Estas herramientas permitieron generar y analizar datos geo-referenciados que mejoraron el diagnóstico, las decisiones y la administración de los insumos.

Si bien el desarrollo alcanzado es el resultado de un profundo conocimiento de los sistemas productivos, en los cultivos dependientes de polinización por abejas como el girasol – semilla, los aspectos vinculados a este servicio han sido poco estudiados. Como se describió en el capítulo anterior, en algunos de estos cultivos las diferencias morfológicas entre las líneas parentales son acentuadas y frente a

esta oferta floral heterogénea la abeja melífera distingue los cultivares ME y MF como diferentes recursos y responde con un comportamiento recolector constante sobre cada uno de ellos. En este escenario, y considerando la contribución del intercambio de polen dentro de la colmena a la polinización cruzada de este cultivo, un incremento en la actividad de las colmenas podría generar aumentos en el rendimiento final de estos cultivos.

Como se mencionó, la abeja melífera se caracteriza por su organización social, capacidad de aprendizaje, y la habilidad para comunicar claves sensoriales, como la riqueza y la ubicación de los recursos florales, a sus compañeras de nido (von Frisch 1967; Seeley 1995; Farina et al. 2005). Estos aspectos la convierten en uno de los polinizadores más eficientes en un amplio espectro de ambientes agrícolas (Seeley 1985). Asimismo se especificó la importancia de los olores florales en la búsqueda y recolección de alimento de la abeja melífera, y que a pesar de que estas claves exhiben gran complejidad y variabilidad, este insecto muestra una asombrosa capacidad para aprenderlos, discriminarlos y reconocerlos (Reinhard et al. 2010). La abeja melífera percibe las fragancias naturales asociadas al alimento tanto en la visita a una flor como durante el reclutamiento dentro del nido y la presentación conjunta de las claves olfativas y el alimento permite el establecimiento de memorias olfativas (Menzel y Erber 1978; Reinhard et al. 2004). Sorprendentemente, aunque los olores florales están constituidos por mezclas complejas de volátiles (Dudareva y Pichersky 2006), el aprendizaje de sólo algunos

de estos compuestos es suficiente para dirigir la búsqueda de alimento (Pham-Delegue et al. 1986).

En estudios previos se demostró que el contacto con néctar aromatizado dentro de la colmena juega un importante rol en la activación y reactivación recolectora (von Frisch 1923; von Frisch 1943; von Frisch 1967; Wenner et al. 1969; Arenas et al. 2007; Arenas et al. 2008). La propagación de olores dentro de la colmena sumada a las habilidades de los distintos grupos de abejas para recordar y utilizar esta información en los comportamientos de búsqueda permite suponer que la estimulación de las colmenas con alimentos aromatizados daría lugar a efectos globales. En este sentido, los primeros intentos de mejorar la polinización de cultivos comerciales mediante condicionamientos olfativos dentro de la colmena arrojaron resultados dispares (von Frisch 1943; von Frisch 1967).

En el Grupo de Estudio de insectos Sociales donde se elaboró la presente Tesis se desarrolló una mezcla sintética que simula el olor natural de las flores de girasol, en adelante Formulado de Girasol (FG). Se observó, en estudios realizados en el paradigma de REP, que las abejas no discriminan esta mezcla del olor natural de girasol. En ensayos a campo se evidenció que la estimulación de las colmenas con FG produce incrementos en la actividad recolectora de las abejas y específicamente sobre los cultivos de girasol. Adicionalmente se observó que la aplicación de esta mezcla en el interior de las colmenas promueve la orientación específicamente hacia los cultivos de girasol.

A pesar de contar con estos resultados, se desconoce hasta el presente cuál es la incidencia de esta estimulación olfativa sobre el cultivo en términos de rendimiento. Es por ello que en este capítulo se comparará la actividad de colmenas tratadas con FG versus tratamientos control, ubicadas en campos de girasol – semilla para su polinización. Se plantea aplicar dos tratamientos: i) solución azucarada aromatizada con el formulado sintético (FG), ii) solución azucarada sin aromatizar; además se considerará como tercer tratamiento iii) grupos de colmenas sin tratar. Posteriormente, nos focalizaremos en el análisis del rendimiento de dichos campos. Para esto, y a partir de los datos generados por cosechadoras New Holland durante la cosecha y suministrados por la empresa semillera (Dow Agrosciences), se elaborarán mapas de rendimiento. Se comparará entre tratamientos la información resumen que acompaña dichos mapas. Los mapas se analizarán cuantitativamente y se aplicarán correcciones relativas a la densidad de colmenas por hectárea.

3.1.1. Hipótesis

Las abejas de colmenas estimuladas con la mezcla sintética que simula el olor floral de girasol (FG) tienen una mayor actividad recolectora y sesgada hacia las flores de girasol, lo que generará incrementos en el rendimiento final de los lotes cercanos a las colmenas tratadas

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Sitio de estudio y animales

Se estudió el efecto de formulaciones sintéticas que imitan el olor floral de girasol sobre el comportamiento recolector de la abeja *Apis mellifera* en cultivos de girasol *Helianthus annuus* para producción de semilla híbrida. Los lotes estudiados se encontraban en las cercanías de Hilario Ascasubi (39°22′0″S, 62°39′0″ W) y Pedro Luro (39 30′0″S, 62°41′0″ W), en la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Para ello, durante la temporada de floración 2012 (Enero 2012), las colmenas que polinizaban diferentes lotes de girasol fueron expuestas a diferentes tratamientos. Posteriormente se realizaron mediciones de actividad de las colmenas y del rendimiento de los cultivos en sus cercanías. Cada lote estaba cultivado con distintas combinaciones de parentales Macho Estéril (ME) y Macho Fértil (MF) y por lo tanto producían diferentes híbridos.

Las colmenas estudiadas se encontraban en cinco pares de lotes, cada uno productor de uno de cuatro híbridos (H) a los que referiremos en adelante como LH1, LH2, LH5 y LH6 [se estudiaron dos pares de lotes que producían H5: en adelante LH5(1) y LH5(2)]. En la **Figura 13** se muestran los pares de lotes productores de A) el híbrido 2 (LH2) y B) el híbrido 5 (LH5(2)) incorporados al estudio.

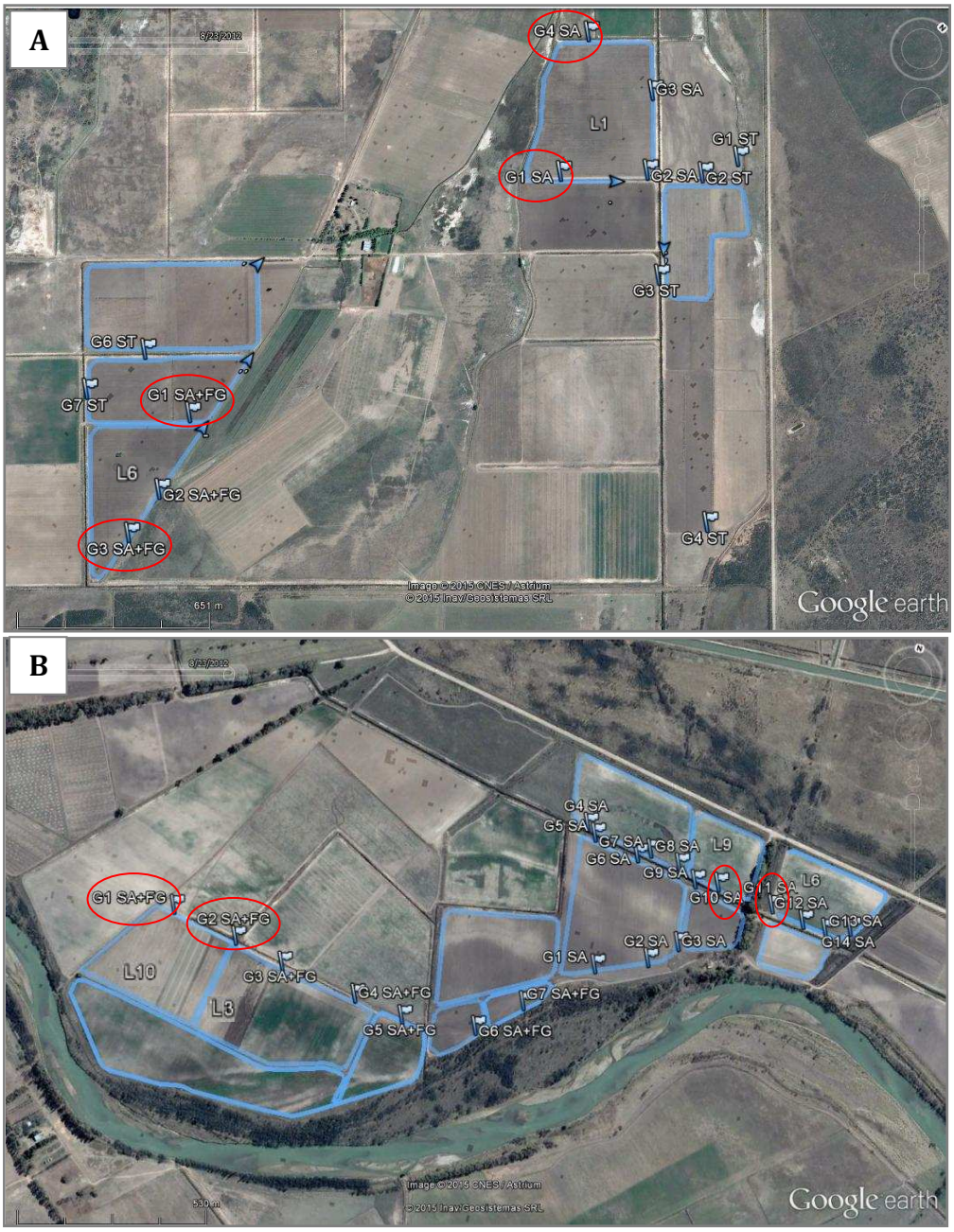


Figura 13. Cultivos de girasol (*Heliathus annuus*) para la producción de semilla híbrida en las cercanías de de Hilario Ascasubi (39°22′0″S, 62°39′0″ W) y Pedro Luro (39° 30′ 0″ S, 62° 41′ 0″ W), Sur de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. **A**) Los lotes productores de H2. B) Lotes productores de H5(1). L= lote. Los recuadros indican lotes con cultivos de girasol. G= grupos de colmenas. Los mismos se enumeran consecutivamente para cada tratamiento en cada lote. SA: solución azucarada sin aromatizar; SA + FG: solución azucarada aromatizada con FG, ST: sin tratar.

Los lotes LH1 y LH2 de este capítulo se corresponden con los lotes LH1 y LH2 del capítulo anterior, mientras que en LH5 y LH6 se produjeron híbridos no estudiados previamente. En relación a su uso, la segunda generación de estos cultivos daría semillas para usadas como confituras en el caso de LH1, LH2 y LH5, y para la obtención de aceite de alta calidad en el caso de LH6.

El diseño de plantación y la empresa a cargo de la comercialización de los lotes, fueron los mismos que los detallados en el capítulo anterior (ver Capítulo 2).

En todos los lotes el servicio de polinización se aseguró mediante la contratación de colmenas comerciales de *Apis mellifera* idénticas a las descriptas en el capítulo anterior (ver Capítulo 2). Las mismas se agruparon en un número variable de colmenas (de 3 a 18), alcanzando una densidad de entre 2,4 a 5,7 colmenas por hectárea en todos los campos. Todas las colmenas identificadas dentro de un radio de 150 metros a los lotes estudiados fueron consideradas para posteriores ponderaciones del rendimiento.

3.2.2. Estimulación olfativa de las colmenas

La mezcla sintética denominada en este trabajo como Facilitador Girasol, fue conformada teniendo en cuenta el perfil de compuestos volátiles de las flores de girasol reportado previamente (Etievant et al. 1984). Los detalles de dicho formulado forman parte de una solicitud de patente (Farina et al. 2011b) aún no publicada. Por motivos inherentes al negocio potencial, en esta tesis se excluye la difusión de información detallada al respecto.

Entre las colmenas de cada par de LH1, LH2 y LH5(1) se sortearon al azar los tratamientos:

1) Solución azucarada 50% p/p sin aromatizar (SA)
2) Solución azucarada 50% p/p aromatizada con Facilitador Girasol (FG) (50µL/L)

Entre las colmenas de los restantes pares de lotes [LH3, LH4 y LH5(2)] se sortearon al azar los tratamientos:

2) Solución azucarada 50% p/p aromatizada con Facilitador Girasol (FG) (50µL/L)
3) Sin tratar

En todos los casos la solución azucarada se preparó con agua tibia, y cada colmena recibió 500 ml de solución. Los tratamientos se aplicaron a las colmenas levantado la tapa de cada una de ellas y esparciendo las soluciones correspondientes sobre el marco de los cuadros. La aplicación de los tratamientos se realizó al 100% de floración del parental MF y con una floración mayor al 15% del parental ME, en todos los lotes.

3.2.3. Actividad en las colmenas

Como indicador general de la actividad de las colmenas, en LH1 y LH5(1), se registró el número de abejas ingresantes por minuto. Esta medición se realizó a

partir de los 2 días y hasta los 7 días posteriores a la estimulación de las colmenas y en la misma franja horaria entre tratamientos. Los días de registro fueron elegidos con el criterio de homogeneizar el nivel de floración del cultivo circundante entre tratamientos. La evaluación de esta variable se llevó a cabo en 43 colmenas de cada tratamiento elegidas al azar entre las colmenas tratadas y cada colmena se monitoreó en un solo día.

Los mismos días de registro de actividad de las colmenas se estudió la densidad de abejas en el cultivo de girasol más próximo a las mismas. Para ello, entre uno y tres observadores contabilizaron simultáneamente las abejas a lo largo de transectas delineadas desde las cercanías de las colmenas y hasta los 100 metros cultivo adentro. En los conteos se abarcaron 2 hileras de siembra del mismo tipo parental. Las mediciones realizadas sobre hileras de plantas que mostraron un avance de floración menor al 30% fueron descartadas. En total se consideraron los relevamientos de 18 transectas lineales diferentes por tratamiento.

3.2.4. Rendimiento del cultivo

Los granos de girasol fueron cosechados en LH1, LH2, LH5(2) y LH6 por medio de cosechadoras New Holland. Estas cosechadoras presentan sensores y sistemas de posicionamiento que permiten medir y grabar el rendimiento y la humedad del grano a medida que se cosecha el cultivo (**Figura 14**).

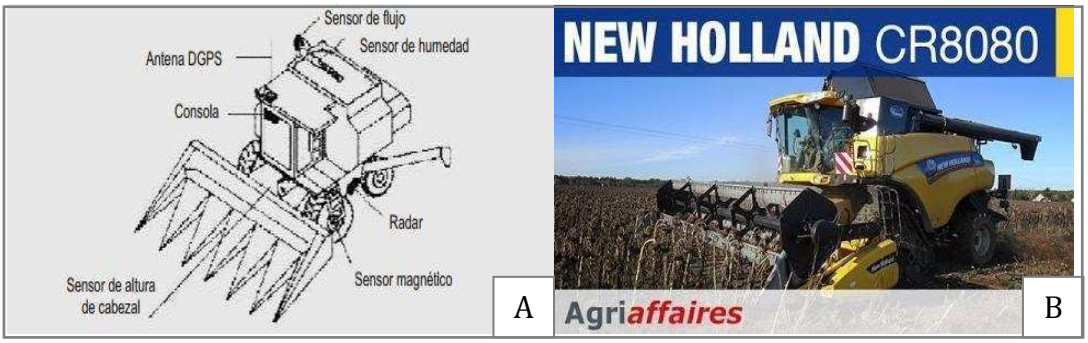


Figura 14. Cosechadoras New Holland. A) Esquema del tipo y ubicación de los diferentes sensores. B) Fotografía de cosechadora de granos New Holland CR 8080.

La información sobre la cosecha en el espacio y tiempo, obtenidos con este equipamiento, pueden posteriormente sintetizarse en un mapa que informa el rendimiento mínimo, máximo y promedio del lote y el área total cosechada entre otros datos. En esta tesis, las matrices de rendimiento generadas durante la cosecha y facilitadas por Dow Agroscience, se procesaron con el programa Ag Leader Technology Basic (versión gratuita de prueba) para la generación de los mapas. En la **Figura 15** se observa, como ejemplo, un mapa de rendimiento (Ver todos los mapas en **Anexo**).

Figura 15. Mapa de rendimiento obtenido con el programa Ag Leader Technology Basic (versión gratuita de prueba). Los diferentes colores indican distintos intervalos de máximo y mínimo nivel de cosecha (ton/ha).

El rendimiento promedio informado en los mapas se comparó entre los miembros de cada uno de los cuatro pares de lotes productores de LH1, LH2, LH5(2) y LH6. Para calcular el incremento en el rendimiento de los lotes polinizados por las colmenas tratadas con el Formulado de Girasol se aplicó la fórmula de incremento porcentual:

$$C = \frac{B - A}{A} \times 100$$

Donde C es el incremento porcentual, B el rendimiento de los lotes con FG y A el rendimiento de los lotes control (ya sea con colmenas sin tratar o estimuladas con agua azucarada).

Cada lote miembro del par había sido polinizado por abejas pertenecientes a colmenas sometidas a diferentes tratamientos. Debido a la heterogeneidad en el número de colmenas en los lotes, previo a la comparación entre tratamientos, el rendimiento promedio por unidad de superficie de cada lote fue corregido por el número de colmenas. Además de considerar las colmenas de la periferia de los lotes se tuvieron en cuenta todas aquellas presentes en un radio de 150 metros a los lotes.

El relevamiento del número y ubicación de las colmenas se realizó con un GPS Garmin Nüvi 1200. Para su geo-referenciación un observador se posicionó junto a cada grupo de colmenas en todos los lotes e indicó una marca de camino (Way Point). Esta información fue posteriormente procesada con el programa MapSource. En la **Figura 16** se observa, como ejemplo, uno de los lotes productor de H5; y todos los grupos de colmenas ubicados en un entorno de 150 metros (Ver todos los mapas en **Anexo**). En este caso particular corresponde a todas las colmenas ubicadas en el borde del lote.

Complementariamente se evaluó la homogeneidad del rendimiento informado por las matrices generadas durante la cosecha de cada lote. Para esto, se seleccionaron al azar (usando el programa Infostat) cinco mil datos correspondientes a la columna " Masa de Rendimiento" de cada lote y se calculó en Coeficiente de Variación.

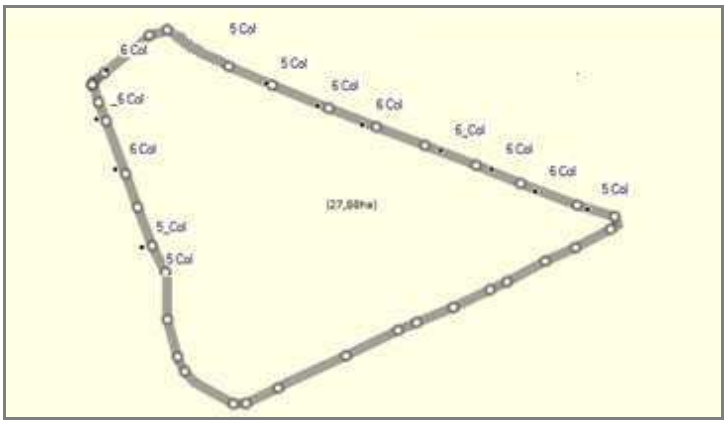


Figura 16. Ubicación y número de colmenas en el entorno de uno de los lotes de LH5(1). La imagen se obtuvo con el programa MapSource exportando las marcas de camino (Way Point) generadas en el campo. Se observa la posición de todos los grupos de colmenas ubicados en el entorno del lote y el número de colmenas en cada grupo.

Finalmente, en LH5(1) la cosecha se realizó manualmente en el entorno de dos grupos de colmenas de cada tratamiento a los 30 y a los 70 metros de las mismas. Estos grupos de colmenas corresponden a aquellos con un círculo rojo en la **Figura 13**C. El rendimiento obtenido en esta cosecha, informado por la empresa comercializadora de granos, también fue ponderado por el número de colmenas presentes en un radio de 150 metros y posteriormente comparado entre tratamientos.

3.2.5. Estadística

El número de abejas ingresantes por minuto y la densidad de abejas en el cultivo se analizaron por medio de un análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores con tratamiento e híbrido como factores de dos niveles cada uno. Para cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas los datos se transformaron aplicando la función $\log_{10}$. Cuando no se encontraron diferencias significativas en la interacción tratamiento*lote, se computaron efectos simples (Prueba de Tukey) entre tratamientos (Zar 1999).

Se realizaron análisis exploratorios de las matrices de datos de las cosechadoras que permitieron identificar a partir de qué columna de datos el programa Ag Leader Technology Basic calcula el rendimiento promedio (Ton/ha) de los lotes que resume en los mapas. La información de dicha columna se utilizó para comparar el Coeficiente de Variación entre tratamientos en los pares de lotes LH1, LH2, LH5(2) y LH6. Con este objetivo, y dado el gran número de datos, se seleccionaron al azar cinco mil datos de cada lote con el programa Infostat, y se calculó el Coeficiente de Variación.

El rendimiento de LH5(1) obtenido por cosecha manual se comparó entre tratamientos con un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, seguido de un Prueba de Tukey ($p < 0.05$) (Zar 1999).

3.3. Resultados

3.3.1. Estimulación olfativa de las colmenas

En total 188 colmenas fueron tratadas con solución azucarada sin aromatizar (SA) y 309 con solución azucarada aromatizada con Facilitador Girasol (SA+FG). El tratamiento correspondiente a cada lote se aplicó a todas las colmenas ubicadas en su periferia. Específicamente, por lote productor de cada híbrido el número de colmenas estimuladas fue de 32 con SA y 69 con SA+FG en LH1; de 57 con SA y 50 con SA+FG en LH2 y de 99 con SA y 72 colmenas con SA+FG en LH5(1). En los lotes productores de LH5(2) y LH6, dado que el tratamiento control en este caso constó de colmenas sin tratar, sólo se estimularon las colmenas del lote al que se le adjudicó el tratamiento SA+FG. En LH5(2) se trataron 55 colmenas y en el lote productor de H6 un total de 63 colmenas.

En cada lote se procuró aplicar los tratamientos en el momento en que la floración del parental ME circundante a las colmenas superara el 15% (estimación visual). Debido a que la siembra del parental MF se realiza más tempranamente, el nivel de floración del mismo en todos los casos fue cercano al 100%.

3.3.2. Evaluación del efecto de un formulado sintético específico en la actividad recolectora

La actividad de las abejas mostró diferencias significativas entre tratamientos para el número de abejas ingresantes por minuto (ANOVA de dos factores,

interacción híbrido*tratamiento no significativa; factor tratamiento F= 24,66; gl= 1, p<0,0001. **Figura 17**).

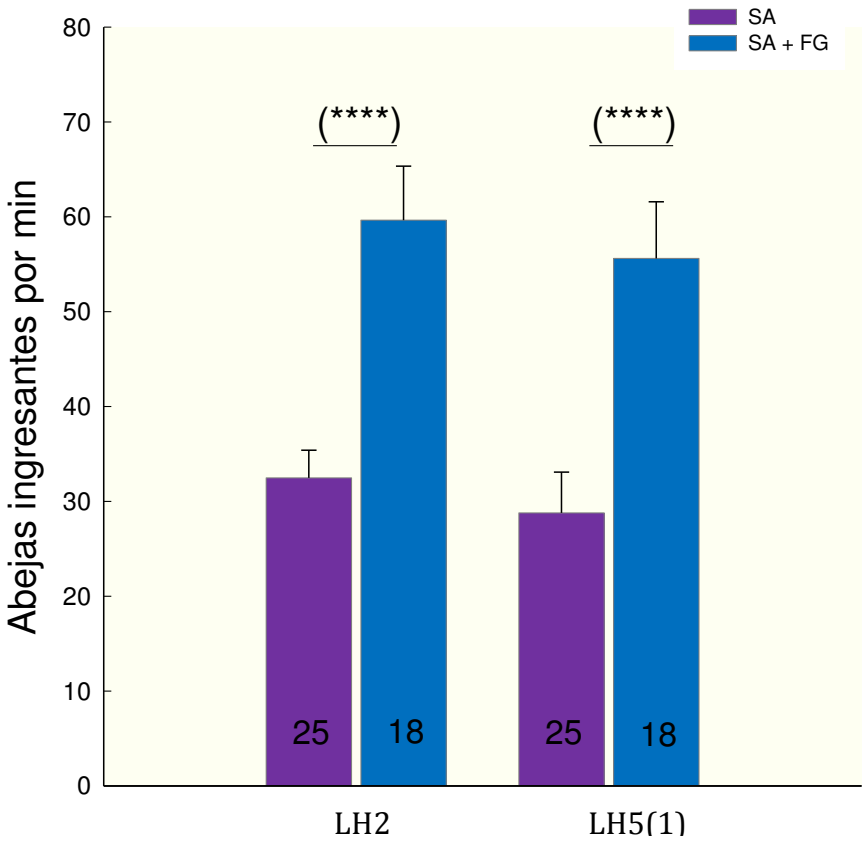


Figura 17. Actividad de las colmenas medido en la entrada. Se contabilizaron las abejas ingresantes por minuto (media ± EE) en dos pares de lotes, cada uno productor de un híbrido diferente [H2 y H5(1)]. Entre cada par de lotes se sortearon al azar los tratamientos SA: solución azucarada sin aromatizar y SA +FG: solución azucarada aromatizada con FG. Todas las colmenas de cada lote recibieron el mismo tratamiento y entre ellas se eligió al azar un grupo menor para esta medición. Los números en las barras indican el número de colmenas monitoreado en cada caso (ANOVA de dos factores; interacción híbrido * tratamiento no significativa; factor tratamiento significativo). **** representa diferencias significativas p<0,0001.

La densidad de abejas en el cultivo fue corregida por el número de colmenas relevadas en un radio de 150 metros a las transectas (**Tabla 2)**.

Tabla 2. Lotes con cultivos de girasol productores de semilla híbrida H2 y H5(1). Se detallan: tratamientos, grupo de colmenas desde donde se delinearon las transectas para contabilizar las abejas en el cultivo (**Figura 13** B y C), las colmenas adicionales en un radio de 150 metros y el total de colmenas consideradas para corregir la variable "densidad de abejas sobre el cultivo".

Lote	Lote	Tratamiento	Grupo de colmenas	Colmenas del grupo	Otras colmenas(*)	Total colmenas
LH2	1	SA	1	12	0	12
			4	13	0	13
	6	SA + FG	1	15	0	15
			3	18	0	18
LH5(1)	9	SA	1	9	6	15
	6		1	9	6	15
	10	SA + FG	1	12	0	12
	Entre 10 y 3		2	12	0	12

En el Híbrido 2 las colmenas presentes en un radio de 150 metros a las transectas sobre las que se realizaron los monitoreos de esta variable sólo eran las de los grupos desde donde partieron las transectas. En cambio, en el Híbrido 5(1) los lotes que recibieron el tratamiento SA tenían otros grupos muy próximos, tanto en el lote 6 como en el lote 9 (**Figura 13**C). Se encontraron diferencias significativas en la densidad de abejas sobre el cultivo ponderada por el número de colmenas en un radio de 150 metros a las mismas (ANOVA de dos factores; interacción híbrido*tratamiento no significativa; factor tratamiento F= 10,96; gl= 1, p= 0,0026. **Figura 17**).

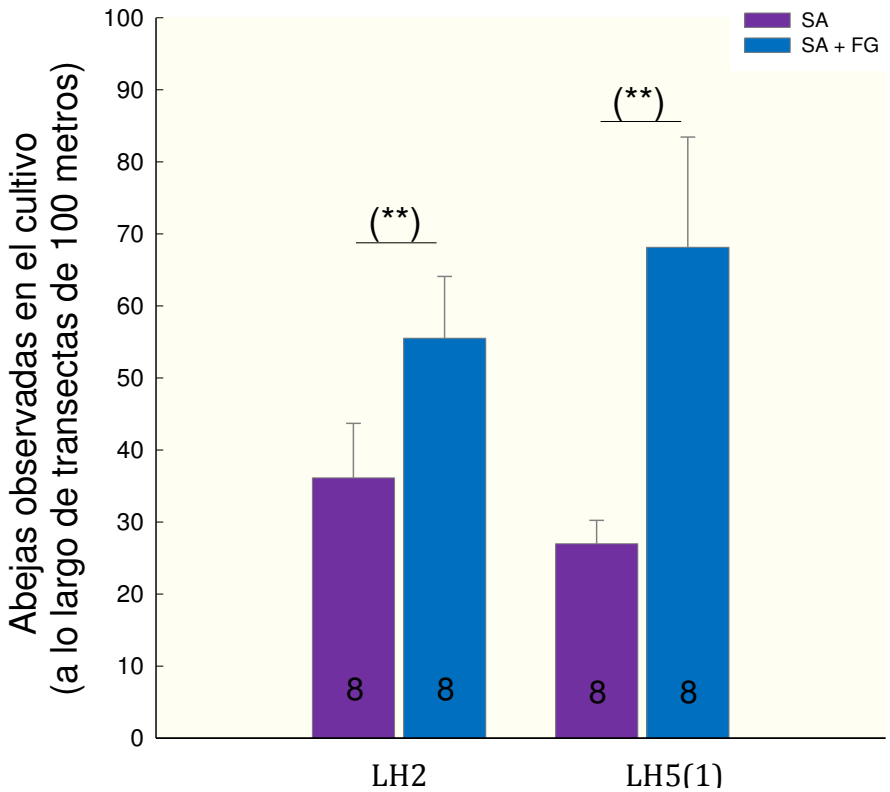


Figura 18. Actividad de las colmenas tratadas medida como densidad de abejas (media ± EE) en su entorno. Se contabilizaron las abejas que recolectaban sobre dos hileras de siembra a lo largo de transectas de 100 metros elegidas al azar en dos pares de lotes, cada uno productor de un tipo de semilla híbrida diferente [H2 y H5(1)]. Entre cada par de lotes se sortearon al azar los tratamientos SA: solución azucarada sin aromatizar y SA + FG: solución azucarada aromatizada con FG. Todas las colmenas de cada lote recibieron el mismo tratamiento. Los números en las barras indican el número de transectas relevadas en cada caso (ANOVA de dos factores; interacción lote * tratamiento no significativa; factor tratamiento significativo). ** representa diferencias significativas $p<0,01$.

3.3.3. Evaluación del efecto de un formulado sintético específico en el rendimiento de los cultivos

La información del rendimiento de los lotes generada por las cosechadoras New Holland durante la recolección de los granos de girasol fue proporcionada por la empresa comercializadora de los lotes. Dichos datos se procesaron con el programa Ag Leader Technology Basic y se obtuvo, para cada lote, un mapa acompañado por el resumen de los datos de rendimiento (valores mínimos, máximos y promedio). El rendimiento promedio informado en dichos mapas fue corregido por el número de colmenas geo-referenciadas en un radio de 150 metros a los lotes y comparado entre tratamientos. Todos los lotes expuestos a colmenas tratadas con FG evidenciaron más de toneladas de semillas por hectárea.

Los incrementos oscilaron entre el 29 y el 57% (**Figura 19**A). Específicamente se obtuvieron rendimientos superiores en un 37%, 46%, 29% y 57% en LH1, LH2, LH5(2) y LH6 respectivamente. También se evidenció un mayor rendimiento en el lote tratado con FG (ANOVA de un factor, $F= 9,43$; $gl= 1$, $p<0,05$) en el par de lotes cosechado manualmente (y posteriormente ponderado por el número de colmenas en un radio de 150 metros. **Figura 19**B).

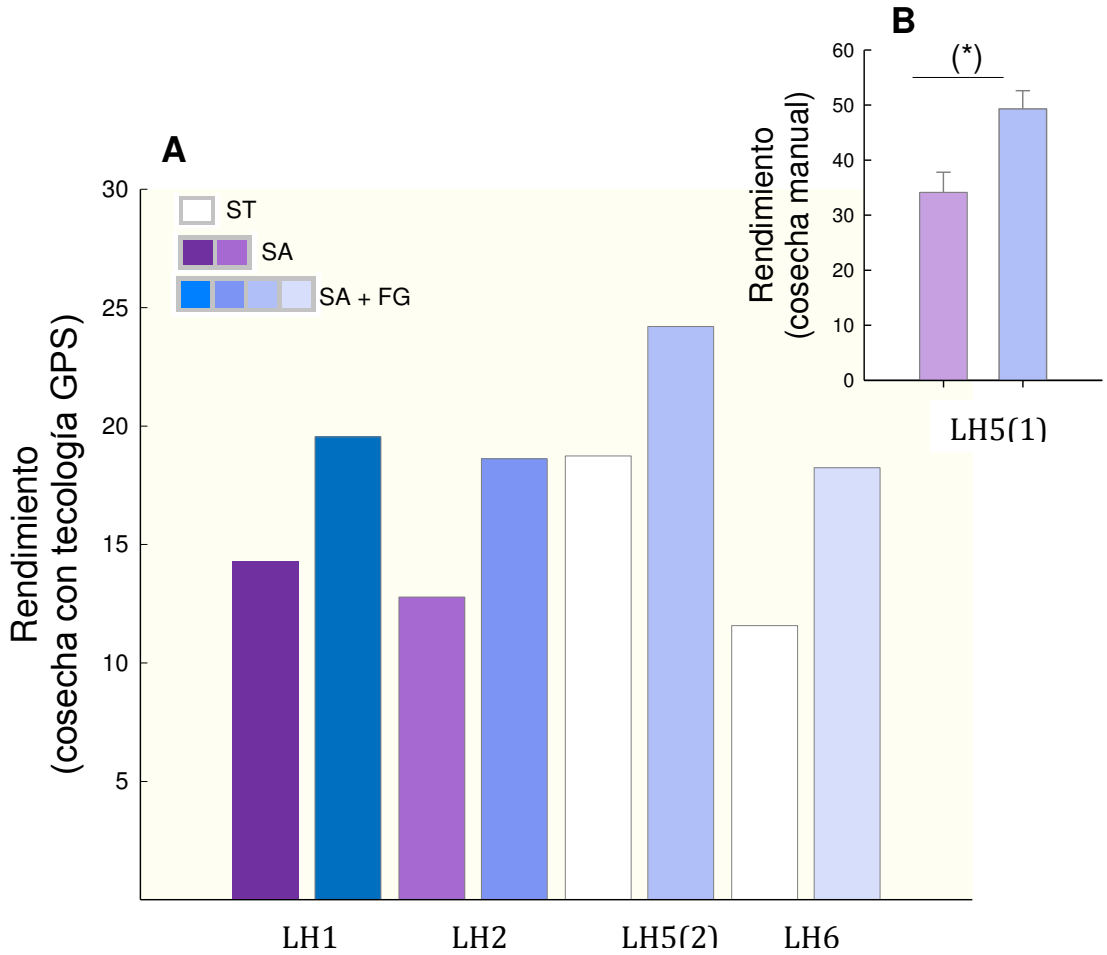


Figura 19. Rendimiento del cultivo en cuatro lotes productores de diferentes semillas híbridas. **A)** Promedio informado en los mapas de rendimiento ponderado por el número de colmenas en un radio de 150 metros a cada lote; **B)** Kg cosechados manualmente en 8 hileras por lote ponderado por el número de colmenas en un radio de 150 metros. Lotes polinizados por colmenas: ST: sin tratar; o bien tratadas con SA: solución azucarada sin aromatizar o SA + FG: solución azucarada aromatizada con FG. * representa diferencias significativas $p<0,05$.

En todas las comparaciones el rendimiento de los lotes con colmenas tratadas con FG fue más homogéneo (**Tabla 3**). Específicamente se observaron reducciones

en el Coeficiente de Variación (CV) del 52%, 31%, 23% y 39% en LH1, LH2, LH5(2) y LH6 respectivamente.

Tabla 3. Coeficiente de Variación correspondiente a 5000 datos de rendimiento informado por cosechadoras New Holland para 4 pares de lotes. Cada par de lotes corresponde a la producción de un tipo de semilla híbrida y cada lote del par fue polinizado por colmenas expuestas a diferentes tratamientos.

Lote	Tratamiento	N	CV
LH1	SA	5000	95,21
	SA + FG	5000	45,74
LH2	SA	5000	60
	SA + FG	5000	41,64
LH5(2)	ST	5000	42,05
	SA + FG	5000	32,47
LH6	ST	5000	72,04
	SA + FG	5000	43,96

3.4. Discusión y conclusiones

En este capítulo se muestra cómo la aplicación del Facilitador Girasol en colmenas que polinizan cultivos de girasol *Helianthus annuus* incrementa la actividad recolectora de las abejas y el rendimiento de los cultivos en sus inmediaciones. Estas variables fueron comparadas entre tratamientos (FG versus tratamientos control) aplicados a colmenas que polinizaban lotes productores del mismo tipo de semilla híbrida. Las evaluaciones del rendimiento incluyeron tanto el análisis de datos generados por cosechadoras con tecnología de precisión, como también cosechas realizadas manualmente. El estudio se realizó a una escala nunca

evaluada anteriormente en ensayos experimentales con colmenas: se estimularon 497 colmenas y se evaluó el rendimiento de cultivos de girasol – semilla en una extensión de 200 hectáreas en total.

En el marco del desarrollo de esta formulación se había observado que las abejas no podían discriminar el olor de FG del olor de las flores naturales de girasol en ensayos realizados bajo el paradigma REP. Como consecuencia de ello se sugirió que esta mezcla podría representar los olores clave usados por las abejas para el reconocimiento de esta fragancia floral (Pham-Delegue et al. 1986; Reinhard et al. 2010) y que la presentación de FG asociado con una recompensa aumentaría su similitud en términos de relevancia biológica con el olor floral. Ensayos a campo previos a esta Tesis mostraron que las colmenas tratadas con FG alcanzaban elevados niveles de actividad más tempranamente que las colmenas control y que las memorias formadas en el interior de la colmena como consecuencia de la aplicación del FG sesgaban la recolección hacia las inflorescencias de girasol. Sin embargo, se desconocía el efecto de estas estimulaciones sobre el rendimiento de los cultivos.

Los primeros intentos de incrementar la polinización de cultivos estimulando colmenas con machacados florales no tuvieron los controles adecuados y los resultados no fueron concluyentes (von Frisch 1943). En este sentido, estudios más recientes demostraron que las memorias olfativas formadas dentro de la colmena afectan las preferencias recolectoras a largo término (Arenas et al. 2007; Arenas et

al. 2008). Estas evidencias, sumadas a los resultados obtenidos en laboratorio y a campo en condicionamientos olfativos con FG, sugerían que la aplicación de esta formulación sintética podía incidir sobre los niveles de rendimiento.

Los estudios desarrollados en este capítulo mostraron una mayor actividad de las colmenas tratadas con FG, ya sea en su entrada (**Figura 17**), como en relación a la densidad de abejas en el cultivo adyacente a las mismas (**Figura 18**). Se resalta que algunos de los relevamientos incluidos en este análisis fueron realizados 7 días después de haberse aplicado las estimulaciones. En cuanto al rendimiento, en H5(1), se cosechó significativamente más en el lote con colmenas tratadas con FG y en los restantes híbridos, si bien no fue posible analizarlo estadísticamente, la tendencia fue la misma. Más aún, y como era de esperar, el máximo contraste en los niveles de rendimiento se obtuvo al comparar un lote con colmenas estimuladas con FG versus otro con colmenas sin alimentar (**Figura 19**). En línea con estos resultados, los lotes con colmenas expuestas al tratamiento con FG mostraron una mayor homogeneidad del rendimiento dentro del lote que aquellos tratados con solución azucarada o con colmenas son tratar (**Tabla 3**). En resumen, tanto el incremento observado en el rendimiento como su mayor homogeneidad dentro del lote muestran que la polinización fue más eficiente en los lotes con colmenas alimentadas con FG.

Es importante señalar que considerando que se trata de un ensayo experimental a gran escala bajo condiciones no controladas donde un sinnúmero de variables afectan cada fase del desarrollo de estos cultivos (variables climáticas,

diferencias en la calidad del suelo entre lotes productores de la misma semilla híbrida, e incluso diferencias entre colmenas), las tendencias homogéneas y las diferencias observadas entre tratamientos dan cuenta de la solidez del efecto de estas estimulaciones.

Los resultados indican que la aplicación de este estimulante incrementa la eficiencia polinizadora de las abejas sobre el cultivo, y son coherentes con aquellos obtenidos tanto en ensayos de laboratorio en el marco de su desarrollo como en los estudios preliminares a campo. Otro punto interesante de este desarrollo es que en este estudio se trabajó en campos productores de diferente tipo de semilla híbrida y por lo tanto, con distintas combinaciones de parentales Macho Estéril y Macho Fértil. El incremento del rendimiento obtenido en todos los casos analizados demuestra la efectividad de esta estimulación en un amplio espectro de híbridos de girasol. La formación de memorias olfativas en el interior de las colmenas mediante estas estimulaciones posibilita una recolección sesgada hacia el cultivo pocos días después de su aplicación. Como consecuencia, la adaptación de las colmenas trashumantes a los diferentes cultivos entre los cuales son desplazadas puede acortarse, asegurando una ventana temporal de hasta una semana con un pico de actividad preponderantemente sobre el cultivo.

La plasticidad de los mecanismos de formación de memorias (y su reversibilidad) junto con los variados requerimientos nutricionales de las colmenas que promuevan la búsqueda de alimentos en fuentes alternativas sugieren que, este

proceso no tiene efectos sanitarios adversos sobre las colmenas. Finalmente, tratándose de un método derivado de las prácticas usuales de los apicultores que alimentan a sus colmenas con machacados florales, su aplicación no complejiza las habituales prácticas apícolas.

Se propone incorporar este desarrollo como una técnica apropiada para incrementar el rendimiento de los cultivos de girasol mediante el sesgo en las preferencias recolectoras de abejas melíferas utilizadas en los Servicios de Polinización trashumantes.

4. Evaluación del efecto de un formulado sintético específico sobre el comportamiento recolector de la abeja melífera en cultivos de manzana

4.1 Introducción

Las tendencias mundiales de consumo están marcadas por los países desarrollados, donde los consumidores cada vez están más preocupados por su salud y la salud de quienes operan y viven en las áreas de producción, además de la conservación del medio ambiente. Como consecuencia, el número de tratamientos químicos en post-cosecha cada vez es menor, se racionaliza cada vez más el uso del agua y se ponen en práctica diversas medidas tendientes a minimizar el impacto de la producción sobre el ambiente. La producción de calidad vigente en este sector implica actualmente el Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades, las Buenas Prácticas Agrícolas, y también la producción diferenciada (es decir, producción orgánica, producción integrada, denominación de origen, etc.). Por todo lo dicho, la fruticultura actual está en expansión, y así como se detalló en el capítulo anterior en relación a los cultivos de girasol, también en este sector productivo existen fuertes inversiones en innovación tecnológica. El manejo de stocks, así como el control de calidad y el trasporte de mercaderías, previamente reservados para las actividades industriales, son en la actualidad herramientas intrínsecas de este sector productivo.

Según el Ministerio de Agricultura y Ganadería de la Nación, la Argentina aporta el 40% de la producción de frutas de pepita de América del Sur, y el 35% de este aporte está constituido por la exportación de manzanas. Específicamente durante los tres últimos años (2012 a 2014) esto significó una producción promedio de aproximadamente 900 mil toneladas (Minagri 2014). Los cultivos de manzana, en el país, se desarrollan en una superficie total de alrededor de 37.000 hectáreas centralizadas en las provincias de Río Negro, Neuquén y Mendoza.

Las principales variedades de manzana que exporta la Argentina son Red Delicious (61,1%), Granny Smith (15,1%) y Gala (también llamada Royal Gala) (15%), fácilmente distinguibles entre sí por su color: las dos primeras son rojas y verdes respectivamente, mientras que la última es bicolor con estrías (Benitez 2001) (**Figura 20**). Si bien todas las variedades presentan frutos de forma tronco-cónica, el peso, el calibre y el grado de acidez caracteriza a cada una de ellas.

Figura 20. Principales variedades de manzana de exportación.

La variedad ***Red Delicious*** tiene un peso que oscila entre 160 y 240 gramos y un calibre de entre 70 y 85 mm. Su pulpa es blanco amarillenta, jugosa y dulce, aunque tiende a perder su firmeza bajo ciertas condiciones. Además, los frutos óptimamente desarrollados se caracterizan por presentar cinco lóbulos o protuberancias bien marcadas. La variedad ***Granny Smith*** tiene un fruto mediano a grande, con un peso de entre 190 y 210 gramos y un calibre de entre 75 y 80 mm. Las manzanas de esta variedad son de color verde con lenticelas blancas, y su pulpa es blanca, crujiente, jugosa y con un sabor ligeramente ácido. El peso de la variedad ***Gala*** (o Royal Gala) oscila entre los 170 y 180 gramos y su calibre entre 65 y 75 mm. La intensidad y el porcentaje de la superficie del fruto cubierto de rojo dependen de varios factores, pero independientemente de ello, la pulpa siempre es de textura fina, amarillenta, crocante y jugosa (SENASA 2009) (**Figura 20**).

El árbol de manzana *Malus domestica* puede alcanzar los 10 metros de altura y vivir hasta 80 años. Un típico cultivo de esta especie frutal presenta marcos de plantación formados por numerosas filas de árboles. Las distancias entre árboles oscilan entre 2 a 3 metros, mientras que la separación entre las filas puede ser de 4 o 5 metros (**Figura 21**A). Las yemas florales son mixtas y dan origen a hojas y flores en grupos llamadas cimas, que pueden estar compuestas por 5 a 8 flores blancas a rosadas y hermafroditas (**Figura 21** B y C). Debido a que las variedades de manzana presentan diferentes grados de autoesterilidad (es decir, no pueden reproducirse por autopolinización) (Free 1993), comúnmente se siembran dos o más variedades combinadas de manera que una o algunas de ellas proporcionen el polen que

fertilizará a las variedades autoestériles. Las variedades que proporcionan el polen reciben la denominación de "polinizadoras". Cabe destacar que incluso las variedades autofértiles se ven beneficiadas si se incluye en la plantación una variedad polinizadora.

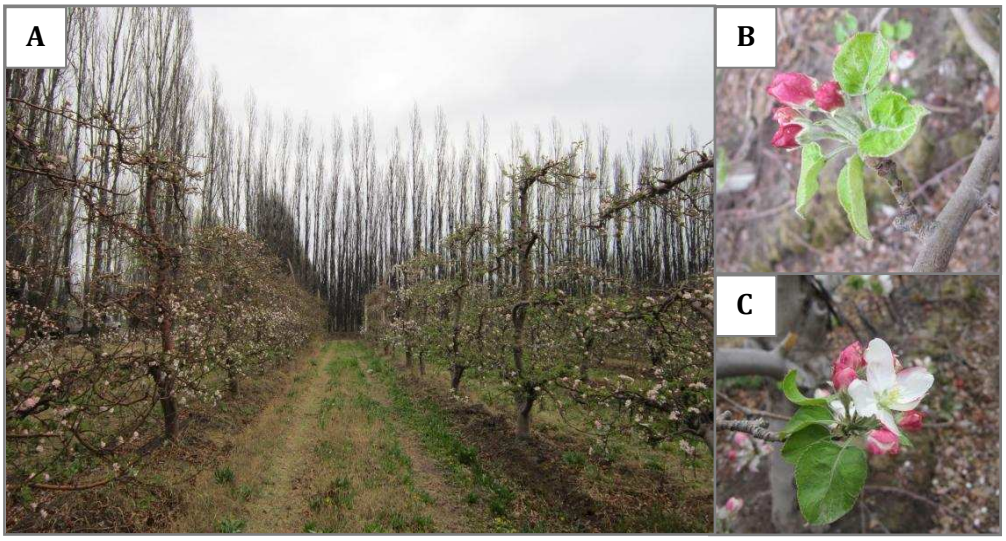


Figura 21. Cultivo de manzana *Malus domestica*. A) Esquema de siembra en una plantación de árboles de manzana en Coronel Belisle, Provincia de Río Negro. B y C yemas florales (cimas).

Para que una variedad sea polinizadora de otra debe presentar una alta tasa de producción y germinación de polen, una floración solapada con la variedad a polinizar y el fruto resultante de la combinación de ambas debe ser de muy buena calidad. En relación a esto, las principales variedades exportadas tienen diferentes grados de autofertilidad. Red Delicious es autoestéril y las variedades Elstar, Gala, Golden Delicious y Granny Smith entre otras son comúnmente utilizadas para su polinización. Granny Smith es parcialmente autoestéril, y puede ser polinizada por

Akane, Gala, Red Delicious y Golden Delicious, entre otras. Finalmente, la variedad Gala es frecuentemente polinizada con Akane, Red Delicious, Elstar, Fuji, Golden Delicious y Granny Smith, entre otras.

Como se detalló en la introducción general, el éxito reproductivo de los cultivos de manzana depende de una adecuada polinización (Free 1993) y para ello se contratan los servicios de polinización de colmenas comerciales de la abeja melífera. Al igual que en los cultivos de girasol, en éstos las colmenas de *Apis mellifera* se disponen en el borde de los lotes en grupos formados por un número variable de colmenas.

Las abejas visitan las flores de manzana en busca del néctar abundante y rico en azúcares que ofrecen sus flores (Mc Gregor 1976; Free 1993; Delaplane and Mayer 2000; Díaz et al. 2013), pero es sabido que en esta especie vegetal la abeja restringe su área de recolección a un árbol o a unos pocos en la misma línea de siembra (Free 1966). Como consecuencia, y para lograr la polinización cruzada, las variedades que se desea cruzar deben plantarse intercaladamente en la misma línea de siembra. Es interesante notar que, al igual que lo observado en los cultivos de girasol, la polinización cruzada de este sistema se realiza por medio de vuelos cruzados entre árboles y también mediante la transferencia de polen entre abejas dentro de la colmena (DeGrandi-Hoffman, Hoopingarner et al. 1984). Habiendo considerado los factores mencionados, es posible obtener una buena producción de

manzanas si al momento de la floración existe un pico de actividad recolectora de la abeja melífera (SENASA 2009; Benitez 2001).

La calidad final de los frutos de cualquier terreno, una vez que los manzanos fueron implantados, depende de numerosos factores que inciden desde antes de la floración, durante ésta y en todo el período de fructificación incluso en la post-cosecha. El conocimiento de estos elementos en detalle permite reducir las potenciales pérdidas de calidad. Muchos de estos factores son de tipo climático: temperatura, precipitaciones, nivel de radiación solar, granizo, vientos y heladas; pero otros como el riego y la fertilización de los suelos se vinculan a las prácticas de manejo. Entre las prácticas ejecutadas directamente sobre los árboles se encuentran: la poda, el raleo de frutos, el control de plagas, enfermedades y malezas y la aplicación de reguladores de crecimiento y fertilizantes florales.

El raleo, tanto manual como químico, de flores y/o pequeños frutos incide directamente sobre el fenómeno de producción alternada (Ryugo, 1986), algo común en manzanos y perales. Este problema denominado “añerismo” o “vecería” suele vincularse a un buen cuaje seguido de un exceso de frutos. De esta manera, un raleo inadecuado puede generar una cosecha abundante en un año y otra muy escasa el siguiente, reiterándose consecutivamente en el tiempo (Monselise y Goldsmith, 1982). Estos ciclos resultan no sólo perjudiciales para la economía de los productores sino que además causan desequilibrios fisiológicos en los árboles afectados dificultando la obtención de cosechas uniformes a través de los años.

Teniendo en cuenta i) la biología social de la abeja melífera (von Frisch 1967; Seeley 1995; Farina et al. 2005), ii) el rol de los olores florales en el contexto de búsqueda y recolección de alimento (Menzel y Erber 1978; Reinhard et al. 2004; Reinhard et al. 2010), iii) la incidencia de los olores del interior de la colmena sobre la actividad recolectora (von Frisch 1923; von Frisch 1943; von Frisch 1967; Wenner et al. 1969; Arenas et al. 2007; Arenas et al. 2008), iv) la relevancia de compuestos clave en mezclas complejas de olores (Pham-Delegue et al. 1986), v) los efectos globales sobre la polinización que podrían generarse a partir de la estimulación de colmenas con alimentos aromatizados, y vi) la relevancia de la abeja sobre los cultivos de *Malus domestica*, en el Grupo de Estudio de Insectos Sociales se desarrolló una formulación sintética que imita el olor de las flores de manzana. Esta formulación, en adelante Formulado de Manzana (FM), no pudo ser discriminada por las abejas del olor natural de las flores de manzana en condicionamientos olfativos realizados bajo el paradigma de REP (Farina, Díaz et al. 2011; Díaz 2013). En ensayos a campo se evidenciaron incrementos en la actividad de las recolectoras de néctar en colmenas tratadas con esta mezcla, específicamente en el pico de floración del cultivo de manzana circundante (Díaz 2013).

En este capítulo se propone describir la incidencia de esta estimulación olfativa sobre el cultivo en términos de la actividad recolectora de la abeja melífera y en el rendimiento de los cultivos de manzana cercanos a las colmenas tratadas. Para ello se comparará la actividad de colmenas tratadas con FM versus tratamientos

control, ubicadas en campos de frutales de manzana. Se aplicarán los tratamientos: i) solución azucarada aromatizada con el formulado sintético (FM), ii) solución azucarada sin aromatizar y se considerará como tercer tratamiento iii) grupos de colmenas sin tratar. El estudio del rendimiento en los lotes polinizados por las colmenas tratadas se realizará comparando el rendimiento en las inmediaciones de las colmenas bajo los diferentes tratamientos, a partir de conteos de frutos en los árboles y analizando la información proporcionada por la empresa propietaria y comercializadora de dichos cultivos (Kleppe S.A). Además se aplicarán correcciones relativas a la densidad de colmenas por hectárea y a la incidencia de añerismo cuando corresponda.

4.1.1 Hipótesis

Las abejas de colmenas estimuladas con la mezcla sintética que simula el olor floral de manzana (FM) tienen una mayor actividad recolectora y sesgada hacia las flores de manzana, lo que generará incrementos en el rendimiento final de los lotes cercanos a las colmenas tratadas.

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Sitio de estudio y animales

Se estudió el efecto de formulaciones sintéticas que imitan el olor floral de manzana, sobre el comportamiento recolector de la abeja melífera en cultivos de manzana *Malus domestica*. Para ello, las colmenas que polinizaban lotes de este cultivo fueron expuestas a diferentes tratamientos (la formulación sintética versus un tratamiento control) y se realizaron mediciones de actividad de las colmenas y del rendimiento de los cultivos en sus cercanías.

Se trabajó en dos campos, uno de ellos en la localidad de General Roca (39° 02′ 00″ S 67° 35′ 00″ O) (**Figura22**A) y el otro en la localidad de Coronel Belisle (39° 11′ 00″ S 65° 59′ 00″ O) (**Figura 22**B); ambos pertenecientes a la empresa Kleppe S.A. y ubicados en la Provincia de Río Negro. En cada uno de ellos, y en la medida de lo posible, se seleccionaron pares de lotes y cuadros (áreas de cultivo de mayor tamaño que abarcan numerosos lotes cada uno) con similares combinaciones de variedades de manzana implantadas y entre los miembros de esos pares se sortearon los tratamientos al azar.

Específicamente en el campo de General Roca se seleccionaron tres lotes: 4, 5 y 8 (**Figura22**A). En la Tabla 4 se detallan las variedades implantadas y el número de filas en cada una.

Tabla 4. Lotes del campo de General Roca incorporados al estudio. Se detallan los clones de Red Delicious implantados y sus variedades polinizadoras, así como el número de filas de cada uno de ellos.

Lote	Red Delicious Clon 1	Red Delicious Clon 2	Variedad Polinizadora	Filas implantadas
4	Chañar 28		Granny Smith	93:00:31
5		Chañar 34	Royal Gala	00:100:33
8	Chañar 28	Chañar 34	Royal Gala	01:73:25

En el campo de Coronel Belisle (**Figura 23**A y B) se seleccionaron 2 pares de cuadros (16 y 17; 30 y 31) y entre 3 y 4 lotes de cada cuadro. En la **Tabla 6** se detalla la composición de los mismos.

Tabla 5. Lotes del campo de Coronel Belisle incorporados al estudio. Se detallan los clones de la variedad Red Delicious implantados y sus polinizadores, así como el número de filas de cada uno de ellos.

Lotes	Red Delicious Clon 1	Red Delicious Clon 2	Variedad Polinizadora	Filas implantadas
16 a, b, c, d	Hi Early		Granny Smith	74:74
17 a, b, c, d	Hi Early		Granny Smith	92:92
30 a, b, c(*), d	Chañar 28		Granny Smith	100:100 aprox
31 a, b, c, d	Chañar 28	Hi Early	Granny Smith	100:100:100 aprox

(*) Debido a una marcada diferencia en la composición de las variedades implantadas, el lote 30c fue excluido del estudio.

Como se observa en las **Tablas 4** y **5** en todos los lotes y en ambos campos predominaron las variedades Red Delicious y Granny Smith. En general la mayor diferencia entre ellos fue el clon de Red Delicious implantado (Chañar 28, Chañar 34 y Hi Early).

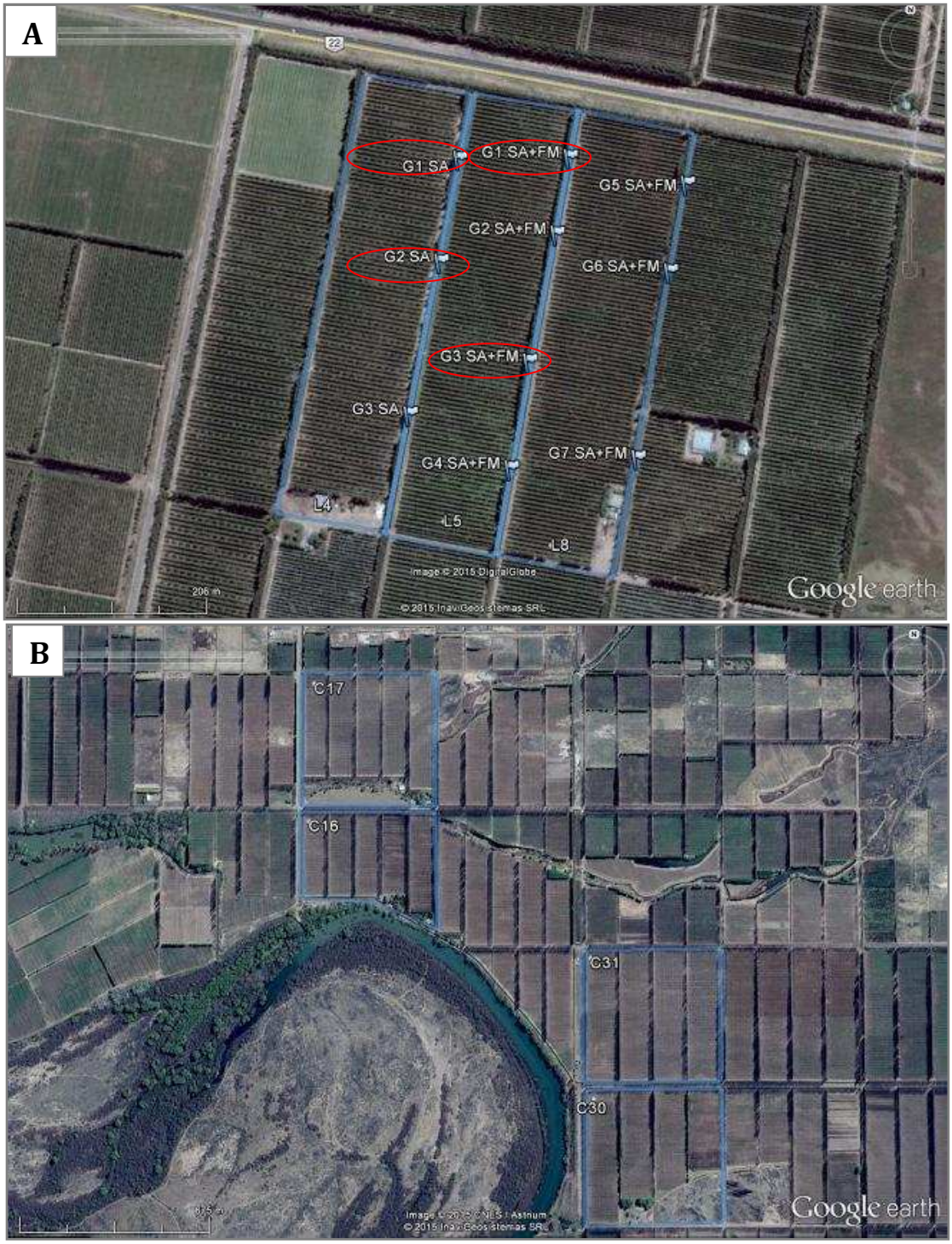


Figura 22. Cultivos de manzana *Malus domestica* administrados por Kleppe S.A. A) Lotes estudiados en un campo cercano a General Roca (39° 02′ 00″ S 67° 35′ 00″ O). B) Ubicación relativa de los cuadros del ENTORNO NORTE y ENTORNO CENTRAL (áreas de cultivo de mayor tamaño que abarcan numerosos lotes cada uno) estudiados en un campo de Coronel Belisle (39° 11′ 00″ S 65° 59′ 00″ O). L= lote. C=Cuadro. Los recuadros indican lotes con árboles de manzana. G= grupos de colmenas. Los mismos se enumeran consecutivamente para cada tratamiento en cada lote. SA: solución azucarada sin aromatizar; SA + FM: solución azucarada aromatizada con FM.

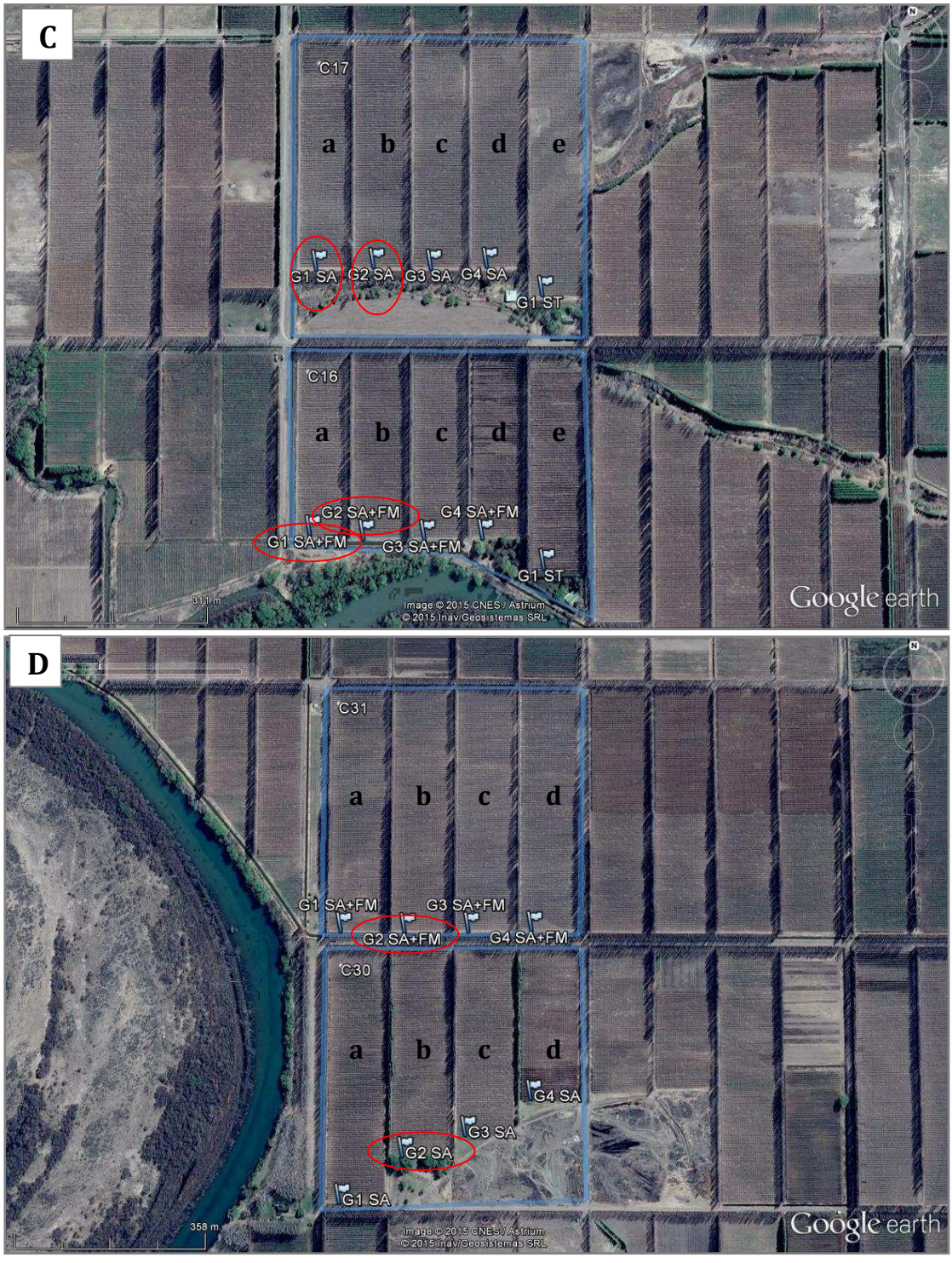


Figura 23. Detalle de los cuadros de manzana *Malus domestica* estudiados en el campo de Coronel Belisle. A) Cuadros 16 y 17 en ENTORNO NORTE; B) Cuadros 30 y 31 en ENTORNO CENTRAL C=Cuadro. Los recuadros indican lotes con árboles de manzana. G= grupos de colmenas. Los mismos se enumeran consecutivamente para cada tratamiento en cada cuadro SA: solución azucarada sin aromatizar; SA + FM: solución azucarada aromatizada con FM. ST: sin tratar.

Las colmenas comerciales, alquiladas por el establecimiento para prestar el servicio de polinización de este cultivo, presentaban las mismas características poblacionales y de reservas ya descriptas (ver Capítulo 2) y se ubicaron en la periferia de los lotes. En el campo de General Roca (**Figura 22**A) las colmenas se agruparon en número variable de entre 10 y 15, mientras que en el campo de Coronel Belisle (**Figura 22**B) todos los grupos tenían 10 colmenas. La ubicación de los grupos de colmenas incorporados al estudio, se indica en la figura del sitio de estudio.

4.2.2. Estimulación olfativa de las colmenas

La mezcla sintética denominada en este trabajo Facilitador Manzana fue conformada teniendo en cuenta el perfil de compuestos volátiles de las flores de manzana reportada previamente (Buchbauer et al. 1993). Los detalles de dicho formulado forman parte de una solicitud de patente (Farina et al. 2011a) aún no publicada. Por motivos inherentes al negocio potencial, en esta tesis se excluye la difusión de información detallada al respecto.

Entre los pares de lotes y cuadros mencionados se sortearon al azar los tratamientos:

1) Solución azucarada 50% p/p sin aromatizar (SA)
2) Solución azucarada 50% p/p aromatizada con el formulado sintético (SA + FM) (50µL/L)

Como se detalló en el capítulo anterior para otras mezclas, éstas también se prepararon con agua tibia y en cada colmena se administraron 500ml de solución (ver modo de administración en el capítulo anterior). Debido a las malas condiciones climáticas y a fin de evitar pillaje entre colmenas (hurto de recursos que puede darse por escasez de alimento), la estimulación en este caso particular se realizó en dos etapas. En cada etapa se vertieron de 250ml de solución por colmena y el intervalo entre ambas fue de un día. Se resumen a continuación los tratamientos aplicados en cada campo y lote.

Campo de General Roca

Lote	Tratamiento	Número de colmenas
4	SA	39
5	SA + FM	54
8	SA + FM	35

Campo de Coronel Belisle:

Lote	Tratamiento	Número de colmenas
16 a, b, c, d	SA + FM	40
17 a, b, c, d	SA	40
30 a, b, c(*), d	SA	40
31 a, b, c, d	SA + FM	40

En este ensayo a gran escala se estimularon en total 288 colmenas (169 con SA + FM y 119 con SA) incluyendo los dos campos. La ubicación de las mismas y los tratamientos administrados se indica en la figura del sitio de estudio (**Figura 22**B y C).

Complementariamente, al momento de aplicar los tratamientos, se registró el avance de floración. En el campo de *General Roca* se eligieron al azar, en cada lote, 16 árboles diferentes, incluyendo representantes de las diferentes variedades disponibles. En cada uno de ellos se seleccionó una rama. Cada rama contaba con un número variable de cimas de flores (**Figura 21**C y D) y se tomó a cada cima como una unidad, considerándola florecida cuando tuviera al menos una flor abierta. El nivel de floración de cada árbol monitoreado se obtuvo por medio del cálculo:

$$\% \text{ floración del árbol} = \frac{\textit{número de cimas florecidas en una rama}}{\textit{número de cimas observadas en la misma rama}}$$

El nivel de floración del lote se calculó promediando la floración de los 16 árboles monitoreados en cada uno de ellos.

En el campo *Coronel Belisle* se monitoreó el avance de la floración de la misma manera, pero considerando 10 árboles en cada lote. Además, en este campo se observó un gran número de árboles sin flores. Para cuantificar esta situación, muy probablemente asociada al fenómeno de añerismo, se hizo un muestreo de la proporción de árboles sin flores cada 20 árboles en cada lote. Se consideró árbol "sin flores" aquellos árboles que tuvieran entre el 80% y 100% de su superficie desprovista de flores, y "árbol con flores disponibles" aquellos que tuvieran más del 20% de su superficie cubierta de flores. En la **Figura 24** se observa a modo de ejemplo, una línea de árboles (la derecha) totalmente carente de flores.

Figura 24. Cultivos de manzana *Malus domestica* administrados por Kleppe S.A. en un campo de Coronel Belisle (39° 11′ 00″ S 65° 59′ 00″ O). La fila de árboles a la derecha de la foto evidencia una notoria ausencia de flores, muy probablemente asociada al fenómeno de añerismo.

4.2.3. Actividad en las colmenas y rendimiento del cultivo lindante

Luego de aplicar los tratamientos, y en cada campo, se evaluó la actividad de algunas de las colmenas tratadas. Se monitoreó tantas colmenas como fue posible considerando el número de observadores, la distancia entre los campos y la ventana temporal de floración. En primer lugar se seleccionaron grupos de colmenas que, entre tratamientos tuvieran entornos homogéneos, y en segundo lugar, dentro de los grupos se descartaron aquellas que mostraron una actividad marcadamente baja (ingreso de menos de cinco abejas en un minuto). A continuación se describe con mayor detalle el criterio de selección de estas colmenas en cada campo.

Campo de General Roca

Entre los lotes 5 y 8, cuyas colmenas habían sido tratadas con SA + FG se seleccionó al azar para esta medición el lote 5. La actividad de las colmenas se comparó entonces entre tratamientos considerando aquellas tratadas con SA en el lote 4 y las que recibieron SA + FG en el lote 5 (**Figura22**A). Ambos lotes tenían la misma heterogeneidad en su entorno de Norte a Sur: sus extremos Norte adyacentes a la Ruta Nacional 22, y un cultivo de pera *Pyrus communis* al sur (**Figura22**A). Para maximizar la homogeneidad de la vegetación en las cercanías de las colmenas, focalizándonos en un entorno predominantemente de flores de manzana, se seleccionó dentro de cada lote un grupo de colmenas ubicado en el centro del lote y otro en el extremo Norte (adyacente a la Ruta Nacional 22). En adelante referiremos cada uno de estos entornos como **ENTORNO CENTRAL** y **ENTORNO NORTE** respectivamente Los grupos de colmenas seleccionados en cada entorno se indican con un círculo rojo en la **Figura22**A. La actividad en las colmenas se estudió contabilizando el número de abejas ingresantes por minuto. Esto se realizó el segundo y cuarto días posteriores a la segunda etapa de estimulación. Además, y durante los mismos días de registro de actividad, se relevó la densidad de abejas en el entorno de cada grupo de colmenas. Para ello, dos observadores contabilizaron simultáneamente las abejas que recolectaban en 20 árboles elegidos al azar. La mitad de los árboles se monitorearon en su cara Norte y la mitad en su cara Sur y dentro de un arquetipo homogéneo de árbol.

En la temporada de cosecha, se estimó el rendimiento mediante el conteo del número frutos por árbol. Para ello se seleccionaron al azar 30 árboles y se contabilizaron las manzanas en una de sus caras. La mitad de los árboles se monitorearon en su cara Norte y la mitad en su cara Sur. Las áreas del cultivo en las que se llevaron a cabo los monitoreos de rendimiento coincidieron con aquellas del relevamiento de densidad de abejas y también se realizaron dentro de un arquetipo homogéneo de árbol. La manzanas de la variedad Red Delicious contabilizadas en lote con colmenas que recibieron SA pertenecían al clon Chañar 28, mientras que las del lote con colmenas que recibieron SA + FM fueron del clon Chañar 34. Finalmente también se estudió el efecto del Facilitador Manzana sobre la cosecha a partir de las planillas de rendimiento informadas por Kleppe S.A..

Adicionalmente se relevaron las colmenas en un radio de 150 metros de los grupos monitoreados para posteriores ponderaciones.

Campo de Coronel Belisle

Entre los pares de cuadros 16 y 17 por un lado y 30 y 31 por el otro (**Figura 23**A y B), se seleccionaron, también con el criterio de homogeneidad de la vegetación circundante, las colmenas de sólo algunos lotes para estudiar su actividad. En el caso de los cuadros 16 y 17 se seleccionaron los lotes a y b y en el caso de los cuadros 30 y 31 sólo el lote "b". Estos grupos se indican con un círculo rojo en la **Figura23**. Específicamente, el segundo y cuarto días posteriores a la segunda etapa de estimulación se contabilizó en la entrada de las colmenas el número de abejas ingresantes por minuto. Además, y los mismos días en que se

registró la actividad, se contabilizó la densidad de abejas en aproximadamente N=10 árboles elegidos al azar en sus cercanías. Al igual que en el otro campo, se alternó entre las caras Norte y Sur de las líneas de siembra y se observaron árboles dentro de un mismo arquetipo.

El efecto del Facilitador Manzana sobre el rendimiento se estudió en este campo exclusivamente a partir de las planillas de rendimiento informadas por Kleppe S.A.

4.3 Resultados

Campo de General Roca

ENTORNO CENTRAL

Al momento de la segunda etapa de aplicación de los tratamientos se estimó un 64% de floración.

Los monitoreos revelaron diferencias no significativas entre tratamientos para los niveles de actividad en la entrada de las colmenas, tanto en la actividad general (número total de abejas ingresantes por minuto, ANOVA de un factor; F= 0,13 gl= 1, p=0,7248), como en relación a las recolectoras de polen (ANOVA de un factor; F=3,01; gl= 1, p= 0,0997. **Figura 25**A).

El relevamiento del número de abejas que recolectaban sobre los árboles en las cercanías de las colmenas tratadas, se realizó dentro de un arquetipo homogéneo

de árbol de una altura de aproximadamente 3 a 3 metros y medio. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de un factor; F=2,8 E-03; gl= 1, p= 0,9578. **Figura 25**B). Cabe señalar que esta medición se realizó en árboles de Red Delicious sin distinguir entre clones. En este caso no se realizaron ponderaciones por el número de colmenas ya que en un radio de 150 metros al sitio donde se hicieron estas mediciones, había 39 colmenas de cada tratamiento.

El número de frutos por árbol fue significativamente mayor en el entorno de las colmenas tratadas con SA + FM (ANOVA de un factor; F=6,11; gl= 1, p= 0,0164) con un 27% más de frutos en los árboles cercanos a las colmenas tratadas con FM (**Figura 25**C).

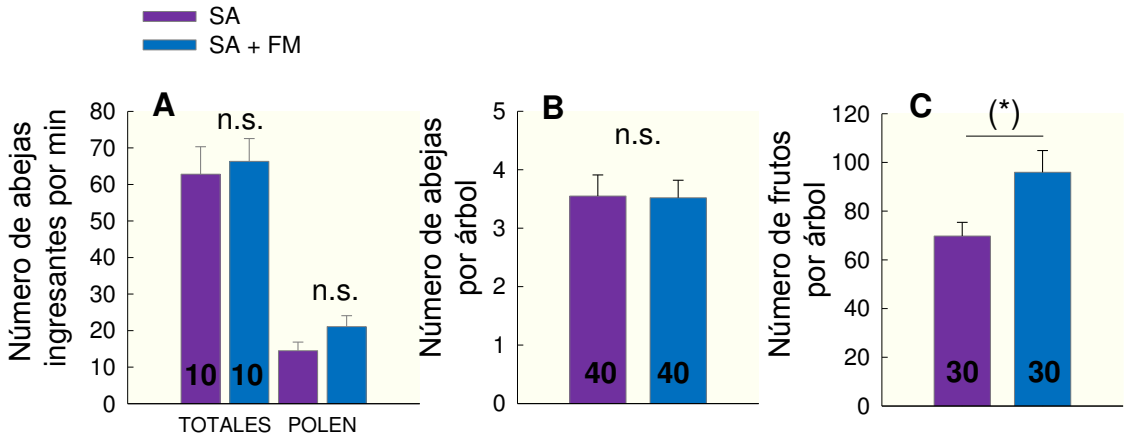


Figura 25. Efecto del Facilitador Manzana sobre la actividad de colmenas ubicadas en un cultivo de manzana *Malus domestica* en General Roca. SA: solución azucarada sin aromatizar, SA + FM: solución azucarada aromatizada con el formulado sintético. Estudio realizado en dos grupos de colmenas ubicados en el ENTORNO CENTRAL (un grupo de cada tratamiento) se contabilizó A) Número de abejas totales y de recolectoras de polen que ingresaban a las colmenas por minuto B) Número de abejas recolectando sobre los árboles cercanos a las colmenas tratadas C) Número de frutos por árbol. Los números las barras indican A) número de colmenas monitoreado; B) y C) número de árboles relevados en cada caso. ANOVA de un factor ; $p < 0,05$, Prueba de Tukey.

ENTORNO NORTE

No se encontraron diferencias significativas entre los dos tratamientos para el nivel de actividad de las colmenas; ni para la actividad general (número total de abejas ingresantes por minuto, ANOVA de un factor; F= 0,36 gl= 1, p= 0,5550) ni en relación a las recolectoras de polen (ANOVA un-factor; F=0,39; gl= 1, p= 0,5420. **Figura 26**A)

Además se contabilizó una cantidad similar de abejas sobre los árboles en las cercanías de las colmenas de cada tratamiento (ANOVA de un-factor; F=0,22; gl= 1, p= 0,6439. **Figura 26**B). También en este entorno se monitorearon árboles de Red Delicious sin distinguir entre clones. Tratándose de un área lindante con el borde del cultivo, y en las cercanías de 15 colmenas de cada tratamiento, tampoco en este caso fue necesario realizar ponderaciones por el número de colmenas.

El número de frutos contabilizado por árbol fue similar en las cercanías de las colmenas de cada tratamiento (ANOVA de un factor; F=1,30; gl= 1, p= 0,2592), pero cabe destacar que la media de frutos en el entorno de las colmenas tratadas con SA + FM fue un 11% mayor que en las inmediaciones de las tratadas con SA (**Figura 26**C).

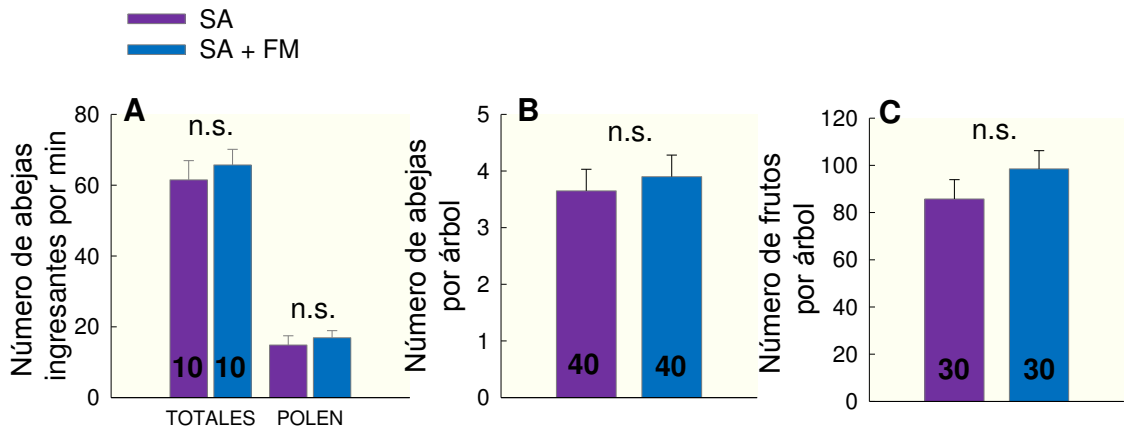


Figura 26 Estudio del efecto del Facilitador Manzana sobre la actividad de colmenas ubicadas en un cultivo de manzana *Malus domestica* en General Roca. SA: solución azucarada sin aromatizar, SA + FM: solución azucarada aromatizada con el formulado sintético. Las mediciones se realizaron en dos grupos de colmenas ubicados en el ENTORNO NORTE (un grupo de cada tratamiento). Se contabilizó A) Número de abejas totales y de recolectoras de polen que ingresaban a las colmenas por minuto B) El número de abejas recolectando en los árboles cercanos a las colmenas tratadas **C**) Número de frutos por árbol. Los números las barras indican A) número de colmenas monitoreado; B) y C) número de árboles relevados en cada caso. ANOVA de un factor; $p<0,05$, Prueba de Tukey.

Rendimiento final (datos suministrados por Kleppe SA)

Se realizó un análisis a partir de la información de rendimiento proporcionada por Kleppe SA. Considerando que la variedad Red Delicious es la de mayor relevancia para los productores y dado que el lote polinizado por las colmenas control (lote 4) tenía implantado el clon Chañar 28, se comparó el rendimiento de éste entre los lotes 4 y 8 (lote 8 con colmenas tratadas con SA + FM). La representación de la variedad Red Delicious, en el lote con las colmenas que recibieron el tratamiento control (lote 4) fue de 2.144 plantas (implantadas en el mismo lote junto con 838 plantas de Granny Smith como polinizadora). En el lote 8, por su parte, había 31 plantas de Chañar 28 (y 2052 plantas del clon Chañar 34) de Red Delicious y 698 plantas de Royal Gala para su polinización. Previo a la comparación del rendimiento, los datos de kg de frutos por hectárea proporcionados por Kleppe S.A. fueron ponderados por el número de colmenas utilizadas

en cada lote (**Tabla 6**). Por falta de réplicas no fue posible realizar análisis estadísticos, pero comparando los valores absolutos de rendimiento, se evidencia un incremento de casi el 35% en el lote tratado con FM (**Tabla 6**).

Tabla 6. Lotes del campo de General Roca incorporados al estudio. Se detallan los tratamientos, el número de colmenas tratados en cada lote, la superficie implantada con la variedad Red Delicious (clon Chañar 28), el rendimiento informado y el rendimiento ponderado por el número de colmenas.

Lote	Tratamiento	#colmenas	Chañar 28		
			Ha	Kg /Ha	Kg/ha/colm
4	SA	39	3,85	22.086	566
8	SA + FM	35	0,04	30.400	868

Campo de Coronel Belisle

El monitoreo de floración que se realizó en diez ramas de cada uno de los 16 lotes estudiados permitió estimar una floración del 63% en promedio al momento de la estimulación de las colmenas (primera etapa de aplicación de los tratamientos), con valores que variaron entre el 47 y el 88% entre lotes. Además, en este campo se observó que en todos los lotes muchos árboles estaban totalmente (o al menos en un 90%) desprovistos de flores. Se detectó que en promedio el 30% de los árboles de estos lotes carecían de flores. Los valores de "añerismo" oscilaron entre el 0 y el 85% entre lotes. Este factor fue tenido en cuenta para correcciones de la densidad de abejas observadas en los árboles y para ponderar los datos de rendimiento proporcionados por Klepp S.A.. Se consideró que la ausencia de flores en numerosos árboles sesgaría los conteos llevando a una sobreestimación de densidad y subestimación de rendimiento a mayores grados de añerismo.

Se presentan a continuación, y separadamente, los resultados obtenidos del monitoreo de actividad de las colmenas presentes en los cuadros 16 y 17 (lotes a y b); y los cuadros 30 y 31 (lote b). En adelante, y considerando la ubicación de los pares de cuadros mencionados en el campo de Coronel Belisle, referiremos a la primera comparación como **ENTORNO NORTE** y a la segunda como **ENTORNO CENTRAL**. Los grupos de colmenas monitoreados en cada lote se indican con un círculo rojo en la **Figura 23**C.

ENTORNO NORTE

No se hallaron diferencias significativas entre tratamientos en la actividad general de las colmenas (ANOVA de un factor, F= 2,47; gl= 1, p= 0,1259), ni tampoco en relación a las recolectoras de polen (ANOVA de un factor F= 3,45; gl= 1, p= 0,0725. **Figura 27**A). La densidad de abejas observadas sobre los árboles mostró diferencias no significativas entre tratamientos (ANOVA de un factor, F= 0,15 gl= 1, p= 0,6944), aun considerando el añerismo de cada lote (ANOVA de un factor, F= 2,04; gl= 1, p= 0,1552; **Figura 27**B). No fue necesario realizar correcciones por el número de colmenas porque en todos los lotes había diez colmenas.

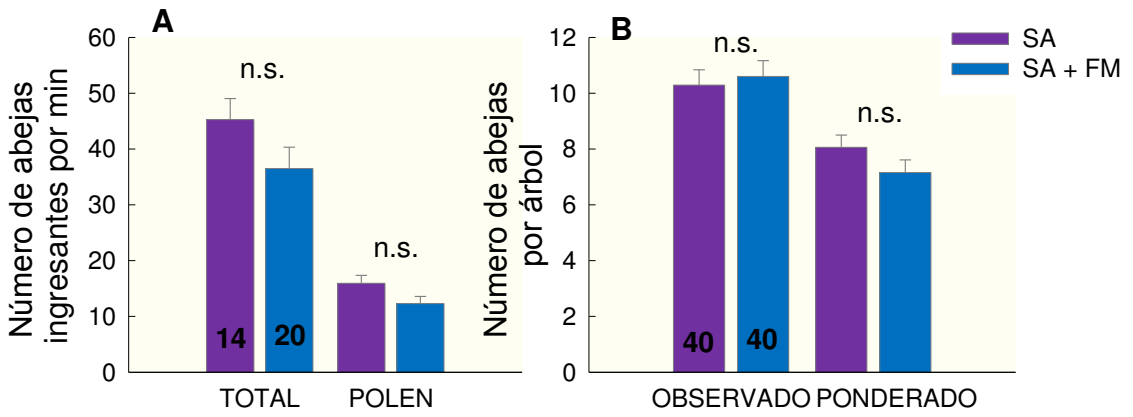


Figura 27 Estudio del efecto del Facilitador Manzana sobre la actividad de las colmenas en un campo de manzana *Malus domestica* en Coronel Belisle. SA: solución azucarada sin aromatizar, SA + FM: solución azucarada aromatizada con el formulado sintético. Se contabilizó A) El número total de abejas y de recolectoras de polen que por minuto retornaban a las colmenas y B) El número de abejas recolectando en los árboles cercanos a las colmenas tratadas (densidad observada y corregida por el grado de añerismo de cada lote) durante dos días en dos lotes por tratamiento. Todas las colmenas de cada lote recibieron el mismo tratamiento. El añerismo expresado como proporción de árboles sin flores en cada lote tratado resultó ser de 0.55 y 0.35 en los dos lotes del cuadro con SA y de 0,15 y 0,50 en los dos lotes del cuadro tratado con SA + FM; Los números en las barras indican A) el número de colmenas y B) el número de árboles monitoreados. ANOVA de un factor; $p<0,05$ Prueba de Tukey.

ENTORNO CENTRAL

No se hallaron diferencias significativas entre tratamientos para la actividad general de las colmenas, pero esta variable fue un 41% mayor en las colmenas tratadas con SA + FM (ANOVA de un factor, F= 2,90; gl= 1, p= 0,1082; datos transformados mediante la función $\log_{10}$). La actividad de las recolectoras de polen, por su parte, mostró diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de un factor; F= 5,89; gl= 1, p= 0,0274. **Figura 28**A). La densidad de abejas observada sobre los árboles presentó diferencias no significativas entre tratamientos (ANOVA de un factor, F= 0,01 gl= 1, p= 0,9069), pero al corregir los datos por el nivel de añerismo de los lotes esas diferencias se tornaron significativas (ANOVA de un

factor, F= 22,26; gl= 1, p<0,0001. **Figura 28B**). En este caso tampoco fue necesario realizar correcciones por el número de colmenas porque en todos los lotes había diez colmenas.

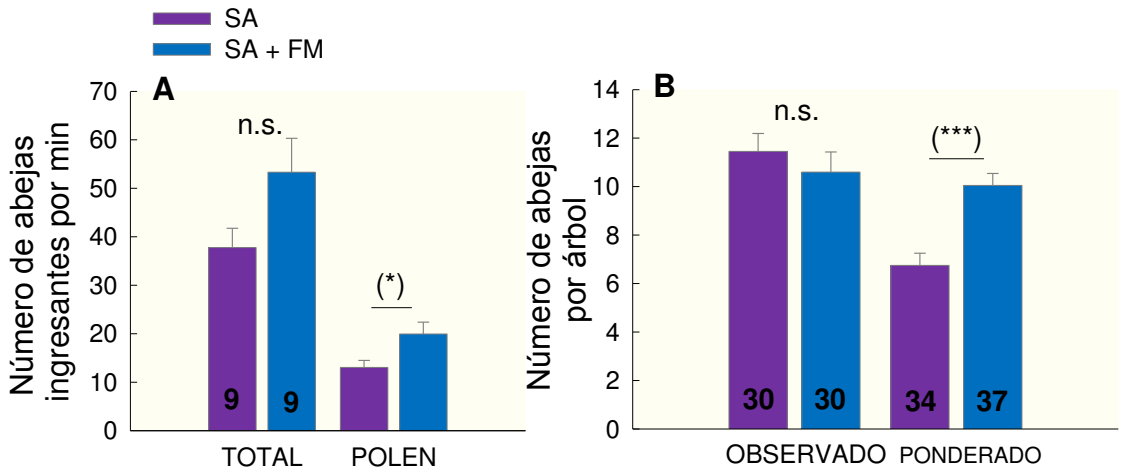


Figura 28 Estudio del efecto del Facilitador Manzana sobre la actividad de las colmenas en un campo de manzana *Malus domestica* en Coronel Belisle. SA: solución azucarada sin aromatizar, SA + FM: solución azucarada aromatizada con el formulado sintético. Se contabilizó **A)** El número total de abejas y de recolectoras de polen que por minuto retornaban a las colmenas y **B)** El número de abejas recolectando en los árboles cercanos a las colmenas tratadas (densidad observada y ponderada por el grado de añerismo de cada lote respectivamente) durante dos días en dos lotes por tratamiento. Todas las colmenas de cada lote recibieron el mismo tratamiento. El añerismo expresado como proporción de árboles sin flores en cada lote tratado resultó de 0,55en lote con SA y de 0,330 en lote con SA + FM. Los números en las barras indican A) número de colmenas y B) número de árboles monitoreados. ANOVA de un factor; p<0,05 Prueba de Tukey,.

Rendimiento final (datos suministrados por Kleppe SA)

Se compararon los rendimientos obtenidos entre tratamientos para dos clones de la Variedad Red Delicious: Chañar 28 y Hi Early. Las tablas 7 y 8 mostradas a continuación resumen la información utilizada para estimar el rendimiento de cada clon bajo los diferentes tratamientos y en cada entorno.

ENTORNO NORTE

El clon de Red Delicious de este entorno es Hi Early. La **Tabla 7** muestra su rendimiento por planta y ese rendimiento corregido por el nivel de añerismo en cada lote. No se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos para el clon Hi Early en el ENTORNO NORTE (ANOVA de un factor, F= 0,67; gl= 1, p= 0,4436; **Figura 31**).

Tabla 7. Lotes del campo de Coronel Belisle ENTORNO NORTE incorporados al estudio. Se detallan el lote, el rendimiento de la variedad Red Delicious (clon Hi Early), un factor de corrección (1-Añerismo) y el rendimiento corregido por el factor de corrección. Todos los lotes contaban con 10 colmenas.

Variedades número de plantas (*) tratamiento	Lote	Kg Hi Early / planta por lote	1 - Añerismo	Rendimiento corregido
Granny Smith: Hi Early 171:1291 SA + FM	16 a	51,27	0,8	41,02
	16 b	33,81	0,85	28,74
	16 c	38,64	0,5	19,32
	16 c	24,52	0,65	15,94
Granny Smith: Hi Early 203:1603 SA	17 a	77,75	0,95	73,86
	17 b	42,77	0,95	40,63
	17 c	34,16	0,65	22,21
	17 c	23,27	0,65	15,13

(*) Se indica el número de plantas promedio considerando todos los lotes

ENTORNO CENTRAL

El clon de Red Delicious predominante en este entorno es Chañar 28. En la **Tabla 8** se muestra el rendimiento por planta y ese rendimiento corregido por el nivel de añerismo en cada lote.

Tabla 8. Lotes del campo de Coronel Belisle ENTORNO CENTRAL incorporados al estudio. Se detallan el lote, el rendimiento de la variedad Red Delicious (clon Chañar 28), un factor de corrección (1-Añerismo) y el rendimiento corregido por el factor de corrección. Todos los lotes contaban con 10 colmenas.

Variedades número de plantas (*) tratamiento	Lote	Kg Chañar 28 / planta por lote	1 - Añerismo	Rendimiento corregido
Granny Smith: Chañar 28 259:2198 SA	30 a	17,19	0,15	2,58
	30 b	37,964	0,45	17,08
	30 d	40,76	0,6	24,46
Granny Smith: Chañar 28: Hi Early 344:1358:1427 FM + SA	31 a	70,28	1	70,28
	31 b	50,45	0,7	35,32
	31 c	81,12	0,85	68,95
	31 d	68,02	0,7	47,61

(*) Se indica el número de plantas promedio considerando todos los lotes

Sí se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos para el clon Chañar 28 en el ENTORNO CENTRAL (ANOVA de un factor, F= 12,8; gl= 1, p= 0,0159**;** **Figura 31**). El rendimiento de Chañar 28 fue 277% superior en el lotes con colmenas que recibieron SA + FM. Cabe destacar que también se comparó, en el ENTORNO CENTRAL, el rendimiento promedio de Red Delicious (considerando ambos clones: Chañar 28 y Hi Early) correspondiente al cuadro 31 con el rendimiento de de Red Delicious (Chañar 28) del cuadro 30 y también se obtuvo un mayor rendimiento en el lote con colmenas que recibieron SA + FM (ANOVA de un factor, F= 11,81; gl= 1, p= 0,0185).

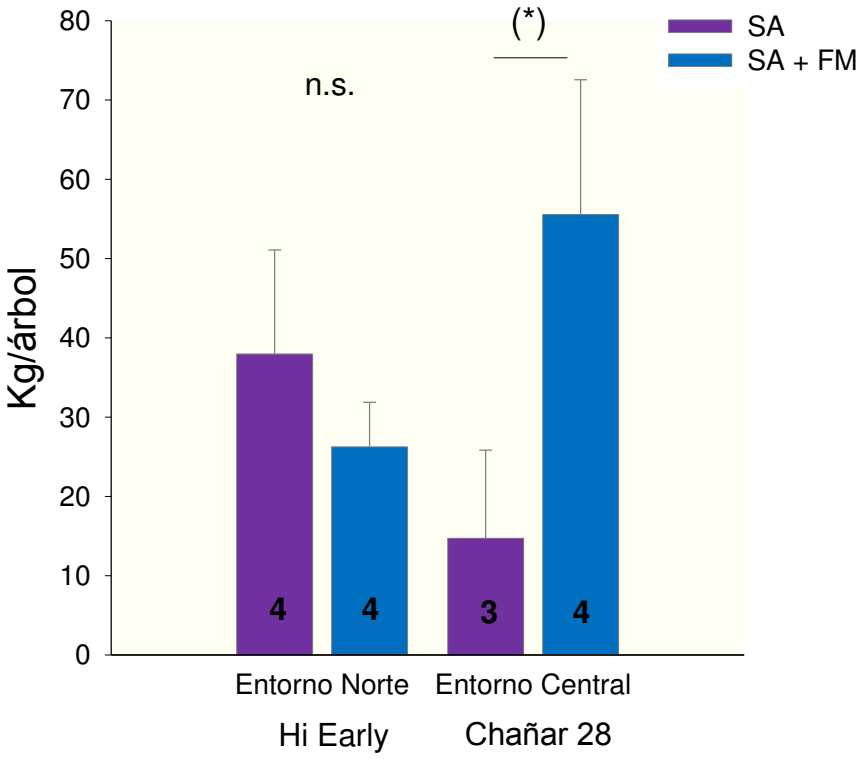


Figura 29. Estudio del efecto del Facilitador Manzana sobre el rendimiento de la variedad Red Delicious en un campo de manzana *Malus domestica* en Coronel Belisle. SA: solución azucarada sin aromatizar, SA + FM: solución azucarada aromatizada con FM. Datos de rendimiento del clon Hi Early en el ENTORNO NORTE y del clon Chañar 28 en el ENTORNO CENTRAL. Todas las colmenas de cada lote recibieron el mismo tratamiento. Los números en las barras indican el número de lotes considerados. ANOVA de un factor., $p<0,05$ Prueba de Tukey

4.4 Discusión y conclusiones

En este capítulo se muestra cómo la aplicación de Facilitador Manzana en colmenas que polinizan cultivos de manzana *Malus domestica* incrementa el rendimiento de los cultivos específicamente para el clon Chañar 28 de la variedad Red Delicious. En este estudio se hicieron comparaciones de los efectos de la aplicación de diferentes tratamientos (FM y control) en colmenas que polinizaban

lotes con árboles de manzana homogéneos respecto a la combinación de las variedades implantadas en ellos. Las evaluaciones incluyeron monitoreos de actividad de las colmenas, tanto en la entrada de las mismas como en relación a la densidad de abejas en el cultivo cercano a ellas. La estimación de los efectos de estas estimulaciones en el rendimiento implicó conteos de frutos en los árboles y el análisis de planillas de rendimiento proporcionadas por la empresa propietaria de los lotes (Kleppe S.A.). Este estudio, al igual que el correspondiente al capítulo anterior, se realizó en una escala nunca evaluada anteriormente en ensayos experimentales con colmenas: se estimularon 288 colmenas y se evaluó el rendimiento de cultivos de manzana en una extensión de aproximadamente 90 hectáreas en total.

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, en estudios previos las abejas no pudieron discriminar entre el Facilitador Manzana y el olor de la flor natural de manzana en ensayos de laboratorio bajo el paradigma de REP (Farina et al. 2011; Díaz 2013). Esto sugiere que la mezcla FM representa los olores clave usados por las abejas para la identificación de esta fragancia floral, y que su presentación asociada a recompensa podría incrementar su similitud con el olor floral en términos de relevancia biológica (de la misma manera que se detalló en el capítulo anterior para la mezcla FG). Ensayos preliminares a campo, previos a esta Tesis, demostraron además que las colmenas tratadas con FM tienen mayores niveles de actividad que las colmenas control varios días después de ser estimuladas

y cuando la floración de los árboles de manzana circundantes es cercana al 100% (Díaz 2013).

Las evaluaciones realizadas en este capítulo mostraron que la actividad en las colmenas tratas con FM fue ligeramente superior a las colmenas control en el campo de General Roca (tanto en el ENTORNO CENTRAL como en el ENTORNO NORTE se registraron incrementos del 5,6% y 6,8%; **Figura 25**A y **Figura 26**A respectivamente). El número de abejas por árbol en este campo no presentó diferencias entre tratamientos (**Figura 25**B y **Figura 26**B) pero sí se hallaron diferencias en los conteos del número de frutos por árbol en el entorno de colmenas del centro del lote (**Figura 26**C). El análisis de las planillas de rendimiento de la variedad Chañar 28 mostró incrementos del 35% en esta variable en el lote con colmenas tratadas con FM Tabla 6). Es interesante notar que en este estudio no se detectaron diferencias significativas en la actividad de las colmenas a diferencia de lo observado en los ensayos preliminares a campo (Díaz 2013). Sin embargo, los incrementos obtenidos en el rendimiento no dejan lugar a dudas que la actividad de las colmenas que recibieron SA + FM fue más efectiva.

En el campo de la localidad de Coronel Belisle no se obtuvieron diferencias significativas en la actividad general de las colmenas en ninguno de los dos entornos donde se realizaron estas mediciones (**Figura 29**A y **Figura 30**A), pero sí en relación a las recolectoras de polen en el ENTORNO CENTRAL (**Figura 30**A). En este caso el número de recolectoras de polen que ingresaron a las colmenas tratadas con

FM fue un 52% mayor. La densidad de abejas en los árboles cercanos a las colmenas tratadas mostró diferencias no significativas entre tratamientos en el ENTORNO NORTE (**Figura 29**B), pero significativas en el ENTORNO CENTRAL (**Figura 30)**. En este último caso, se evidenció un mayor número de abejas en los árboles cercanos a las colmenas tratadas con FM cuando se ponderó la densidad de abejas sobre los árboles por el grado de añerismo (**Figura 30**B). El análisis de los datos proporcionados por Kleppe S.A. mostró un rendimiento triplicado del clon Chañar 28 en el ENTORNO CENTRAL bajo el tratamiento SA + FM (**Figura 31**).

Es interesante notar que, a diferencia de lo observado en el sistema de girasol - semilla (Capítulo 3), prácticamente no se detectaron diferencias entre tratamientos para la densidad de abejas sobre el cultivo. Sin embargo, los incrementos en el rendimiento de los lotes tratados con SA + FM evidencian una mayor actividad recolectora de las abejas sobre el cultivo. Es probable que estas discrepancias en los resultados se relacionen con la intensidad de muestreo de estos insectos sobre el cultivo. A diferencia del sistema de girasol, donde la altura del cultivo permite una cómoda visualización, los árboles de manzana superan los 2 metros de altura. Más aún, la floración en el dosel es más temprana y frecuentemente la densidad de abejas en esa zona es mayor (observación personal). Como consecuencia, mientras que en el sistema de girasol se pueden distinguir abejas incluso a varios metros del observador, el registro de la densidad de abejas sobre los árboles frutales se dificulta. Estudios anteriores con discrepancias similares (la actividad de los insectos polinizadores no coincide con lo recolectado por el mismo insecto; Dorado

2011), sugieren que esto puede corregirse con una mayor intensidad de muestreo. En resumen, los resultados indican que la aplicación de este estimulante incrementa el rendimiento de los cultivos como consecuencia de una actividad recolectora más eficiente de las abejas melíferas sobre el mismo. Estos resultados son consistentes con las observaciones realizadas previamente a esta Tesis.

Es importante señalar la complejidad del sistema en términos de las variedades implantadas: las diferentes combinaciones de clones de Red Delicious (Chañar 28, Chañar 34 y Hi Early) y de variedades polinizadoras (Granny Smith y Royal Gala); las variaciones en la densidad de siembra entre lotes, la presencia de numerosos árboles desprovistos de flores (añerismo), a lo que puede sumarse el efecto de elementos del paisaje como el río ubicado al sur de los cuadros 16 tratado con FM. Tomando en cuenta todos estos factores y los resultados obtenidos, es posible que el añerismo en el campo de Coronel Belisle estuviera subestimado y que los lotes con elevado número de árboles sin flor tuvieran además un menor rendimiento por árbol. Otro factor importante que afectó los registros fueron las condiciones climáticas: las bajas temperaturas predominantes antes del inicio de la floración retrasaron su inicio y acortaron su ventana temporal. Aún así, las tendencias muestran un incremento del rendimiento en los lotes con colmenas tratadas con SA + FM.

Se propone la incorporación de este desarrollo como una técnica apropiada para incrementar el rendimiento de cultivos de manzana mediante el sesgo de las

preferencias recolectoras de abejas melíferas utilizadas en los Servicios de Polinización trashumantes.

5. Evaluación del efecto de un formulado sintético específico sobre el comportamiento recolector de la abeja melífera en cultivos de pera

5.1 Introducción

Como se detalló en el capítulo anterior, las conductas de consumo marcadas por los países desarrollados influyen en los procesos de producción y comercialización de frutas, traduciéndose en demandas de garantías sobre la ausencia de productos químicos y agentes patógenos en estos productos. Más aún, se espera que los mecanismos de producción implementados aseguren la salud de quienes son parte del proceso productivo e impliquen un bajo impacto en el ambiente. En este contexto internacional, las empresas argentinas productoras y exportadoras de manzanas y peras en fresco tuvieron que enfrentar una profunda transformación.

Según el Ministerio de Agricultura y Ganadería de la Nación, el 65% del aporte argentino a la producción de frutas de pepita de América del Sur está constituido por la exportación de peras. La producción nacional promedio de esta fruta correspondiente a los tres últimos años (2012 a 2014) fue de aproximadamente 900 mil toneladas (Minagri 2014) y las 19.960 hectáreas destinadas a la misma se centralizaron, al igual que en el marco de la producción de manzana, en las provincias de Río Negro, Neuquén y Mendoza.

Las principales variedades de pera cultivadas en el país son Williams (41,1%), Packam's (26,6%) y D'Anjou (12,5%) (**Figura 31**), entre otras. Así como ocurre con las variedades de manzana, las variedades de pera también presentan diferentes grados de auto-esterilidad y por lo tanto habitualmente se siembran dos o más de ellas combinadas. En relación al fruto, si bien todas presentan frutos de forma piriforme, el color a la madurez, el calibre y el grado de acidez varían entre ellas.

Figura 30. Principales variedades de Pera de exportación

La variedad ***Williams*** representa el 35% de la producción de peras del país. Es auto-incompatible y tiende fuertemente a la partenocarpia. Puede ser polinizada por distintas variedades como Beurré Bosc, Beurré Giffard, Clapp´s Favourite entre otras. Su fruto posee una cintura bien definida, un peso de entre 230 y 235 gramos, 105 mm de altura y 65 mm de calibre. Su epidermis es fina y delicada, de color verde claro que se torna amarillento a la madurez (a veces con un tinte rosado en la cara

expuesta al sol), y posee numerosas lenticelas (estructuras pequeñas y circulares que permiten el intercambio de oxígeno). Su pulpa es blanco cremosa, de textura fina, típicamente aromática y muy jugosa. La variedad ***Packam´s*** ocupa el segundo lugar en la producción de peras. Es auto-incompatible y puede ser polinizada por Beurre D´Anjou y Abat Fetel. Su fruto es de base ancha y corta, tiene un peso de entre 270 y 280 gramos, una altura de 95 mm y un calibre de 75 mm. Su epidermis es de color verde claro tornándose amarilla y con numerosas lenticelas oscuras a la madurez. Su superficie externa está cubierta de numerosas protuberancias. La pulpa de esta variedad es blanco – cremosa, consistente, de textura fina, dulce y ligeramente acidulada. En cuanto a la variedad ***D´Anjou***, si bien es auto-fértil, es conveniente que sea polinizada por las variedades Packam´s, Conference u otras Beurré. El fruto es corto, globoso con base ancha y con una altura de 85 mm y 80 mm de calibre; su peso oscila entre 270 y 280 gramos. La epidermis es fina y delicada, de color verde claro que no cambia de color a la madurez y presenta numerosas lenticelas bien visibles. La pulpa es blanco – cremosa de textura mantecosa y ligeramente granulada.

El árbol de pera *Pyrus communis* (**Figura 31**A) puede alcanzar los 20 metros de altura, su vida media es de 65 años y se cultiva en marcos de plantación similares a los de los cultivos de manzana (ver capítulo 4). Sus flores, de pétalos de color blanco o blanco – rosado, presentan largos cabillos y se agrupan en estructuras que reciben el nombre de corimbos umbeliformes (**Figura 31**B).

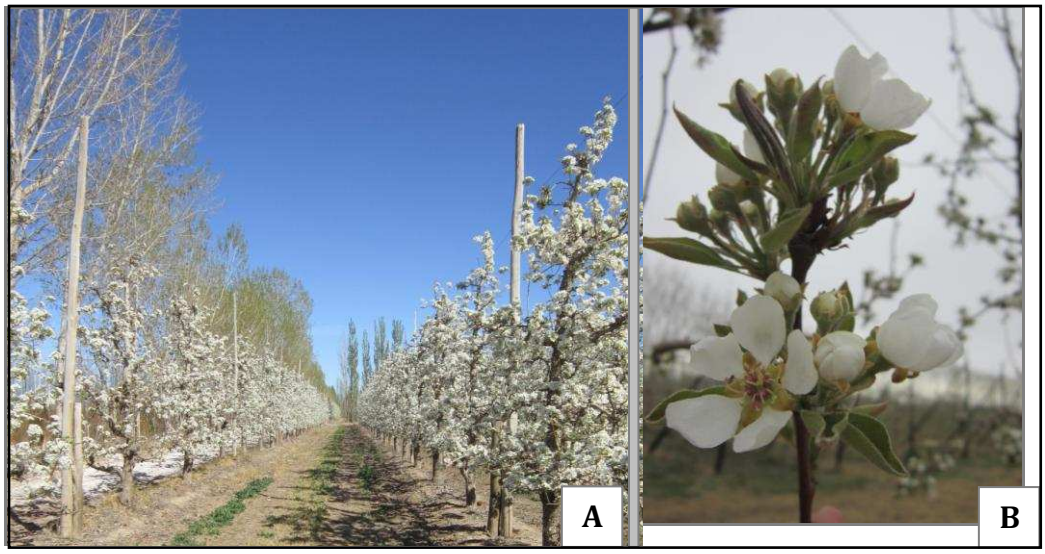


Figura 31. Cultivo de pera *Pyrus communis*. A) Esquema de siembra en una plantación de árboles de pera en General Roca, Provincia de Río Negro, Argentina. B) yemas florales (corimbo umbeliforme).

Las abejas no son particularmente atraídas a las flores de pera debido a un escaso volumen de néctar que además es pobre en azúcares (Maurizio 1969; Mc Gregor 1976; Free 1993; Díaz 2013). Sin embargo, las abejas recolectan polen en estos cultivos (Díaz 2013; Free 1993). Como se detalló en la introducción general, el éxito reproductivo de los cultivos de pera depende de una adecuada polinización (Díaz 2013; Free 1993). De la misma manera que ocurre en los sistemas productivos estudiados previamente, en estos cultivos también se alquilan colmenas trashumantes que se disponen en grupos alrededor de los lotes.

En la introducción general de esta Tesis se describió detalladamente cómo la organización social de la abeja melífera y sus habilidades cognitivas hacen posible que estos insectos respondan eficientemente a las variaciones en los recursos

disponibles. En particular, la oferta de polen varía con las condiciones ambientales y según qué especies vegetales florecen en cada período, incluso estas variaciones a veces se presentan de manera abrupta. Por ejemplo, las colmenas trashumantes que llegan a cultivos de pera se enfrentan a una repentina oferta de abundante polen. Sin embargo, independientemente de cómo fluctúe la oferta exterior, la demanda de polen en el interior de la colmena (la cantidad de polen consumido) varía gradualmente a medida que crece la población de un nido (Winston 1987). Como consecuencia, y para asegurar una adecuada nutrición a los miembros de la colmena en un período de escasez de polen, las abejas acopian una modesta cantidad de este recurso dentro del nido (un kilo aproximadamente). Estas reservas son suficientes para resolver la discrepancia entre la disponibilidad externa y la demanda interna y como resultado de ello la tasa de recolección de polen se ajusta a la cantidad almacenada (Seeley 1995).

Estudios previos demostraron que la tasa de recolección de polen de una colmena es inversamente proporcional al polen almacenado dentro del nido y que es posible generar cambios en el comportamiento recolector modificando las reservas (Fewell y Winston 1992). Sin embargo, se desconoce cómo se verían afectados la recolección de polen y el crecimiento poblacional si se lograra artificialmente estimular la primera provocando un incremento del polen almacenado por encima de los niveles en que normalmente se encuentran estas reservas.

Teniendo en cuenta los punto i) a v) detallados en la introducción del capítulo anterior, y la relevancia de la abeja en los cultivos de *Pyrus communis*, en el Grupo de Estudio de Insectos Sociales se desarrolló una formulación sintética que imita el olor de las flores de pera. Esta formulación, en adelante Formulado de Pera (FP), no pudo ser discriminada por las abejas del olor natural de las flores de pera en condicionamientos olfativos realizados en el laboratorio utilizando el paradigma de REP (Díaz 2013).

En este capítulo se propone describir la incidencia de esta estimulación olfativa sobre las colmenas abejas melíferas en términos de la actividad recolectora y el desarrollo del área de cría. Además se analizarán sus efectos en el cultivo comparando el rendimiento de cultivos de pera polinizados por colmenas tratadas con FP y colmenas control. Se aplicarán los tratamientos: i) solución azucarada aromatizada con el formulado sintético (FP), ii) solución azucarada sin aromatizar (SA). El estudio del rendimiento en los lotes polinizados por las colmenas incluidas en este estudio se realizó a partir de conteos de frutos en los árboles. Además, se aplicaron correcciones relativas a la densidad de colmenas por hectárea.

5.1.1. Hipótesis

Las abejas de colmenas estimuladas con la mezcla sintética que simula el olor floral de pera (FP) tienen una mayor actividad recolectora y sesgada hacia las flores de pera. Este sesgo recolector se verá reflejado en una mayor recolección de polen y de néctar diluido en las colmenas tratadas con FP, aumentando la población de las colmenas con FP y el rendimiento del cultivo en sus cercanías.

5.2 Materiales y Métodos

5.2.1. Evaluación del efecto de un formulado sintético específico sobre la actividad recolectora y el desarrollo del área de cría de la abeja melífera en cultivos de pera

5.2.1.1 Sitio de estudio y animales

Se estudió el efecto de formulaciones sintéticas que imitan el olor floral de pera, sobre el comportamiento recolector de la abeja *Apis mellifera* en un cultivo de pera *Pyrus communis*, de la localidad de Otto Krause, Rio Negro (39°06′22″S 66°59′46″O. **Figura 32**) durante la temporada de floración de 2012 (Septiembre – Octubre 2012). Para esto se seleccionaron al azar 14 colmenas que polinizaban este cultivo, se expusieron a diferentes tratamientos e inmediatamente después se midieron distintos parámetros de actividad. También se monitoreó el desarrollo de

sus áreas de cría. El diseño de plantación de los lotes circundantes a las colmenas estudiadas (lotes 1 a 6 de la **Figura 32**) consistió en hileras de las variedades Williams y Packam´s intercaladas en una proporción de 2:4 y 3:4 según el lote. Por ejemplo, 2:4 indica que cada 2 hileras sembradas con Williams se intercalan 4 hileras sembradas con Packam´s.

Las colmenas, utilizadas por el establecimiento para asegurar el servicio de polinización de este cultivo, eran de tipo Langstroth y presentaban características poblacionales y de reservas de alimento similares a las descriptas anteriormente (Capítulo 2). Las 14 colmenas incorporadas al estudio se seleccionaron al azar de entre 32 colmenas que estaban distribuidas en tres grupos con 10 y 11 colmenas cada uno. La ubicación de dichos grupos se indica en la figura del sitio de estudio (**Figura 32**).

5.2.1.2. Floración del cultivo

En los lotes circundantes a las colmenas tratadas se eligieron al azar 176 árboles diferentes incluyendo representantes de las dos variedades disponibles. En cada uno de ellos se seleccionó una rama a la que se sujetó, con alambre forrado, un rectángulo de hule de 10cm^2 escrito con marcador permanente para su identificación. Cada rama contaba con un número variable de corimbos de flores de pera. En total se marcaron 107 y 69 ramas de las variedades Williams y Packam´s respectivamente. El avance de floración se monitoreó, en esas ramas, cada 2 a 3 días

durante todo el estudio. Se consideró corimbo florecido al que tuviera al menos una flor abierta.

Figura 32. Cultivo de pera *Pyrus communis* en la localidad de de Otto Krause (39° 06′ 22″ S 66° 59′ 46″ O) Provincia de Rio Negro, Argentina. L= Lote. Los recuadros indican lotes con árboles de pera. G= grupos de colmenas. Los tres grupos suman 32 colmenas y entre ellos se seleccionaron al azar 14.

El nivel de floración de cada árbol monitoreado se obtuvo por medio del cálculo:

$$\%\ \text{de floración del árbol} = \frac{\textbf{número de corimbos florecidos en una rama}}{\textbf{número de corimbos observados en la misma rama}}$$

El nivel de floración del entorno a las colmenas tratadas se calculó, cada día de relevamiento y separadamente para cada variedad, promediando el porcentaje de floración de todos los árboles marcados.

5.2.1.3. Estimulación olfativa de las colmenas

El formulado sintético denominado en este trabajo como Facilitador Pera, fue conformado teniendo en cuenta el perfil de compuestos volátiles de las flores de pera reportado previamente (Baraldi et al 1999). Los detalles de dicho formulado son parte de una solicitud de patente. Por motivos inherentes al negocio potencial, en esta tesis se excluye la difusión de información detallada al respecto.

Entre las 14 colmenas elegidas al azar se sortearon los tratamientos:

1) Solución azucarada 50% p/p sin aromatizar (SA)
2) Solución azucarada 50% p/p aromatizada con Facilitador Pera (FP) (50µL/L)

En todos los casos la solución azucarada se preparó y aplicó como se puntualizó anteriormente. Cada colmena recibió 500 ml de solución en un único evento de estimulación. En total cada tratamiento se aplicó a 7 colmenas.

5.2.1.4. Actividad en las colmenas

Como indicador general de la actividad de las colmenas se registró el número de abejas ingresantes por minuto. Esto se repitió por 9 días y entre las 12:00 y las 14:00hs diariamente durante todo el estudio.

Además, se analizó la actividad de las recolectoras de néctar por medio del estudio de la carga del buche de las abejas que retornaban a las colmenas. Para ello se capturaron con tubos plásticos, y en la entrada de las colmenas, individuos que carecieran de cargas de polen en sus patas posteriores. Las abejas atrapadas se adormecieron individualmente en frío colocando los tubos de captura herméticamente cerrados entre cubos de hielo hasta que los individuos estuvieran inmóviles. Una vez conseguido esto, las abejas se tomaron de a una y se presionó suavemente su tórax con una pinza para estimular el regurgitado del contenido del buche. Esto se realizó directamente sobre el vidrio del prisma de un refractómetro (A. Kruss Optrinic GmbH, ± 1% sacarosa p/p). En el caso que las abejas regurgitaran espontáneamente el contenido del buche en los tubos, lo cual se observó en numerosos individuos (aproximadamente un 10%), éste se recuperó con un capilar y se vació sobre el vidrio del refractómetro. En total se capturaron 330 individuos en 6 días.

Teniendo en cuenta el menor valor de concentración de néctar reportado en bibliografía para *Pyrus communis* (2%, Free 1993) y el error de medición del refractómetro utilizado, se consideraron “recolectoras de néctar” las abejas cuya carga de buche tuviera una concentración mayor o igual al 1% sin límite superior de

concentración. Para describir la actividad de recolección de néctar específicamente sobre las flores de pera se estudió la recolección de "néctar diluido" tomando 1% como valor mínimo y 10% como valor máximo. Se eligió este valor máximo porque la concentración media del néctar reportada recientemente en flores de este frutal y en un área geográfica cercana a la zona donde se realizó el presente estudio fue del 7% (Díaz et al 2013). Sin embargo, existen reportes previos de mayores niveles de concentración de néctar para este cultivo (Free 1993).

Para analizar la actividad de las recolectoras de polen se colocaron simultáneamente trampas de polen en la entrada de 2 colmenas de cada tratamiento por 6 días. Se usaron trampas frontales convencionales que consistían en una estructura de madera con una malla de metal que obligaba a todas las abejas, tanto las que salían como las que ingresaban, a pasar por las aberturas del tejido de la malla (**Figura 33**). Las recolectoras de polen que regresaban a las colmenas con corbículas en sus patas posteriores eran desprovistas de sus cargas en el pasaje por el entramado metálico, colectándose las mismas en un cajón para su posterior análisis. Las muestras fueron almacenadas en frascos de plástico y conservadas en un lugar seco. Específicamente las trampas se colocaron el día de la aplicación de los tratamientos (21 de Septiembre) previo a su implementación, y luego de tres días consecutivamente durante 5 días (25 al 29 de Septiembre), de 13:30 a 14:00 hs cada día. En el laboratorio, las corbículas colectadas se discriminaron por color en dos categorías (polen de pera versus polen de otras especies) y se contabilizaron. Las

cargas de color verde fueron consideradas corbículas de pera (Free 1993) y pesadas en grupos de 10 corbículas (20 grupos diarios por tratamiento).

Figura 33. Estudio del efecto del Facilitador Pera en la recolección de polen. A) Trampas de polen frontales convencionales de madera. La malla de metal obliga a todas las abejas, tanto al ingresar como al salir de la colmena, a pasar por el entramado. Las recolectoras de polen son desprovistas de sus cargas en el pasaje. B) Clasificación y cuantificación de las corbículas en el laboratorio. Luego de esta etapa las corbículas se pesaron en grupos de a diez

5.2.1.5 Desarrollo del área de cría en las colmenas

A fin de monitorear el desarrollo del área de cría de las colmenas estudiadas, se midió esta variable en dos momentos: el día anterior a la aplicación de los tratamientos y 7 días más tarde. Con un centímetro, se registraron los radios mayor y menor de la elipse de cría operculada de ambas caras en todos los cuadros con cría. Se calculó el área de la elipse por medio de la fórmula:

$$\text{Área de la elipse} = r1 \times r2 \times \pi$$

El área de cría total de cada colmena, tanto inicial como final, se obtuvo por sumatoria de las áreas de todas las caras de los cuadros con cría.

El desarrollo del área de cría se estimó calculando la diferencia entre el área de cría final y el área de cría inicial. A esta diferencia que en adelante referiremos como "ΔÁrea de cría" corresponde entonces a la fórmula:

$$\Delta \text{Área de cría} = \text{Área de cría final} - \text{Área de cría inicial}$$

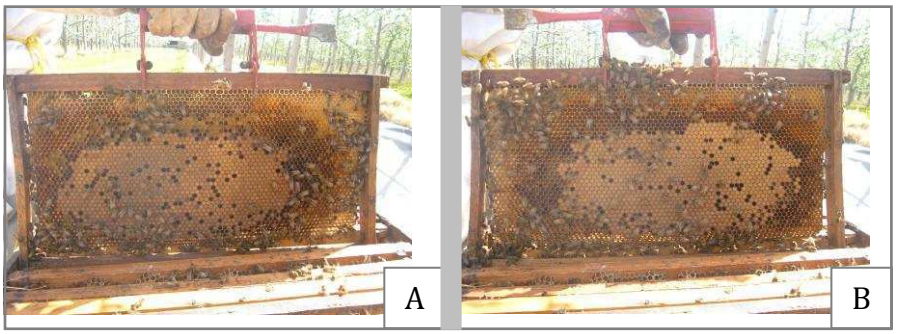


Figura 34. Cuadro con cría de una colmena comercial tipo Langstroth. Se observan las caras de un mismo cuadro A) Interna y B) Externa al centro de la colmena. Se midieron los radios mayor y menor de la elipse para estimar el área de cría en 7 colmenas por tratamiento

5.2.1.6. Estadística

La actividad general de las colmenas se estudió por medio de un análisis de la varianza de un factor con medidas repetidas (ANOVA-MR) (Sokal and Rohlf 2000). Las frecuencias acumuladas de ambas categorías de polen (pera y otras especies) se

analizaron con un Prueba de Chi-cuadrado (χ^2). El peso de las corbículas se comparó con una prueba de Kruskal Wallis (Zar 1999).

La frecuencia acumulada de corbículas de polen de pera y de otras especies florales se comparó entre tratamientos por medio de un Prueba de homogeneidad Chi-cuadrado (χ^2) (Sokal and Rohlf 2000).

La actividad de las recolectoras de néctar, tanto para la proporción de recolectoras como la proporción de recolectoras con néctar diluido, se compró entre tratamientos con un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor (Zar 1999).

El área de cría se comparó entre tratamientos con un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor (Zar 1999).

5.2.2. Evaluación del efecto de un formulado sintético específico sobre el rendimiento en cultivos de pera

5.2.2.1. Sitio de estudio y animales

Las mezclas sintéticas primeramente puestas a prueba en parámetros de actividad y cría de colmenas de *Apis mellifera*, se aplicaron en la siguiente temporada de floración a fin de evaluar su efecto en el rendimiento de los cultivos. Para esto se trabajó en un cultivo de pera *Pyrus communis*, perteneciente a la empresa Kleppe S.A y situado en la localidad de General Roca (39° 02′ 00″ S 67° 35′

00″ O. **Figura 39**). Durante la temporada de floración de 2013 (Septiembre – Octubre) se estimularon colmenas de abejas melíferas que polinizaban este cultivo, y en la cosecha correspondiente (Febrero - Marzo de 2014), se evaluó el rendimiento en sus inmediaciones. El diseño de plantación de los lotes en los que se encontraban las colmenas tratadas incluyó hileras de las variedades D´Anjou y Packam´s intercaladas en una proporción 2:2.

Las colmenas comerciales utilizadas para asegurar el servicio de polinización de este cultivo presentaban similares características, en cuanto a población y reservas, a las colmenas descriptas en los anteriores capítulos.

En este campo la combinación de variedades y sus proporciones fue diferente entre lotes al punto que no hubo dos lotes con similares ofertas florales que permitieran evaluar el efecto de las estimulaciones homogeneizando estos factores. Adicionalmente, todos los lotes tenían la misma heterogeneidad en su entorno de Norte a Sur: sus extremos Norte adyacentes a un cultivo de manzana y lotes sin cultivar al sur. Teniendo en cuenta los elementos mencionados se seleccionaron cuatro grupos de colmenas: los dos grupos del lote 6, el grupo ubicado al SUR en el lote 7 y el grupo del entorno NORTE en el lote 12 (se indican con un círculo rojo en la **Figura 39**). Para maximizar la homogeneidad de la vegetación en las cercanías de las colmenas bajo los diferentes tratamientos, éstos se sortearon entre los grupos de colmenas del lote 6 y a los otros dos grupos se les asignaron los tratamientos de manera que ambos quedaran asignados en cada entorno: en adelante **ENTORNO**

NORTE y **ENTORNO SUR.** Los grupos de colmenas contaban con entre 7 y 15 colmenas cada uno.

5.2.2.2. Estimulación olfativa de las colmenas

Entre los 4 grupos de colmenas mencionados previamente (que incluyeron 32 colmenas en total) se sortearon al azar los tratamientos:

1) Solución azucarada 50% p/p sin aromatizar (SA)
2) Solución azucarada 50% p/p aromatizada con Facilitador Pera (SA + FP) (50µL/L)

Las soluciones se prepararon y se aplicaron de la misma forma que se describió previamente. Debido a las malas condiciones climáticas (y a fin de evitar pillaje entre colmenas), la estimulación en este caso particular se realizó en dos etapas, cada una consistiendo en el vertido de 250ml de solución y con un intervalo de un día entre ambas.

Dado el número de personas involucradas en este estudio, la ventana temporal de floración y la gran cantidad de variables estudiadas en esta temporada, los tratamientos se aplicaron con una floración avanzada de la variedad Packam´s. Se estimó visualmente entre un 80 y 90% de floración.

Figura 35. Cultivo de pera *Pyrus communis* en la localidad de General Roca (39° 02′ 00″ S 67° 35′ 00″ O) Provincia de Rio Negro, Argentina. Los recuadros indican lotes con árboles de pera. G= grupos de colmenas. Los mismos se enumeran consecutivamente para cada tratamiento en cada lote. SA: solución azucarada sin aromatizar; SA + FP: solución azucarada aromatizada con Facilitador Pera. ST: sin tratar.

Se resumen a continuación las variables consideradas para la aplicación de los tratamientos y el número de colmenas tratadas en cada caso.

Tabla 9. Lotes con cultivo de pera *Pyrus communis* en un campo de General Roca. Se detallan el lote, el entorno, las variedades implantadas, su proporción en número de filas, las colmenas tratadas y el tratamiento aplicado en cada grupo.

Lote	Entorno	Variedad 1	Variedad 2	Filas Var1: Var2	Colmenas	Tratamiento
6	SUR	D´Anjou	Packam´s	50:48	8	SA
7(*)	SUR	D´Anjou	Packam´s	20:50	8	SA + FP
6	NORTE	D´Anjou	Packam´s	50:48	8	SA + FP
12	NORTE	D´Anjou	Packam´s	21:77	8	SA
11			Packam´s	Sólo 1 variedad	13	ST

(*) El lote 7 también tenía 28 filas de la variedad Williams

5.2.2.3. Actividad en las colmenas y rendimiento del cultivo lindante

Un día después de la segunda etapa de aplicación de los tratamientos, y para describir la actividad general de las colmenas, se contabilizó el número de abejas ingresantes por minuto en todas las colmenas tratadas.

Al momento de la cosecha se contabilizó el número de frutos por árbol en el entorno de tres de los cuatro grupos de colmenas tratados (dos tratados con FP y uno con SA). El rendimiento en las inmediaciones del grupo de colmenas del lote 12 (tratado con SA) no pudo relevarse porque ya se había cosechado el área. Debido a esto, el rendimiento del grupo tratado con FP (grupo de colmenas del lote 6 en el ENTORNO NORTE), ahora sin grupo control contrastante, se comparó con el rendimiento obtenido en las inmediaciones de un grupo de colmenas sin tratar (ST) y con un entorno similar a él (ENTORNO NORTE). Se seleccionó el grupo de colmenas del lote 11 en el ENTORNO NORTE. Este grupo (que contaba con 13

colmenas) presentaba en las cercanías de las colmenas sólo hileras de la variedad Packam´s ***(*)***.

En todos los casos se contabilizó el número de frutos en 30 árboles elegidos al azar dentro de un arquetipo homogéneo, alternando los conteos entre las caras Norte y Sur del cultivo.

Dado que el grupo de colmenas tratado con SA en el ENTORNO NORTE se excluyó del estudio, también se descartaron los registros de actividad de este entorno.

5.2.2.4. Estadística

El número de abejas ingresantes a las colmenas por minuto y el número de frutos por árbol en el ENTORNO SUR se compararon entre tratamientos con un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor (Zar 1999).

El rendimiento en las inmediaciones de las colmenas del ENTORNO NORTE, también se analizó con un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor (Zar 1999). Se repitió el análisis con los datos corregidos por el número de colmenas en un radio de 150 metros.

(*) *Se resalta que esta incorporación fue posible porque durante la floración se relevaron todos los grupos de colmenas en el campo.*

5.3 Resultados

5.3.1 Evaluación del efecto de un formulado sintético sobre la actividad recolectora y el desarrollo del área de cría

En términos generales, la apertura de las flores de ambas variedades mostró un patrón similar, alcanzando el 100% de floración al final del estudio. La variedad William´s inició más tardíamente su floración. Teniendo en cuenta que el efecto de estas estimulaciones no serían relevantes en la variedad Williams por su tendencia a la partenocarpia, se tuvo en cuenta la floración de la variedad Packam´s para la aplicación de los tratamientos. De esta manera, las colmenas se estimularon al 30% de floración de la variedad Packam´s (**Figura 36**A)

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en la actividad general de las colmenas (ANOVA-MR de un factor, F= 1,3; gl= 2, p=0,2762. **Figura 36**B)

Evaluación de la actividad recolectora de polen

De las cuatro trampas de polen colocadas, sólo una por tratamiento permitió obtener una cantidad suficiente de muestras para analizar. Las corbículas colectadas en ellas a lo largo del período post-estimulación, se agruparon de a diez y se pesaron. La comparación del peso promedio (mg) (media ± error estándar) de 20 grupos diarios por colmena mostró diferencias significativas entre tratamientos los días 21, 28 y 29 de Septiembre (Prueba de Kruskal Wallis, $p<0.05$) (**Figura 36**C)

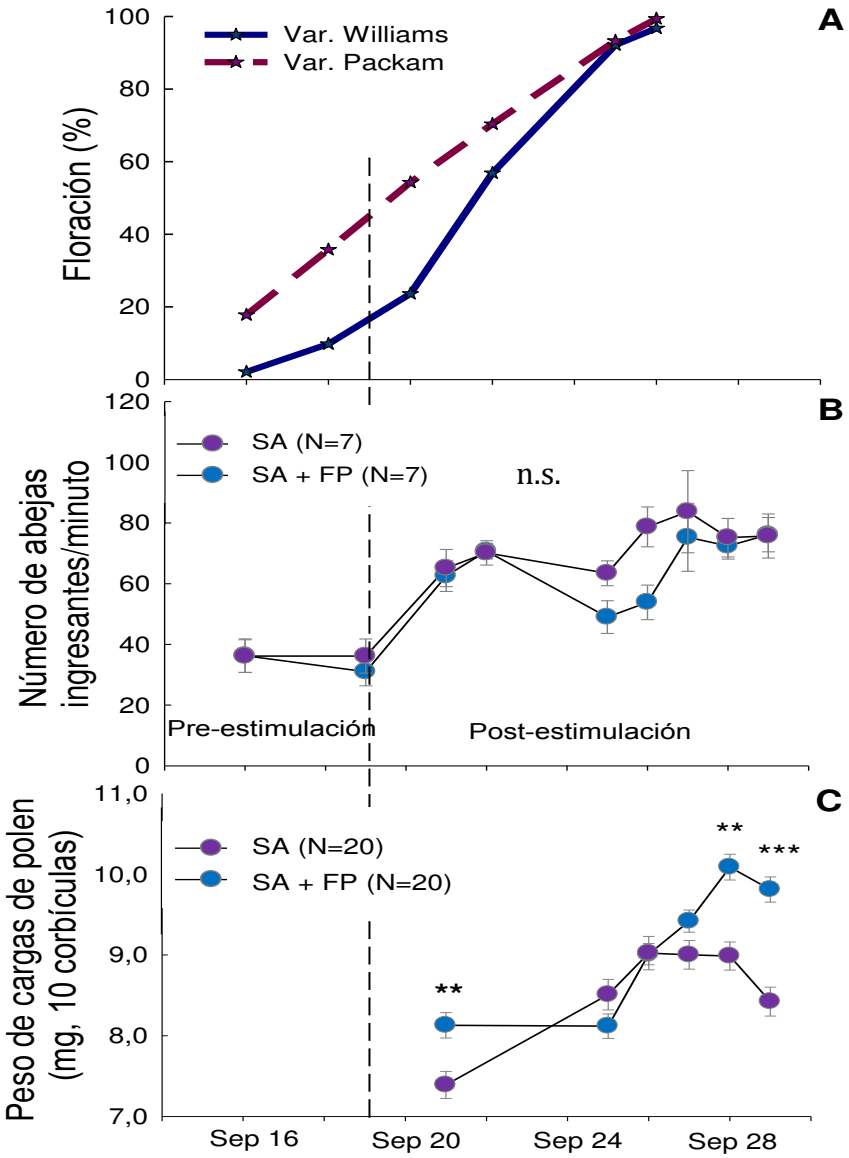


Figura 36. Evaluación del Facilitador Pera sobre la actividad de colmenas ubicadas en un cultivo de pera *Pyrus communis* en la localidad de General Roca. SA: solución azucarada sin aromatizar, SA + FP: solución azucarada aromatizada Facilitador Pera. **A**) Dinámica de floración de las variedades Packam´s y Williams en el entorno de las colmenas tratadas. **B**) Actividad general de 7 colmenas por tratamiento medida como número de abejas ingresantes por minuto (media ± SE; $p<0.01$; ANOVA M-R). **C**) Actividad de recolección de polen medida como peso de 10 corbículas de polen de pera (N=20 pesajes por tratamiento por fecha) en una colmena de cada tratamiento los días 21, 25, 26, 27, 28 y 29 de Septiembre (media ± SE). Prueba de Kruskal Wallis *** y ** representan diferencias significativas $p<0.001$ y $p<0.01$ respectivamente. La línea punteada indica el momento en que se aplicaron los tratamientos.

La frecuencia acumulada de polen de pera en las trampas colocadas en las colmenas tratadas con SA + FP mostró diferencias significativas entre tratamientos Prueba de homogeneidad Chi-cuadrado F= 11,874; gl= 1; p= 0,0006. **Figura 37.**).

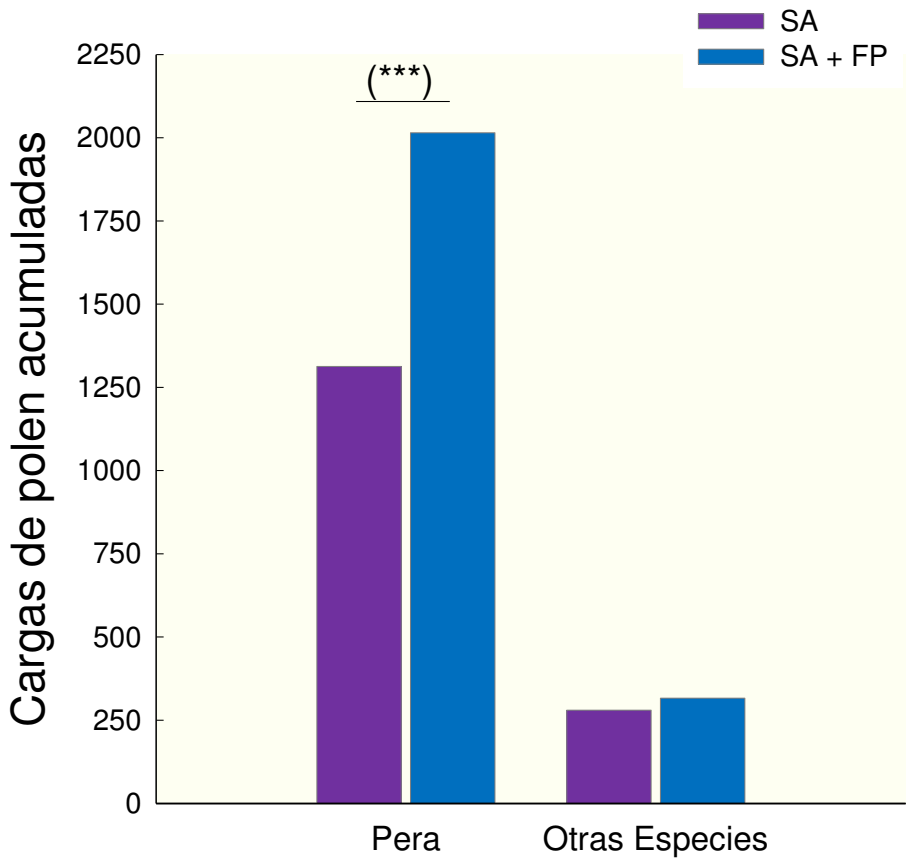


Figura 37. Estudio del efecto del Facilitador Pera en la recolección de polen en colmenas ubicadas en un campo de pera *Pyrus communis* en la localidad de General Roca. SA: solución azucarada sin aromatizar; SA + FP: solución azucarada aromatizada con Facilitador Pera. Número de cargas de polen acumuladas durante 3 días luego de la aplicación de los tratamientos. Se colocaron trampas de polen en una colmena de cada tratamiento y se clasificaron las muestras obtenidas según su color en las categorías: polen de pera y polen de otras especies. Se muestran los valores acumulados a lo largo de los días 21, 25 y 26 de Septiembre. Prueba de homogeneidad Chi-cuadrado; *** representa diferencias significativas $p < 0,001$

Evaluación de la actividad recolectora de néctar

La proporción de abejas recolectoras de néctar observada en las colmenas no difirió entre tratamientos (ANOVA de un factor, F= 0,16; gl= 1, p=0,6964. **Figura 38.**). Se obtuvo un resultado similar para la proporción de recolectoras de néctar con carga diluida (entre 1 y 10% peso/peso; ANOVA de un factor: F= 3,06; gl= 1, p= 0,1106. **Figura 39**)

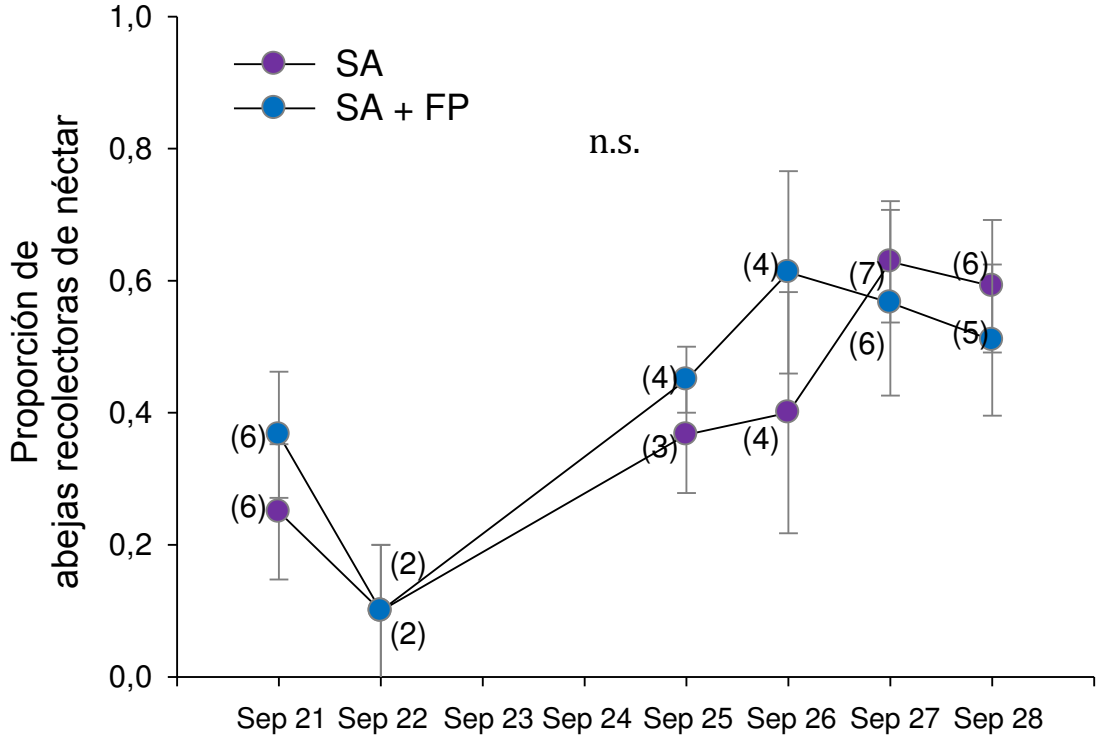


Figura 38. Evaluación del efecto del Facilitador Pera sobre la proporción de recolectoras de néctar en colmenas que polinizan cultivos de pera *Pyrus communis* en la localidad de General Roca. SA: solución azucarada sin aromatizar, SA + FP: solución azucarada aromatizada con Facilitador Pera. Se atraparon 6 abejas por colmena por día. Todos los individuos carecían de cargas de polen en sus patas posteriores. La proporción de recolectoras de néctar se calculó como: número de abejas con carga de buche de concentración ≥1% / 6. Los números entre paréntesis indican el número de colmenas en el que se realizaron las capturas en cada caso. ANOVA de un factor, p< 0,05 Prueba de Tukey.

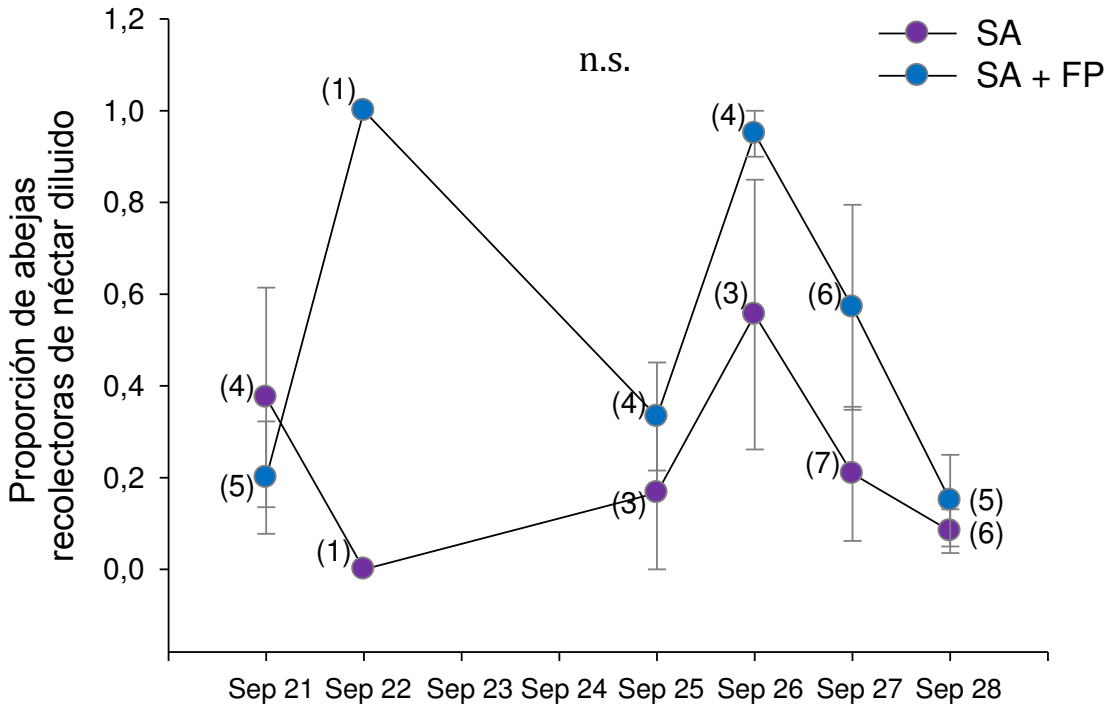


Figura 39. Evaluación del efecto del Facilitador Pera sobre la proporción de recolectoras de néctar con carga diluida en colmenas que polinizan cultivos de pera *Pyrus communis* en la localidad de General Roca. SA: solución azucarada sin aromatizar, SA + FP: solución azucarada aromatizada con Facilitador Pera. Se atraparon 6 abejas por colmena por día. Todos los individuos carecían de cargas de polen en sus patas posteriores. La proporción de recolectoras de néctar diluido se calculó como: número de abejas con carga de buche de concentración ≥1% y ≤10% / recolectoras con carga de buche ≥1%. Los números entre paréntesis indican el número de colmenas en el que se realizaron las capturas en cada caso. ANOVA de un factor, $p< 0,05$ Prueba de Tukey.

Estudio del desarrollo del área de cría

El área de cría mostró un mayor desarrollo en las colmenas que recibieron el Facilitador Pera. Esto pudo observarse por medio de la diferencia entre el área de cría final y el área de cría inicial, que evidenció diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de un factor, F= 7,67; gl= 1, $p<0,05$. **Figura 40**)

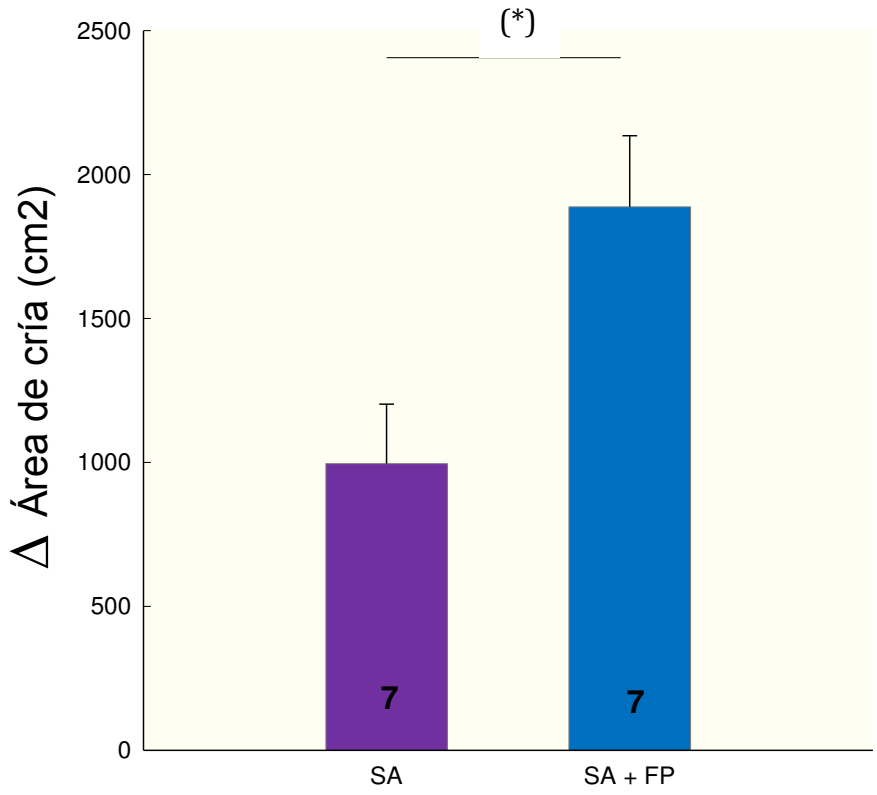


Figura 40 Evaluación del efecto del Facilitador Pera sobre el desarrollo del área de cría de colmenas que polinizan cultivos de pera *Pyrus communis*. en la localidad de General Roca. SA: solución azucarada sin aromatizar, SA + FP: solución azucarada aromatizada con Facilitador Pera. ΔÁrea de cría = Área de cría final - Área de cría inicial (media ± ES). Los números en las barras indican el número de colmenas cuya cría fue medida en su totalidad en ambos momentos. ANOVA de un factor, $p<0.05$, Prueba de Tukey.

5.3.2 Evaluación del efecto del formulado sintético sobre el rendimiento de los cultivos de pera

La actividad de las colmenas en el ENTORNO SUR no mostró diferencias significativas entre tratamientos ni en relación al número total de abejas ingresantes por minuto (ANOVA de un factor, F= 0,06; gl= 1, p=0,8061) ni en relación a las recolectoras de polen (ANOVA de un factor, F= 2,59; gl= 1, p= 0,1300. **Figura 41** A).

Sin embargo, se obtuvo un mayor rendimiento en el entorno de las colmenas tratadas con SA + FP. Los frutos contabilizados por árbol en las inmediaciones de las colmenas con FP fueron 15% más en el ENTORNO SUR (ANOVA de un factor, F= 4,48; gl= 1, p= 0,0386. **Figura 41**B) y 35% más en el ENTORNO NORTE (ANOVA de un factor, F= 17,72; gl= 1, p= 0,0001. **Figura 42**B).

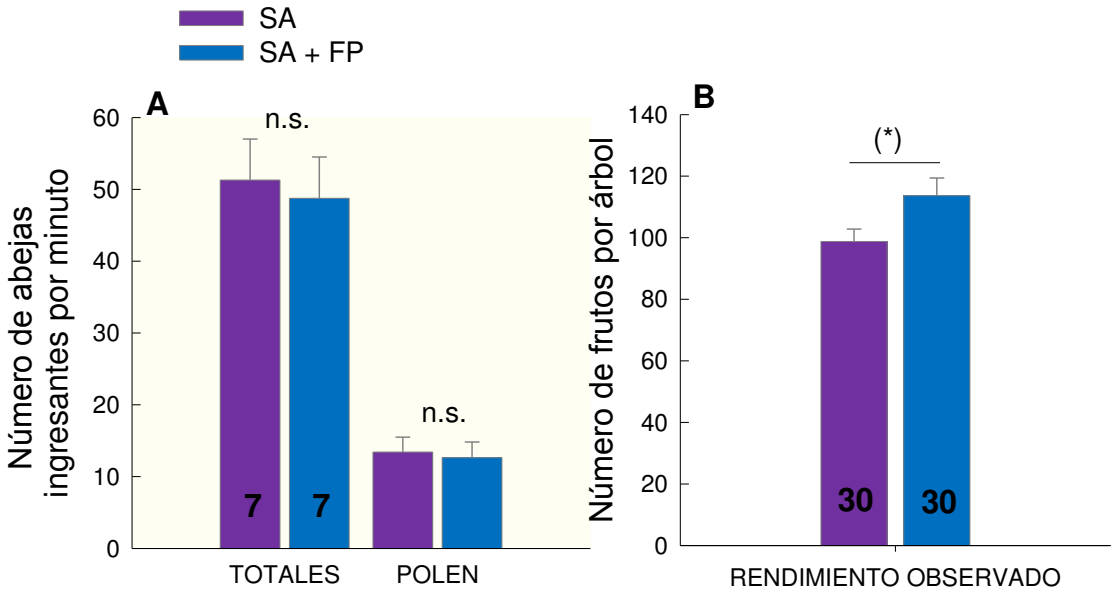


Figura 41. Evaluación del efecto del Facilitador Pera sobre la actividad de dos grupos de colmenas que polinizaban cultivos de pera *Pyrus communis* en la localidad de General Roca. Las colmenas corresponden al ENTORNO SUR. SA: solución azucarada sin aromatizar, SA + FP: solución azucarada aromatizada con Facilitador Pera. Actividad medida como A) Número de abejas ingresantes por minuto. Los números en las barras indican el número de colmenas monitoreado en cada caso. **B**) Rendimiento del cultivo en las inmediaciones de las colmenas monitoreadas en A. Los números en las barras indican el número de árboles observados en cada caso. ANOVA de un factor, p<0,05, Prueba de Tukey.

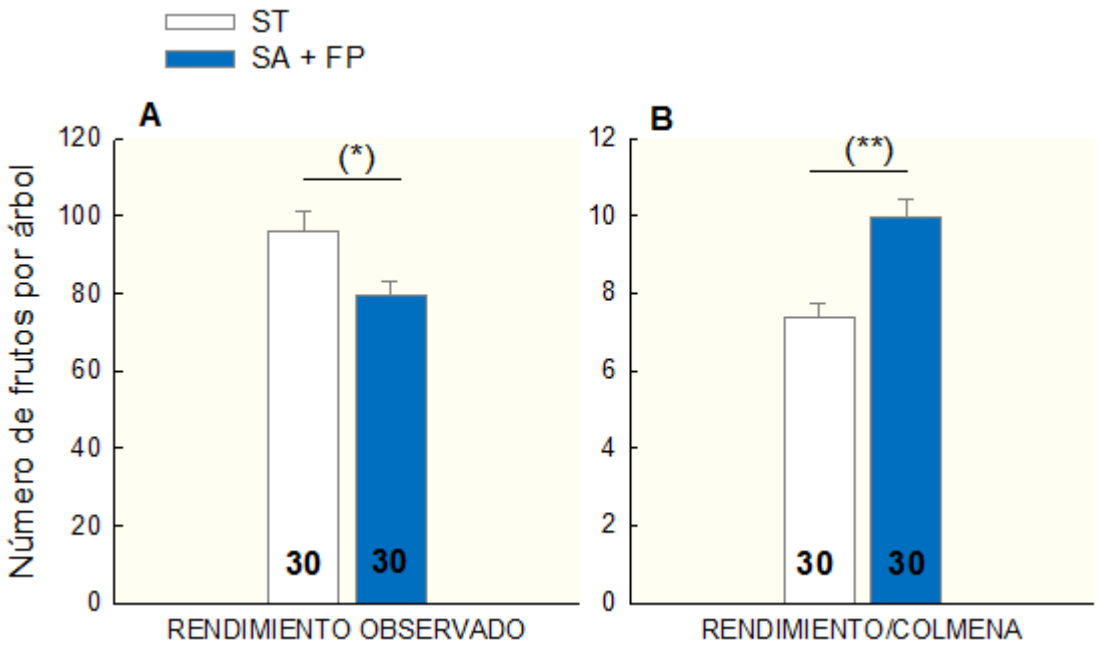


Figura 42. Evaluación del efecto del Facilitador Pera sobre la actividad de dos grupos de colmenas que polinizaban cultivos de pera *Pyrus communis* en la localidad de General Roca. ST: sin tratar, SA + FP: solución azucarada aromatizada con Facilitador Pera. Las colmenas corresponden al ENTORNO NORTE. **A**) Rendimiento observado (conteo de frutos en los árboles) **B**) Número de frutos por árbol ponderado por el número de colmenas en un radio de 150 metros (13 colmenas Sin Tratar y 8 colmenas tratadas con FP; **Tabla 9**). Los números en las barras indican el número de árboles observados en cada caso. ANOVA de un factor, $p<0,05$, Prueba de Tukey.

Los grupos de colmenas en el **ENTORNO SUR** eran iguales en número y no había otras colmenas en un radio de 150 metros. Sin embargo, en el ENTORNO NORTE, el grupo de colmenas no tratado y que debió ser incorporado posteriormente al estudio contaba con 13 colmenas. Además en este entorno (NORTE) había otras colmenas en un radio de 150 metros. Por este motivo, en el conteo de frutos en el **ENTORNO NORTE** fue corregido por el número de colmenas.

5.4 Discusión y conclusiones

En este capítulo se estudiaron los efectos de la aplicación de Facilitador Pera en colmenas que polinizan cultivos de *Pyrus communis*. En la primera parte de este capítulo se evaluaron los efectos a nivel de colmena contabilizando las abejas ingresantes por minuto. Además se evaluó la actividad de las recolectoras de néctar y de polen mediante otros parámetros. En relación a las primeras se estudió la proporción de recolectoras de néctar analizando la concentración de las cargas de buche de abejas sin cargas de polen en sus patas posteriores. La actividad de las recolectoras de polen se estudió despojando de sus corbículas a las abejas que volvían de recolectar, usando trampas de polen convencionales y posteriormente clasificando y pesando las cargas. Además se evaluaron los efectos de estas estimulaciones sobre el desarrollo del área de cría. Finalmente se evaluó el efecto de esta estimulación en la actividad de colmenas que polinizaban cultivos de pera y el rendimiento en las cercanías de las colmenas tratadas.

Estudios previos realizados en laboratorio (Díaz 2013) demostraron que en condicionamientos diferenciales realizados en el paradigma de REP, presentando el Facilitador Pera como EC+ y el olor de las flores naturales de pera como EC-, las abejas no pueden discriminarlos. En el mismo trabajo se propuso además, que la mezcla que conforma el FP podría representar los olores clave usados por las abejas para el reconocimiento de esta fragancia floral (Baraldi et al. 1999) y que la presentación del Facilitador asociado con una recompensa aumentaría su similitud en términos de relevancia biológica con el olor floral.

No se encontraron efectos a nivel de actividad general de las colmenas (número de abejas ingresantes por minuto; **Figura 37** B), pero sí a nivel de las recolectoras de polen. El peso de las corbículas de pera colectado en las colmenas tratadas con FP fue significativamente mayor al de las colmenas control (**Figura 37 C**). Esto podría indicar que la aplicación de este estimulante promueve un mejoramiento de las capacidades motoras de las recolectoras de polen, que en ausencia de cualquier tipo de estimulación tiene lugar naturalmente con el avance de la floración según se describió en trabajos previos (Díaz et al. 2013). Los efectos sobre la recolección de polen también se evidenciaron en las cargas de la categoría "polen de pera" acumuladas post-estimulación (**Figura 38**). Estos resultados son coherentes con el incremento en el área de cría de las colmenas tratadas con FP (**Figura 41**).

En este sentido las observaciones podrían vincularse a un mayor crecimiento poblacional en las colmenas tratadas con FP, ya que el tiempo de desarrollo de la cría depende de la calidad y cantidad del alimento proteico disponible en el exterior. Estudios previos dan cuenta de la relación entre las reservas internas de la colmena y la tasa de recolección, pero no existen estudios que establezcan si altas tasas de recolección de polen podrían modular positivamente también la puesta de huevos.

Respecto de las recolectoras de néctar no se evidenciaron diferencias entre tratamientos para la proporción de recolectoras entre las abejas que retornaban a las colmenas sin cargas de polen (**Figura 38**.), ni en la proporción de recolectoras de néctar diluido. Sin embargo respecto a estas últimas, la carga de las abejas

capturadas en colmenas tratadas con SA + FP fue en promedio más diluida (**Figura 39**)

En resumen, en esta primera parte se estudiaron los efectos de la estimulación de colmenas con Formulado de Pera, en parámetros de colmena. Se alcanzó una recolección de polen de pera significativamente mayor en las colmenas tratadas con FP. Esto se observó tanto en un mayor tamaño de las corbículas como en el número de cargas de polen y está directamente relacionado con el incremento del área de cría registrado en las colmenas tratadas con SA + FP. Además, las recolectoras de néctar con carga diluida (consistente con la recolección de néctar en flores de pera) fue en promedio mayor (en un 130% mayor) en las colmenas tratadas con FP.

Los resultados descriptos en la segunda parte de este capítulo muestran mayores rendimientos en las inmediaciones de las colmenas tratadas con SA + FP (Figura41B y Figura 42**B**), aún cuando no fue posible detectar diferencias a nivel de la actividad de las colmenas en la piquera (Figura 41**A**). Si bien la actividad general de las colmenas que polinizaban cultivos de pera no reflejó los efectos de estas estimulaciones, sí lo hicieron variables como el número de corbículas acumuladas, su peso a lo largo del tiempo y en el área de cría. En este sentido es interesante notar que cada sistema productivo y cada uno de los niveles (en colmena o en la actividad sobre el cultivo) sobre los cuales se buscó evaluar los efectos de estas estimulaciones presentaron diferentes desafíos.

En síntesis, la aplicación de este formulado incrementa el rendimiento de los cultivos de pera, mejora los niveles de reserva de polen de las colmenas e incrementa sus poblaciones. Se propone la incorporación de este desarrollo como una técnica apropiada no solo para incrementar el rendimiento de los cultivos de pera mediante el sesgo de las preferencias recolectoras de abejas melíferas utilizadas en los Servicios de Polinización trashumantes, sino también para mejorar el estado sanitario de las colmenas por medio del incremento de las reservas proteicas de las colmenas y el aumento de las poblaciones de abejas.

6. Discusión General

En esta Tesis se demostró que las formulaciones sintéticas denominadas Facilitador Girasol (FG), Facilitador Manzana (FM) y Facilitador Pera (FP), y que imitan los olores florales de girasol, manzana y pera respectivamente, incrementan el rendimiento de los cultivos. Asimismo, en conjunto, los resultados de esta Tesis evidencian la necesidad de considerar las habilidades cognitivas de la abeja melífera en las prácticas de mejoramiento de los sistemas productivos que dependen de sus servicios de polinización.

El desarrollo de las Formulaciones Sintéticas

Las formulaciones sintéticas puestas a prueba a campo en este trabajo y desarrolladas por el Grupo de Estudio de Insectos Sociales se basan en la formación de memorias olfativas apetitivas. Como se detalló, el aprendizaje de claves olfativas es fundamental tanto en el contexto de la recolección de recursos (Menzel 1985), como en el de reclutamiento (Arenas et al. 2007; Arenas et al. 2008; Grüter et al. 2009; Balbuena et al. 2012a). Incluso la formación de memorias olfativas en abejas pre recolectoras puede sesgar sus preferencias a edades recolectoras (Balbuena et al. 2012b). Los estudios de condicionamiento olfativo realizados bajo el paradigma de REP en el marco del desarrollo de las formulaciones, demostraron que las abejas no pueden discriminarlas del olor floral que cada una de ellas imita (Díaz 2013) sugiriendo que las tres mezclas representan los olores clave usados por estos

insectos para el reconocimiento de las fragancias (Girasol: Pham-Delegue et al. 1986; Reinhard et al. 2010; Manzana: Buchbauer et al. 1993; Pera: Baraldi et al. 1999). Ensayos realizados a campo, previos a esta Tesis, demostraron que el uso de Facilitador Girasol y de Facilitador Manzana en colmenas que polinizan cultivos de girasol y de manzana respectivamente, incrementa la eficiencia recolectora de las abejas y sesga sus preferencias recolectoras específicamente hacia los cultivos cuyos olores están representados por esas mezclas. Los incrementos en el rendimiento de los cultivos conseguidos en esta Tesis como consecuencia de la aplicación de FG, FM y FP en colmenas son coherentes con los resultados previos y demuestran que la presentación conjunta de los facilitadores con alimento en el interior de las colmenas da lugar a la formación de memorias olfativas apetitivas y generan efectos globales.

Evaluación de las Formulaciones Sintéticas a campo

El rendimiento informado por cosechadoras New Holland en cultivos de girasol – semilla mostró, para todos los híbridos estudiados, mayores niveles en los lotes polinizados por colmenas tratadas con Facilitador Girasol. Los incrementos oscilaron entre el 29 y el 75%. Además, en esos lotes el rendimiento fue más homogéneo. En el caso de las cosechas manuales el rendimiento también fue mayor en el lote con colmenas que recibieron FG. Estos resultados fueron coherentes con los incrementos en los niveles de actividad registrados en las colmenas y que se evidenciaron tanto en relación al número de abejas ingresantes a los nidos como en la densidad de recolectoras en el cultivo próximo.

Respecto al formulado específico de manzana, **e**l rendimiento del clon Chañar 28 de la variedad Red Delicious fue mayor en las cercanías de las colmenas tratadas con el Formulado de Manzana. Esta tendencia se observó en todos los casos analizados e incluso, en algunos, se obtuvieron diferencias significativas. La actividad de las colmenas en cultivos de este frutal mostró resultados dispares. La discrepancia en la variable "número de abejas ingresantes a las colmenas por minuto" entre los monitoreos de esta Tesis y estudios previos podría relacionarse con las malas condiciones climáticas de la temporada de floración de 2013. En ella se registraron temperaturas bajo cero con una frecuencia que no se observaba en la zona desde 2004. Estas condiciones adversas perjudican el desarrollo fenológico de los frutales y sin dudas afectan la actividad polinizadora de la abeja melífera. Tampoco la variable "densidad de abejas sobre los árboles" reflejó una mayor actividad recolectora de la abeja en el cultivo próximo a las colmenas tratadas con FM. Sin embargo, la diferencia en el rendimiento demuestra que las abejas efectivamente recolectaron más conspicuamente en esos lotes. Es probable entonces que, o bien el añerismo haya influido negativamente para esta observación, o bien que esta variable no sea adecuada en este contexto por las dificultades que genera la observación de abejas en el dosel.

El rendimiento estimado mediante conteos de frutos sobre los árboles de pera evidenció mayores niveles de esta variable en el entorno de las colmenas tratadas con en Formulado de Pera. Además, la evaluación a nivel de colmena mostró la misma tendencia ya que en las colmenas que recibieron FP i) se acumuló

un mayor número de corbículas de pera, ii) el peso de las cargas de polen fue mayor sobre el final del estudio y iv) el área de cría tuvo un mayor desarrollo. La actividad medida como número de abejas ingresantes por minuto no mostró diferencias entre tratamientos ni para el conteo de abejas totales ni para las recolectoras de polen. Tampoco se obtuvieron diferencias significativas en la proporción de recolectoras de néctar ni en la proporción de recolectoras de néctar diluido. En conjunto, los resultados de la estimulación de colmenas con FP, sugieren que el incremento de la eficiencia polinizadora de la abeja melífera en este sistema estaría principalmente asociado a las recolectoras de polen.

Implicancias

La aplicación de estas mezclas en colmenas que polinizan cultivos comerciales permitiría reducir los tiempos de adaptación de las colmenas trashumantes. Además, y si bien no fue estudiado en esta Tesis, es posible que estas estimulaciones incidan en parámetros de post-cosecha (Dag et al. 2008; Gaaliche et al. 2011; Bommarco et al. 2012; Gallai et al. 2009). Por otra parte, el procedimiento de aplicación de estas mezclas no difiere de las prácticas usuales de alimentación de las colmenas y por lo tanto su implementación no revierte complejidad. Finalmente, debido a que este método de estimulación se basa en la formación de memorias, y considerando la plasticidad y reversibilidad de estos procesos, esta herramienta no debería tener efectos adversos sobre las colmenas.

Consideraciones de los estudios a campo

En este estudio se propició la formación de memorias olfativas en la abeja melífera a nivel colectivo, en colmenas que se encontraban polinizando cultivos comerciales y a una escala nunca antes abordada. Previo a esta Tesis estos estudios se habían restringido a condicionamientos olfativos realizados bajo condiciones controladas de laboratorio. La realización de estos análisis a campo planteó un enorme y a la vez interesante desafío ya que fue necesario examinar detalladamente en cada sistema, las variables a considerar para que los efectos de estas estimulaciones, si los hubiere, no quedaran enmascarados por la heterogeneidad del ambiente.

Teniendo en cuenta la constancia floral que la abeja melífera exhibe en cada vuelo recolector (Grant 1950; Free 1963; von Frisch 1967; Waser 1986; Goulson 1999), en cultivos de girasol para la producción de semilla híbrida fue necesario considerar qué parentales Macho Estéril y Macho Fértil había en cada lote, ya que cada combinación de ellos planteaba un escenario diferente de recursos para la abeja melífera. En algunos lotes los parentales diferían marcadamente entre sí en su morfología, mientras que en otros lotes se observaban capítulos ME y MF más homogéneos (al menos en la altura y / o el diámetro de la inflorescencia). Incluso se observaron diferencias en el tamaño del grano de polen entre parentales MF.

De la misma manera, en los sistemas de producción frutícola se evidenció la necesidad de tener en cuenta las combinaciones de variedades (en cultivos de manzana también se consideraron los clones) y cuál era la variedad polinizadora en

cada caso. La relevancia de estos factores no sólo se vincula con las diferentes claves (químicas y/o visuales) que presentan sino porque además cada composición de variedades ofrece rendimientos particulares. Fue interesante también advertir que el monitoreo de la densidad de abejas sobre el cultivo es una herramienta adecuada en el sistema de girasol semilla pero inadecuada en el marco de la producción frutícola por las características particulares de cada sistema.

La importancia de los servicios de polinización

La polinización animal incide en la agricultura global y en la seguridad alimentaria (FAO; Hein 2009) afectando no sólo el rendimiento final de los cultivos sino también numerosos parámetros de post-cosecha. Aún cultivos que no dependen de la polinización para dar fruto se ven beneficiados por este servicio. El insecto usado con mayor frecuencia en los Servicios de Polinización es la abeja melífera, y durante los últimos años se incrementó el número de colmenas trashumantes contratado (FAO; Westerkamp y Gottsberger 2002; Biesmeijer et al. 2006; Aizen et al. 2008; Westerkamp y Gottsberger 2002; Ghazoul 2005). Estos aumentos no sólo se vinculan con las reducciones del hábitat de polinizadores nativos que paradójicamente acarrearon las medidas tendientes a incrementar los niveles de producción y/o rendimiento de los sistemas agrícolas; también se asocia a la deficiencia de estos servicios.

En esta Tesis se demostró que los actuales sistemas de producción conllevan diversos factores que podrían disminuir la eficiencia de polinización de la abeja

melífera. En los cultivos de girasol para la producción de semilla híbrida, estudiados en el Capítulo 2, se describió cómo la heterogeneidad de las claves visuales (y sin duda claves químicas no estudiadas en este trabajo) entre parentales Macho Estéril y Macho Fértil provoca un comportamiento predominantemente constante sobre cada uno de ellos en cada vuelo recolector. Si bien se demostró que la transferencia de polen desde el parental MF hacia el parental ME también está mediada por contactos corporales dentro del nido, la constancia floral observada perjudica la polinización cruzada de este cultivo. En cultivos de manzana la estimulación de las colmenas produjo diferentes resultados en los clones de Red Delicious sugiriendo que sus claves químicas y/o visuales podrían diferir en distinto grado de aquellas presentes en las variedades usadas para su polinización (Granny Smith o Gala). Más aún, la adherencia del polen al cuerpo de las abejas podría ser diferente entre ellas, así como se observó entre los parentales de polen de girasol (Capítulo 2). Aspectos similares, vinculados a diferencias en las claves químicas y visuales entre las variedades de pera podrían afectar de manera análoga, la eficiencia de polinización de la abeja en esos cultivos.

Los patrones de comportamiento de la abeja melífera son modulados por factores internos, como las necesidades de la colonia y por factores externos como las variaciones en la oferta floral. La organización social y las asombrosas habilidades cognitivas de este insecto le permiten responder eficientemente a estas fluctuaciones y le aseguran una eficiente búsqueda y recolección de alimento. Sin embargo, las actuales técnicas de mejoramiento de cultivos dependientes del

servicio de polinización de la abeja melífera subestiman y simplifican las capacidades de este polinizador. En esta Tesis se evidencia la imperiosa necesidad de considerar las habilidades cognitivas de la abeja melífera en los sistemas cuya productividad está directamente relacionada con la eficiencia del servicio de polinización

7. Biliografía

Abrol, D. P. (2012). Pollination Biology. Biodiversity Conservation and Agricultural Production, Springer.

Aizen, M. A., L. A. Garibaldi y S.A Cunningham (2008). Long-Term Global Trends in Crop Yield and Production Reveal No Current Pollination Shortage but Increasing Pollinator Dependency. Current Biology **18**: 1572-1575.

Allsopp, M. H., W. J. De Lange y Ruan Veldtman (2008). "Valuing insect pollination services with cost of replacement." PLoS one **3**(9): e3128.

Arenas, A. y W. M. Farina (2008a). "Age and rearing environment interact in the retention of early olfactory memories in honeybees." Journal of Comparative Physiology A **194**(7): 629-640.

Arenas, A., V. M. Fernández y W. M. Farina. (2008b). "Floral scents experienced within the colony affect long-term foraging preferences in honeybees." Apidologie **39**(6): 714-722.

Arenas, A., V. M. Fernández y W. M. Farina. (2007). "Floral odor learning within the hive affects honeybee´s foraging decisions." Naturwissenschaften **94**(3): 218-222.

Aristotle. Historia animalium. Bk. IX, Ch. 40. Transl. by d'Arcy Thompson. 1910

Balbuena, M., J. Molinas y W. M. Farina (2012a). "Honeybee recruitment to scented food sources: correlations between in-hive social interactions and foraging decisions." Behavioral Ecology and Sociobiology **66**(3): 445-452.

Balbuena, M. S., A. Arenas y W. M. Farina (2012b). "Floral scents learned inside the honeybee hive have a long-lasting effect on recruitment." Animal Behaviour **84(1)**: 77-83.

Baraldi, R., F. Rapparini, F. Rossi, A. Latella, y P. Ciccioli (1999) "Volatile organic compound emissions from flowers of the most occuring and economically important species of fruit trees." Physics and Chemistry of the Earth, Part B: Hydrology, Oceans and Atmosphere 24(6): 729-732.

Benitez, C. E. (2001). Cosecha y Poscosecha de Peras y Manzanas en los valles irrigados de la Patagonia, Estación Experimental Agropecuaria Alto Valle. Centro Regional Patagonia Norte. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

Bhagavan, S. y B. H. Smith (1997). "Olfactory conditioning in the Honey Bee, *Apis mellifera*: Effects of odor intensity." Physiology & Behavior **61**(1): 107-117.
Biesmeijer, J. C., S. P. M. Roberts, M. Roberts, M. Reemer, R. Ohlemüller, M. Edwards, T. Peeters, A. P. Schaffers et al. (2006). "Parallel Declines in Pollinators and Insect-Pollinated Plants in Britain and the Netherlands." Science **313**.5785: 351-354.

Bitterman, M., R. Menzel, A. Fietz, y S. Schäfer (1983). "Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*)." Journal of Comparative Psychology **97**(2): 107.

Blight, M. M., M. Le Métayer, MH. Pham Delègue, J. A. Pickett, F. Marion-Poll, y L. J. Wadhams (1997). "Identification of floral volatiles involved in recognition of oilseed rape flowers, Brassica napus by honeybees, *Apis mellifera*." Journal of chemical ecology **23**(7): 1715-1727.

Bommarco, R., L. Marini y B. E. Vaissière (2012). "Insect pollination enhances seed yield, quality, and market value in oilseed rape." Oecologia **169**(4): 1025-1032.

Bragachini, M., A. C Casini, A. J. Peiretti, A. J. Rodríguez, A. G. Cabral, I. E. Manfredi, e I. E. Balcarce (2005). Girasol - Eficiencia de Cosecha y Postcosecha. Manfredi: INTA-EEA Manfredi.

Buchbauer, G., L. Jirovetz, M. Wasicky, y A. Nikiforov (1993). "Headspace and Essential Oil Analysis of Apple Flowers." Journal of Agricultural Food Chemistry **41(1)**:116-118.

Byers, K. J., H. Bradshaw y J. A. Riffell (2014). "Three floral volatiles contribute to differential pollinator attraction in monkeyflowers (Mimulus)." The Journal of Experimental Biology **217**(4): 614-623.

Calderone, N. W. (2012). "Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: Trend analysis of aggregate data for the period 1992–2009." PLoS one **7**(5): e37235.

Corbet, S. A., J. Beament y D. Eisikowitch (1982). "Are electrostatic forces involved in pollen transfer?" Plant, Cell & Environment **5**(2): 125-129.

Corbet, S. A., I. Williams, et al. (1991). "Bees and the pollination of crops and wild flowers in the European Community." Bee world **72**(2): 47-59.

Chacoff, N. P., C. L. Morales, L. A Garibaldi, L. Ashworth, y M.A. Aizen (2010). "Pollinator dependence of Argentinean agriculture: current status and temporal analysis." The Americas Journal of Plant Science and Biotechnology, 3, 106-116..

Chaudhary, S. y I. Anand (1984). "Heterosis and inbreeding depression in sunflower." Crop Improvement **11**(1): 15-19.

Dag, A., Y. Zvieli, O. Afik, y Y. Elkind (2008). "Honeybee pollination affects fruit characteristics of sweet pepper grown under net-houses." International journal of vegetable science **13**(4): 45-59.

Danchin, É., L.-A. Giraldeau, T. J. Valone, y R. H. Wagner (2004). "Public information: from nosy neighbors to cultural evolution." Science **305**(5683): 487-491.

De Estrada, E., M. Vázquez, D. Moreno, S. Bravo, J. Amores, G. San Román, P. Bergada, J. M. Dodds, A. B. de Romano, y C. A. Sala.. (2012). Sunflower seed production: past, present, and perspectives. Proc. 18th International Sunflower Conference, Mar del Plata, Argentina. pp. 118-125. 2012.

DeGrandi-Hoffman, G., R. Hoopingarner y K. Baker (1984). "Pollen Transfer in Apple Orchards Tree-To-Tree or Bee-To-Bee?" Bee Word.

DeGrandi-Hoffman, G., R. Hoopingarner y K. Klomparens (1986). "Influence of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) In-hive Pollen Transfer on Cross-pollination and Fruit Set in Apple." Environmental Entomology **15(3)**: 723-725

DeGrandi-Hoffman, G. y J. H. Martin (1993). "The size and distribution of the honey bee (*Apis mellifera* L.) cross-pollinating population on male-sterile sunflowers (*Helianthus annuus* L.)." Journal of Apicultural Research **32**(3/4): 135-142.

Delaplane, K. S., A. Dag, R. G. Danka, B. M. Freitas, L. A. Garibaldi, R. M. Goodwin y J. I. Hormaza (2013). "Standard methods for pollination research with *Apis mellifera*." Journal of Apicultural Research **52**(4).

Delaplane, K. S. y D. F. Mayer (2000). Crop pollination by Bees. New York, CABI.

Díaz, P. C. (2013). Ecología cognitiva de la abeja *Apis mellifera* en cultivos que requieren polinización entomófila: estudios básicos y aplicados. Tesis Doctoral FCEN-UBA.

Díaz, P. C., A. Arenas, V. M. Fernández, C. Susic Martin, A. M. Basilio, y W. M. Farina (2013). "Honeybee cognitive ecology in a fluctuating agricultural setting of apple and pear trees." Behavioral Ecology **24**(5): 1058-1067.

Díaz, P. C., C. Grüter y W. M. Farina (2007). "Floral scents affect the distribution of hive bees around dancers." Behavioral Ecology and Sociobiology **61**(10): 1589-1597.

Ditzen, M., J.-F. Evers y C. Giovanni Galizia (2003). "Odor similarity does not influence the time needed for odor processing." Chemical Senses **28**(9): 781-789.
Dorado, J. (2011). Interacciones planta-polinizador desde la perspectiva de los polinizadores: Diversidad floral, reproducción de abejas solitarias y su especialización. Tesis Doctoral FCEN-UBA.

Dudareva, N. y E. Pichersky (2006). Biology of floral scent, CRC Press.

Etievant, P.X., M. Azar, M.H. Pham-Delegue y C. Masson (1984). Isolation and identification of volatile constituents of sunflower (*Helianthns annuus* L.) Journal of Agricultural Food Chemistry.
32(3):503-509.

Faegri, K. y L. Van der Pijl (1966). "Principles of pollination ecology." Elsevier.

(FAO), F. a. A. O. o. t. U. N. "Pollination Services for Sustainable Agriculture" From http://faostat.fao.org.

Farina, W. M., P. C. Díaz y A. Arenas (2011a). Una formulación que promueve la polinización dirigida de abejas melíferas hacia cultivos de manzano. Solicitud de Patente Número 20110102441 Instituto de Propiedad Intelectual.

Farina, W. M., P. C. Díaz, y A. Arenas (2011b). Una formulación que promueve la polinización dirigida de abejas melíferas hacia cultivos de girasol. Solicitud de Patente Número 20110102442. Instituto de Propiedad Intelectual.

Farina, W. M., C. Grüter y P. C. Díaz (2005). "Social learning of floral odours inside the honeybee hive." Proceedings of the Royal Society 272(1575): 1923-1928..

Farkas, Á. y Z. Orosz-Kovács (2003). "Nectar secretion dynamics of Hungarian local pear cultivars." Plant Systematics and Evolution **238**(1-4): 57-67.

Fewell JH, Winston ML (1992) Colony state and regulation of pollen foraging in the honey bee, *Apis mellifera* L. Behavior Ecology and Sociobiology 30:387–393

Fick, G. N. y D. E. Zimmer (1976). Yield stability of sunflower hybrids and open pollinated varieties Proceedings of the 7th International Sunflower Conference Paris.

Franco, D. (2010). Girasol y soja. Alimentos Argentinos, Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca. Presidencia de la Nación.

Free, J. B. (1963). "The flower constancy of honeybees." Journal of Animal Ecology 119-131.

Free, J. (1964). "The behaviour of honeybees on sunflowers (*Helianthus annuus* L.)." Journal of Applied Ecology: 19-27.

Free, J. (1965). "Attempts to increase pollination by spraying crops with sugar syrup." Journal of Apicultural Research **4**: 61-64.

Free, J. B. (1966). "The foraging areas of honeybees in an orchard of standard apple trees." Journal of Applied Ecology: 261-268.

Free, J. B. (1993). Insect Pollination of Crops, Academic Press, London, UK.

Free, J. y J. Simpson (1964). "POLLINATION REQUIREMENTS OF SUNFLOWERS (*Helianthus annuus* L)." Empire Journal of Experimental Agriculture **32**(128): 340

Free, J. B. y A. J. Durrant (1966). "The transport of pollen by honeybees from one foraging trip to the next." Journal of Horticultural Science 41(1): 87.

Free, J. B. y I. H. Williams (1972). "The Transport of Pollen on the Boby Hairs of Honeybees (*Apis mellifera*) and Bumblebees (*Bombus* spp. L.) " Journal of Applied Ecology **609-615**.

Frings, H. (1944). "The loci of olfactory end organs in the honey bee, *Apis mellifera* Linn." Journal of Experimental Zoology **97**(2): 123-134.

Gaaliche, B., M. Trad y :M. Mars . (2011). "Effect of pollination intensity, frequency and pollen source on fig (*Ficus carica* L.) productivity and fruit quality." Scientia Horticulturae **130**(4): 737-742.

Gallai, N., J.-M. Salles, J. Settele, y B.E. Vaissière (2009). "Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline." Ecological Economics **68(3)**: 810-821.

Garibaldi, L. A., I. Steffan-Dewenter, R. Winfree, M. A. Aizen, R. Bommarco, S. A. Cunningham, C. Kremen et al.. (2013). Wild Pollinators Enhance Fruit Set of Crops Regardless of Honey Bee Abundance. Science. 339(6127): 1608-1611.

Ghazoul, J. (2005). "Buzziness as usual? Questioning the global pollination crisis." Trends in ecology & evolution **20**(7): 367-373.

Ghirlanda, S. y M. Enquist (2003). "A century of generalization." Animal Behaviour **66**(1): 15-36.

Giurfa, M. (2003). "Cognitive neuroethology: dissecting non-elemental learning in a honeybee brain." Current opinion in neurobiology **13**(6): 726-735.

Giurfa, M. (2007). "Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: a taste from the magic well." Journal of Comparative Physiology A **193**(8): 801-824.

Gotelli M. M., B. G. Galati y D. Medan (2008). "Embryology of *Helianthus annuus* (Asteraceae)." Annales Botanici Fennici. Vol. 45. No. 2. Finnish Zoological and Botanical Publishing Board.

Goulson, D. (1999). "Foraging strategies of insects for gathering nectar and pollen, and impications for plant ecology and evolution." Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 2.2: 185-209.

Grant, V. (1950). "The flower constancy of bees." The Botanical Review **16**(7): 379-398.

Greenleaf, S. S. y C. Kremen (2006). "Wild bees enhance honey bees' pollination of hybrid sunflower." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(37): 13890-13895.

Grüter, C. (2008). Social learning of food odours and the implications for collective foraging in honeybees (*Apis mellifera*). Disertación Doctoral.

Grüter, C., L. E. Acosta y W. M. Farina (2006). "Propagation of olfactory information within the honeybee hive." Behavioral ecology and sociobiology **60**(5): 707-715.

Grüter, C., M. Balbuena y W. M. Farina. (2009). "Retention of long-term memories in different age groups of honeybee (*Apis mellifera*) workers." Insectes sociaux **56**(4): 385-387.

Guerrieri, F., H. Lachnit, B. Gerber y M. Giurfa (2005). "Olfactory blocking and odorant similarity in the honeybee." Learning & Memory **12**(2): 86-95.

Hatjina, F., J. B. Free y R. J. Paxton (1999). "Hive-entrance pollen transfer devices to increase the cross-pollination of honeybee. II. Examination of three materials and pollen viability." Journal of Apicultural Research 38(1-2): 3-9.

Hein, L. (2009). "The Economic Value of the Pollination Service, a Review Across Scales." Open Ecology Journal **2**: 74-82.

Hooper, T. (1991). Guide to bees and honey, Blandford Press.

Kadkol, G. P., I. J. Anand y R. P. Sharma. (1984). "Combining Ability and Heterosis in Sunflower " The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding 44(3): 447-451.

Kendall, K. y C. Stainton (2001). "Adhesion and aggregation of fine particles." Powder Technology **121**(2): 223-229.

Kinman, M. L. (1970). Greetings from Murray L. Kinman. Fourth International Sunflower Conference.

Klein, A. M., B. E. Vaissière, J. H Cane, I. Steffan-Dewenter, S. A. Cunningham, C. Kremen, y T. Tscharntke. (2007). "Importance of pollinators in changing landscapes for world crops." Proceedings of the Royal Society 274 (1608): 303-313.

Laloi, D., O. Bailez, et al. (2000). "Recognition of complex odors by restrained and free-flying honeybees, Apis mellifera." Journal of chemical ecology **26**(10): 2307-2319.

Lautenbach, S., R. Seppelt, J. Liebscher, y C. F. Dormann. (2012). "Spatial and temporal trends of global pollination benefit." PLoS one **7**(4): e35954.

Lentz, D. L., M. D. Pohl, et al. (2008). "Sunflower (*Helianthus annuus* L.) as a pre-Columbian domesticate in Mexico." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(17): 6232-6237.

Lindauer, M. (1952). "Ein beitrag zur frage der arbeitsteilung im bienenstaat." Zeitschrift für vergleichende Physiologie **34**(4): 299-345.

Loper, G. y G. DeGrandi-Hoffman (1994). "Does in-hive pollen transfer by honey bees contribute to cross-pollination and seed set in hybrid cotton?" Apidologie **25:94-102**.

Loper, G. y R. Roselle (1991). "Experimental use of BeeScent to influence honey bee visitation and yield of watermelon." American Bee Journal **131**: 777.

Maurizio A.,I. Grafl (1969). Das Trachtpflanzenbuch. Nektar Und Pollen die wichtigsten Nahrungsquellen der Honingbiene, Ehrenwirth Verlag, München

Mayer, D., R. Britt y J. D. Lunden. (1989). "Evaluation of BeeScent as a honey bee attractant." American bee journal 130:41-42.

Meyer, W. B. y B. L. Turner (1992). "Human Population Growth and Global Land-Use/Cover Change." Annual Review of Ecology and Systematics 39-61.

Mc Gregor, M. C. (1976). Insect Pollination of Cultivated Crop Plants. US Department of Agriculture.

Menzel, R. (1985). "Learning in honey bees in an ecological and behavioral context." Experimental behavioral ecology **31**: 55-74.

Menzel, R. y J. Erber (1978). "Learning and Memory in Bees." Scientific American **239(1)**:102-110.

Michener, C. D. (1974). The social behavior of the bees: a comparative study, Harvard University Press.

Minagri (2014). Perfil de Mercados de Manzana y Pera, Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca. Presidencia de la Nación. Dirección de Mercados Agrícolas. Área Frutas.

Monselise, S. y E.E. Goldschmidt (1982) Alternate Bearing in Fruit Trees. Horticulturae Reviews 4:128-173.
Moreti, A.D.C., R. M. B. da Silva. E. C. A da Silva M. Alves y I.Otsuk (1996). "Aumento na produção de sementes de girassol (*Helianthus annuus*) pela ação de insetos polinizadores." Scientia agrícola 53(2-3): 280-284..

Morse, R. A. y N. W. Calderone (2000). "The value of honey bees as pollinators of US crops in 2000." Bee culture **128**(3): 1-15.

Naylor, R. L. (1996). "Energy and resource constraints on intensive agricultural production." Annual Review of Energy and the Environment **21(1)**: 99-123.

Nixon, H. y C. Ribbands (1952). "Food transmission within the honeybee community." Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences **140**(898): 43-50.

Oldroyd, B. P. (2007). "What´s Killing American Honey Bees?" PLoS BIOLOGY **5**(6): e168.

Oster, G. F. y E. O. Wilson (1978). Caste and ecology in the social insects, Princeton University Press.

Oz, M., A. Karasu, et al. (2009). "Effects of honeybee (*Apis mellifera*) pollination on seed set in hybrid sunflower (*Helianthus annuus* L.)." African Journal of Biotechnology **8**(6): 1037-1043.

Pacheco, J. y M. D. Breed (2008). "Sucrose-response thresholds and the expression of behavioural tasks by middle-aged honeybee workers." Animal Behaviour **76**(5): 1641-1646.

Pankiw, T., M. Nelson, R. E. Page Jr, y M. K. Fondrk (2004). "The communal crop: modulation of sucrose response thresholds of pre-foraging honey bees with incoming nectar quality." Behavioral ecology and sociobiology **55**(3): 286-292.

Pavlov, I. (1927). Conditioned reflexes. *An Investigation of the physiological activity of the cerebral cortex.* Oxford: Oxford University Press.

Pearce, J. M. (1987). "A model for stimulus generalization in Pavlovian conditioning." Psychological review **94**(1): 61.

Pelz, C., B. Gerber y R. Menzel (1997). "Odorant intensity as a determinant for olfactory conditioning in honeybees: roles in discrimination, overshadowing and memory consolidation." The Journal of Experimental Biology **200**(4): 837-847.

Pham-Delegue, M., C. Masson, P. Etievant y M. Azar (1986). "Selective olfactory choices of the honeybee among sunflower aromas: a study by combined olfactory conditioning and chemical analysis." Journal of chemical ecology **12**(3): 781-793.

Pham-Delègue, M., O. Bailez, M. M. Blight, C. Masson, A. L. Picard-Nizou, y L. J. Wadhams (1993). "Behavioural discrimination of oilseed rape volatiles by the honeybee Apis mellifera L." Chemical senses **18**(5): 483-494.

Reinhard, J., M. V. Srinivasan, D. Guez, y S. W. Zhang (2004). "Floral scents induce recall of navigational and visual memories in honeybees." Journal of Experimental Biology **207**(25): 4371-4381.

Reinhard, J., M. Sinclair, M. V. Srinivasan y C. Claudianos (2010). "Honeybees learn odour mixtures via a selection of key odorants." PLoS one **5**(2): e9110.

Ribbands, C. R. (1952). "Division of labour in the honeybee community." Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences **140**(898): 32-43.
Ribbands, C. (1955). "The scent perception of the honeybee." Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences **143**(912): 367-379.

Riffell, J. A., H. Lei y G. Hildebrand (2009). "Neural correlates of behavior in the moth Manduca sexta in response to complex odors." Proceedings of the National Academy of Sciences **106**(46): 19219-19226.

Robinson, G. E. (1992). "Regulation of division of labor in insect societies." Annual review of entomology **37**(1): 637-665.

Ryugo K (1986) Promotion and inhibition of flower initiation and fruit set by plant manipulation and hormones. Acta Hort 179:301–307

Seeley, T. D. (1982). "Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies." Behavioral ecology and sociobiology **11**(4): 287-293.

Seeley, T. D. (1985). Honeybee Ecology. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.

Seeley, T. D., Ed. (1995). The Wisdom of the Hive, Harvard University Press, London.

Seeley, T. D. (2010). Honeybee democracy, Princeton University Press.

Simpson, B. B. y M. C. Ogorzally (1995). Economic Botany. Plants in Our World.

Singh, S. B., K. S. Labana y D. S. Virk. (1984). "Heterosis in variety x inbred crosses of sunflower." Crop Improvement.

SENASA (2009).Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas .

Sokal, R. R. and F. J. Rohlf (1995). Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. New York.

Sokal, R. R. y F. J. Rohlf (2000). Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. New York.

Steffan-Dewenter, I. and A. Kuhn (2003). "Honeybee foraging in differentially structured landscapes." Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences 270(1515): 569-575

Takeda, K. (1961). "Classical conditioned response in the honey bee." Journal of Insect Physiology **6**(3): 168-179.

vanEngelsdorp, D. y M. D. Meixner (2010). "A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them." Journal of Invertebrate Pathology **103**: S80-S95

Visscher, P. K. y T. D. Seeley (1982). "Foraging Strategy of Honeybee Colonies in a Temperate Decidous Forest." Ecology **63**(6): 1790-1801.

von Frisch, K. (1923). "Uber die'Sprache'der Bienen." Zoologische Jahrbucher Abteilung fur Allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere **40**: 1-186.

von Frisch, K. (1943). "Versuche über die Lenkung des Bienenfluges durch Dufstoffe." Naturwissenschaften **31**: 445-460.

von Frisch, K. (1967). The dance language and orientation in honey bees, Harvard University Press, Cambridge.

Wadhams, L., M. Blight, V. Kerguelen, M. Le Métayer, F. Marion-Poll, C. Masson, M. H. Pham-Delègue, and C. M. Woodcock (1994). "Discrimination of oilseed rape volatiles by honey bee: novel combined gas chromatographic-electrophysiological behavioral assay." Journal of chemical ecology **20**(12): 3221-3231.

Waser, N. M. (1986). "Flower constancy: definition, cause and measurement." The American Naturalist. 593-603.

Wenner, A. M., P. H. Wells, et al. (1969). "Honey bee recruitment to food sources: olfaction or language?" Science **164**(3875): 84-86.

Westerkamp, C. y G. Gottsberger (2002). "The costly crop pollination crisis." Pollinating Bees-The Conservation Link between Agriculture and Nature, P. Kevan y V. Imperatriz Fonseca, eds.(Brasilia: Ministry of Environment): 51-56.

Wilson, E. O. (1971). The insect societies, Cambridge, Massachusetts, USA, Harvard University Press [Distributed by Oxford University Press].

Williams, I. H. (1994). "The dependence of crop production within the European Union on pollination by honey bees." Agricultural Zoology Reviews (UK).

Winfree, R., B. J. Gross y C. Kremen (2011). "Valuing pollination services to agriculture." Ecological Economics **71**: 80-88.

Winston, M. L. (1987). The Biology of the Honey Bee. Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press.

Wright, G. A., S. M. Kottcamp y M. G. Thomson (2008). "Generalization mediates sensitivity to complex odor features in the honeybee." PLoS one **3**(2): e1704.

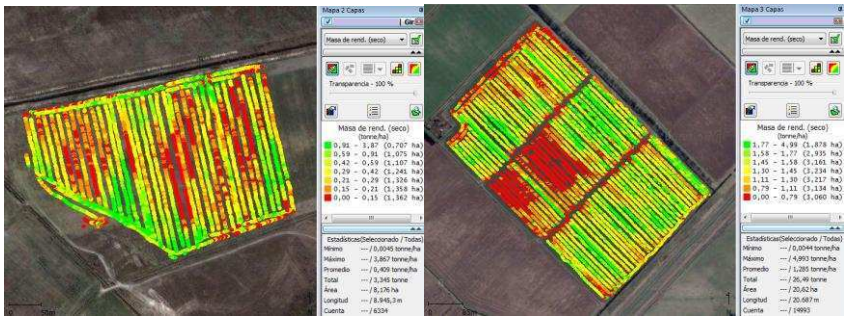
Wright, G. A. y F. P. Schiestl (2009). "The evolution of floral scent: the influence of olfactory learning by insect pollinators on the honest signalling of floral rewards." Functional Ecology **23**(5): 841-851.

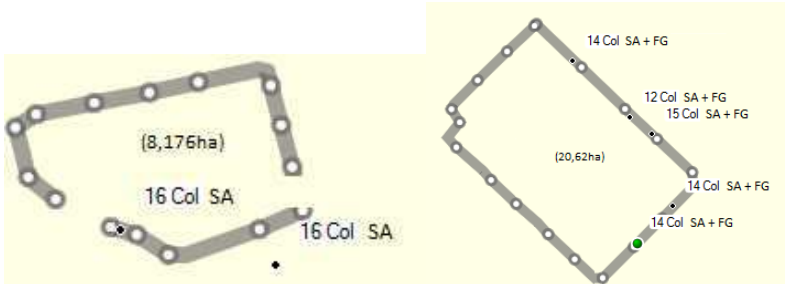
Yadav, R. N., S. N. Sinha y N. C. Singhal (2002). Honeybee (*Apis* spp.) Pollination in Sunflower Hybrid Seed Production: Effect of Planting Designs on Honybee Movement and its Operational Area. Standing Commission of Pollination and Bee Flora.

Zar, J. H. (1999). Biostatistical Analysis. New Jersey PRENTICE HALL.

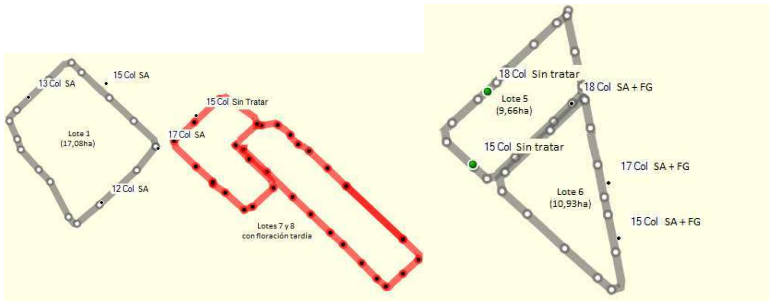
8. Anexo

LH1: Lote con SA (izq.): Lote con SA + FG (der)

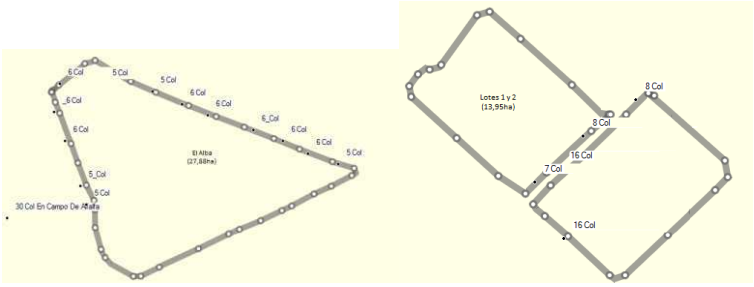


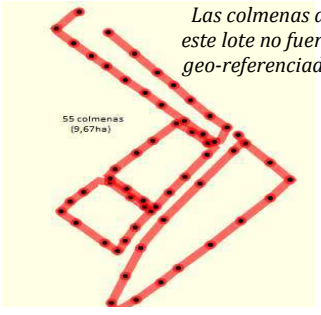
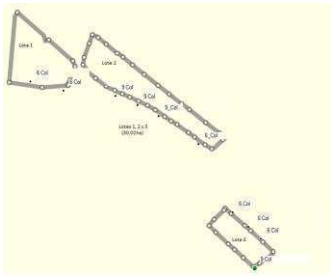


LH2: Lote con SA (izq.): Lote con SA + FG (der)



LH5(2): Lote ST (izq.): Lote con SA + FG (der)



LH6: Lote ST (izq.): Lote con SA + FG (der)

Las colmenas de este lote no fueron geo-referenciadas